

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO LEITE E DERIVADOS**

Vitória Barbosa Conceição

***Coxiella burnetii* em queijos artesanais feitos de leite cru de quatro
regiões tradicionais de Minas Gerais e uma do Piauí**

**Juiz de Fora
2024**

Vitória Barbosa Conceição

***Coxiella burnetii* em queijos artesanais feitos de leite cru de quatro
regiões tradicionais de Minas Gerais e uma do Piauí**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Roberto Silva

Coorientador: Dr. Henrique de Oliveira Frank

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Conceição, Vitória Barbosa .

Coxiella burnetii em queijos artesanais feitos de leite cru de quatro regiões tradicionais de Minas Gerais e uma do Piauí : Coxiella burnetii em queijos artesanais de leite cru Minas e Coalho e possíveis associações espaciais com exposições humanas no Brasil: um robusto estudo transversal / Vitória Barbosa Conceição. -- 2024. 73 f.

Orientador: Márcio Roberto Silva

Coorientador: Henrique de Oliveira Frank

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2024.

1. Febre Q. 2. Queijo Minas Artesanal. 3. Queijo Artesanal Coalho. 4. Nested-PCR. 5. Zoonose. I. Silva, Márcio Roberto, orient. II. Frank, Henrique de Oliveira, coorient. III. Título.

Vitória Barbosa Conceição

***Coxiella burnetii* em queijos artesanais feitos de leite cru de quatro regiões tradicionais de Minas Gerais e uma do Piauí**

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciência e Tecnologia
do Leite e Derivados
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre
em Ciência e
Tecnologia do Leite e
Derivados. Área de
concentração: Ciência
e Tecnologia do Leite
e Derivados.

Aprovada em 27 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Roberto Silva - Orientador
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. Henrique Oliveira Frank - Coorientador
Embrapa Gado de Leite

Prof. Dr. João Batista Ribeiro
Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos

Prof. Dr. Jorlan Fernandes de Jesus

Fundação Instituto Oswaldo Cruz

Juiz de Fora, 19/07/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Roberto Silva, Usuário Externo**, em 22/07/2024, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ELBA REGINA SAMPAIO DE LEMOS, Usuário Externo**, em 24/07/2024, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Batista Ribeiro, Usuário Externo**, em 24/07/2024, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Henrique Oliveira Frank, Usuário Externo**, em 24/07/2024, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jorlan Fernandes de Jesus, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1873766** e o código CRC **05A3E80C**.

Agradecimento

A Oxalá e aos meus guias espirituais por toda proteção, bênçãos, ajudas e pelos caminhos abertos.

Quero agradecer a minha mãe por todo amor, incentivo, paciência, apoio e orientação ao longo da pós-graduação. E ao meu pai, agradeço não só pelo apoio moral, incentivo, mas também por me ensinar a cada dia ser uma pessoa mais dedicada e humilde. Sem vocês não estaria nesta universidade, vivenciando momentos e tendo aprendizados que jamais serão esquecidos.

Aos meus irmãos Mateus e Mariana. Amo muito vocês.

As minhas tias Fátima e Penha por todo amor, incentivo e apoio que vocês me deram ao longo dessa fase. Amo vocês.

Ao meu Terreiro Vô Benedito de Aruanda, a minha Mãe Penha de Xangô, as Entidades, agradeço por cada ensinamento, força, carinho e ajuda que me deram ao longo desta jornada.

A minha psicóloga Rafaela Ferreira, pelo carinho, paciência, apoio, e por todos os ensinamentos que me proporcionou, os quais me ajudaram durante essa fase da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcio Roberto Silva, que me instruiu durante toda pós-graduação. Agradeço por todo carinho, paciência, conhecimento compartilhado e por acreditar em mim.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade de qualificação profissional e pela bolsa de estudo proporcionada.

À Embrapa Gado de Leite e ao Laboratório de Microbiologia do Leite por tornarem possível a execução do meu projeto de pesquisa, e por proporcionarem as experiências que me fizeram crescer tanto como profissional, quanto como pessoa.

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pela parceria durante o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a parceria Embrapa-CNPq pela bolsa de estudos disponibilizada no ano de 2023 .

Ao meu amigo e companheiro de laboratório Dr. Henrique Frank, obrigada por cada conhecimento compartilhado, ajuda, paciência, desabafos e amizade ao longo dessa trajetória.

Aos pesquisadores Elba Lemos, Jorlan Fernandes e André Duch, pela parceria na construção do artigo científico.

A todos os autores do artigo científico, pela colaboração.

Aos amigos que Juiz de Fora me deu, Ana Vitória, Yasmin, Bruna, Bárbara, Fúlvia, Cláudia e Joice. Em especial à Larissa, que desde o estágio obrigatório na Embrapa, e, agora, nesta jornada da pós-graduação, continuamos sempre uma apoiando a outra.

Por fim, agradeço também às minhas amigas de São Paulo, Andressa, Beatriz, Gabriela, Larissa, Roberta e Bianca, que mesmo de longe sempre me apoiaram.

“Procure a sabedoria e aprenda a escrever os capítulos mais importantes de sua história nos momentos mais difíceis de sua vida”

RESUMO

A febre Q é uma doença zoonótica com distribuição mundial, causada por *Coxiella burnetii*, um patógeno que infecta uma grande variedade de animais vertebrados e invertebrados, incluindo seres humanos, sendo os ruminantes domésticos considerados seus principais reservatórios naturais. A infecção humana ocorre principalmente por via aerógena, e pela ingestão de leite cru que é uma via menos comum, mas não desprezível. Durante o período de outubro/2017 a abril/2018 foi realizado um levantamento randomizado com o objetivo de avaliar: i) a frequência de DNA de *C. burnetii* em queijos artesanais feitos de leite cru (QALC) de quatro regiões tradicionais do estado de Minas Gerais, que produzem o queijo Minas artesanal (QMA) e da região de Parnaíba, estado do Piauí, que produz o queijo artesanal de coalho; ii) os fatores associados à contaminação dos QALC pela proteobactéria *C. burnetii*; iii) as relações de agrupamentos espaciais de QALC contaminados pelo agente bacteriano considerando as características dos queijos como o tempo de maturação, resultados de análises microbiológicas para outros agentes bacterianos ou virais e concentração de pecuária; iv) as possíveis relações entre os aglomerados de positividade para *C. burnetii* em QALC e as exposições humanas ao mesmo agente, bem como com a concentração de atividade pecuária. Um total de 100 amostras de QALC foi coletado de diferentes agroindústrias rurais familiares de processamento de queijo e submetidas à análise molecular com extração do DNA pelo método tradicional de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene IS1111 de *C. burnetii*. O fragmento parcial do gene IS1111 foi detectado e sequenciado em 25 amostras de QALC (25,0%; IC 95% 16,8%-34,6%). Verificou-se diferenças significativas de positividade nas microrregiões produtoras ($p=0,04$): Serro (17,0%), Canastra (20,0%), Triângulo Mineiro (40,0%), Cerrado (62,0%) e Piauí (21,05%). Houve relação inversa entre a taxa de QALC positivos para *C. burnetii* e tempo de registro no órgão oficial de fiscalização (Inclinação = -0,011, $p = 0,053$), e relação direta entre essas mesmas taxas de positividade em QALC e as taxas de queijos com tempo de maturação acima da mediana (10 dias) (Inclinação = 0,0042, $p = 0,0044$). Este

estudo mostra que a contaminação de QALC por *C. burnetii* pode representar um possível risco para o consumidor destes produtos, destacando a necessidade de boas práticas agropecuárias e de fabricação, e de sistemas de controle de qualidade dos QALC. Como uma pesquisa randômica, estabelecemos dados basais sobre a frequência de *C. burnetii* em dois tipos de QALC brasileiros prontos para consumo, a fim de permitir o monitoramento de tendências temporais e espaciais, o estabelecimento de metas de controle e de futuros estudos sobre a análise de risco local.

Palavras-chave: Febre Q; Queijo Minas artesanal; Queijo artesanal de coalho; Nested-PCR; Zoonose; Saúde Única.

ABSTRACT

Q fever is a zoonotic disease with worldwide distribution, caused by *Coxiella burnetii*, which infects several vertebrate and invertebrate animals, including humans, with domestic ruminants considered its main natural reservoirs. Human infection occurs mainly aerogenously and through ingestion of raw milk, which is a less common but not negligible route. During the period from October 2017 to April 2018, a randomized survey was carried out to evaluate: i) the frequency of *C. burnetii* DNA in raw milk artisanal cheese (RMAC) from four traditional regions of the state of Minas Gerais Gerais, which produces Minas artisanal cheese (MAC) and the region of Parnaíba, state of Piauí, which produces artisanal coalho cheese; ii) factors associated with *C. burnetii* positive-RMAC; iii) the relationships of spatial clusters of *C. burnetii* positive-RMAC and those of the characteristics of the cheese samples such as ripening time, results of microbiological analyzes for other bacterial agents and livestock concentration; iv) the possible relationships between the clusters of *C. burnetii* positive-MAC and human exposures to the same agent, as well as the concentration of livestock. A total of 100 RMAC samples were collected from different rural family cheese processing agroindustries and subjected to molecular analysis with DNA extraction using the traditional phenol-chloroform-isoamyl alcohol method, using specific oligonucleotides targeting the *C. burnetii* IS1111 gene. The partial fragment of the IS1111 gene was detected and sequenced in 25 RMAC samples (25.0%; 95% CI 16.8%-34.6%). There were significant differences in *C. burnetii* positive-RMAC in the producing microregions ($p=0.04$): Serro (17.0%), Canastra (20.0%), Triangle Mineiro (40.0%), Cerrado (62.0%) and Piauí (21.05%). There was an inverse relationship between the rate of *C. burnetii* positive-RMAC and the time of registration with the official surveillance body (Slope = -0.011, $p = 0.053$), and a direct relationship between these same RMAC positivity rates and the rates of cheeses with ripening time above the median (10 days) (Slope = 0.0042, $p = 0.0044$). This study shows that contamination of RMAC by *C. burnetii* can represent a possible risk for the consumer of these products, highlighting the need for good agricultural and manufacturing practices, and quality control systems for RMAC. As a randomized survey, we established baseline data on the frequency of *C. burnetii* in two types of ready-to-eat Brazilian RMAC, to allow

the monitoring of temporal and spatial trends, the establishment of control targets, and future studies on local risk analysis.

Keywords: Q fever; Minas artisanal cheese; Coalho artisanal cheese; Nested PCR; Zoonosis; One health.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
COXIELLA BURNETII EM QUEIJOS ARTESANAIS DE LEITE CRU MINAS E COALHO E POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES ESPACIAIS COM EXPOSIÇÕES HUMANAS NO BRASIL: UM ROBUSTO ESTUDO TRANSVERSAL *	15
Resumo	16
1. Introdução	18
2. Material e métodos	20
2.1 Desenho, local do estudo e planejamento da amostragem.....	20
2.2 Coleta de dados e amostras	21
2.3 Extração de DNA	21
2.4 Nested-PCR.....	22
2.5 Sequenciamento de DNA.....	22
2.6 Análises epidemiológicas e espaciais	23
3. Resultados	24
4. Discussão.....	31
5. Conclusão	37
6. Referências	38
COXIELLA BURNETII IN MINAS AND COALHO RAW MILK ARTISANAL CHEESE AND POSSIBLE SPATIAL ASSOCIATIONS WITH HUMAN EXPOSURES IN BRAZIL: A ROBUST CROSS-SECTIONAL STUDY *	44

Apresentação

Essa dissertação será apresentada na forma de artigo científico, a ser direcionado para o periódico *International Journal of Food Microbiology*. As versões em português e inglês do referido artigo serão apresentadas a seguir.

***Coxiella burnetii* em queijos artesanais de leite cru Minas e Coalho e possíveis associações espaciais com exposições humanas no Brasil: um robusto estudo transversal ***

André Almeida Santos Duch^{a,1}, Vitória Barbosa Conceição^{b,1}, Jorlan Fernandes de Jesus^c, Danielle da Silva Forneas^c, Dominique Elvira de Souza Freitas^c, Henrique Oliveira Frank^d, Jonathan Gonçalves Oliveira^c, Karina Neob de Carvalho Castro^d, Ricardo José de Paula Souza e Guimarães^e, Igor Rosa Meurer^b, José Otávio do Amaral Corrêa^b, João Batista Ribeiro^{b,d}, Liliane Denize Miranda Menezes^a, Tatiana Rozental^c, Marcio Roberto Silva^{b,d,1}, Elba Regina Sampaio de Lemos^{c,1}.

^aInstituto Mineiro de Agricultura e Pecuária, 31630-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^bUniversidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

^cInstituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 21040-360, Rio de Janeiro, Brasil

^dEmbrapa Gado de Leite, 36038-33, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

^eInstituto Evandro Chagas, 67030-000, Ananindeua, Pará, Brasil

*Autores correspondentes.erslemos@gmail.com (E.R. Lemos), Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses. Instituto Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, 21040-360

marcio-roberto.silva@embrapa.br (M.R.Silva), Embrapa Gado de Leite. Av. Eugênio do Nascimento 610 – Aeroporto, Juiz de Fora, MG, 36038-330

¹Contribuíram igualmente como primeiros autores.

Resumo

A febre Q é uma doença zoonótica de distribuição mundial, causada por *Coxiella burnetii*, que infecta uma grande variedade de animais vertebrados e invertebrados, incluindo o ser humano, sendo os ruminantes domésticos considerados seus principais reservatórios naturais. A infecção humana ocorre principalmente por via aerógena, sendo a ingestão de leite cru uma via menos comum, mas não desprezível. O objetivo foi realizar um inquérito randomizado para avaliar a frequência de queijo artesanal de leite cru (QALC) positivo para *C. burnetii* em cinco microrregiões tradicionais brasileiras, bem como avaliar os fatores associados. Além disso, analisar as relações entre agrupamentos espaciais de *C. burnetii* positivo-QALC e aqueles de exposições humanas e concentração de gado, bem como agrupamentos de outras características do queijo, como tempo de maturação e resultados de outras análises microbiológicas. Durante o período de outubro/2017 a abril/2018, foram coletadas 100 amostras de QALC de diferentes agroindústrias rurais familiares de processamento de queijo (ARFPQ) em quatro e uma regiões dos estados de Minas Gerais e Piauí, respectivamente. O DNA de amostras fracionadas de QALC foi extraído usando o método tradicional de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. A PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene IS1111. Também foram avaliadas possíveis associações de variáveis descritivas com QALC positivo para *C. burnetii* e análises espaciais para ARFPQ com QALC positivo, exposições humanas a esse patógeno e concentrações em animais. O fragmento parcial do gene IS1111 de *C. burnetii* foi detectado e sequenciado em 25 amostras de QALC (25,0%; IC 95% 16,8%-34,6%), verificando-se uma heterogeneidade nas taxas de queijos positivos entre as cinco regiões analisadas ($p = 0,04$). As taxas de *C. burnetii* positivo-QALC apresentaram relações lineares diretas e inversas com as taxas de queijos com tempos de maturação acima da mediana (10 dias) (Inclinação = 0,0042, $p = 0,0044$) e com o tempo de registro no órgão oficial de fiscalização (Inclinação = -0,011, $p = 0,053$), respectivamente. Foram encontradas possíveis ligações entre um aglomerado de alta densidade de população humana exposta a *C. burnetii* em MG, Brasil, e ambos os aglomerados, *C. burnetii* positivo-QMA, e altas concentrações de animais de criação. Este estudo mostra que QALC positivo

para *C. burnetii* pode representar riscos para o consumidor desses produtos, enfatizando a necessidade de boas práticas agrícolas e de fabricação, e de sistemas de controle de qualidade de QALC. Como um levantamento randomizado, estabelecemos dados de base sobre as frequências de *C. burnetii* em dois tipos de QALC brasileiros prontos para consumo, a fim de permitir o monitoramento de tendências temporais e espaciais, estabelecimento de metas de controle e futuros estudos de análise de risco local.

Palavras-chave: Febre Q; Queijo Minas artesanal; Queijo artesanal de coalho; Nested-PCR; Zoonose; Saúde Única.

1. Introdução

A febre Q é uma doença zoonótica com distribuição mundial, causada por *Coxiella burnetii*, uma bactéria Gram-negativa intracelular, descrita pela primeira vez na Austrália em 1937 e posteriormente em diversas regiões do mundo (Mares-Guia et al., 2014; Lemos et al., 2018). No Brasil, a primeira evidência sorológica de febre Q em humanos foi em 1953 (Brandão et al., 1953). Esta doença é considerada de notificação imediata em caso animal confirmado, mas deixou de ter notificação obrigatória para humanos na última década neste país. No entanto, um número crescente de casos humanos tem sido observado predominantemente nos estados da região Sudeste do Brasil (Lemos et al., 2011, 2018, Epelboin et al., 2021). Neste contexto além da subnotificação dos casos na maioria do território nacional, e da dificuldade no reconhecimento da doença por parte dos médicos e veterinários, poucos estudos relativos à identificação e caracterização de *C. burnetii* em humanos, animais e meio ambiente têm sido desenvolvidos (Lemos et al., 2011; 2018; Mares-Guias et al., 2014; 2016).

Além de ser um agente altamente resistente, devido à formação de estruturas semelhantes a esporos, esta proteobactéria pode resistir no ambiente por um longo período em condições adversas, com alto poder infeccioso. Alguns estudos indicam que apenas uma única bactéria inalada tem potencial para desencadear doenças em seres humanos. Devido a essas características, este agente é considerado classe 3 de biossegurança pertencente à categoria B de bioterrorismo (Epelboin et al., 2021).

C. burnetii tem distribuição mundial e infecta uma grande variedade de animais vertebrados e invertebrados. Os ruminantes domésticos são considerados seus principais reservatórios naturais, pois liberam grandes quantidades do agente no ambiente no período pós-parto, por meio de restos placentários e fluidos fetais, mas também pelo leite, fezes e urina (Mares-Guia et al., 2014; Barandika et al., 2019; Epelboin et al., 2021). A excreção de *C. burnetii* no leite permanece ativa durante todo o período de lactação, porém a magnitude do risco de contaminação humana com a ingestão de leite cru ainda não está totalmente estabelecida, embora seja uma possível fonte (Barandika et

al., 2019). Isto é reforçado por fortes evidências epidemiológicas que associam surtos de febre Q ao consumo de leite e produtos lácteos não pasteurizados (Fishbein e Raoult, 1992; Signs et al., 2012).

O Minas Artesanal (MAC) e o Coalho Artesanal são queijos tradicionais do estado de Minas Gerais, da região Sudeste e da região Nordeste do Brasil, respectivamente. Estes estão associados à identidade sociocultural das regiões produtoras, representando grande parte da renda dos pequenos produtores, e ambos são produzidos com leite cru. Esses tipos de queijo já eram intensamente consumidos de forma clandestina, antes mesmo de existirem leis que formalizassem seu consumo, como a Lei 13.860/2019 (Brasil, 2019), que permite diferentes tipos de RMAC com diferentes tempos de maturação. Porém, ainda há muita incerteza sobre os prováveis riscos microbiológicos desses alimentos, como *C. burnetii*, Brucella, Mycobacterium bovis etc., para o consumidor, mesmo produzidos seguindo o Decreto Federal 9.013/2017 (Brasil, 2017), que determina maturação mínima de 60 dias.

Apesar da escassez de informações sobre a incidência da febre Q em nosso território, estudos têm mostrado evidências da circulação de *C. burnetii* em humanos (Siciliano et al., 2015; Mares-Guias et al., 2016; Lemos et al., 2011, 2018), animais (Mares-Guias et al., 2014; Oliveira et al., 2018; Souza et al., 2018), leite cru (Mioni et al., 2019) e queijos feitos de leite cru (Rozental et al., 2020). Diante de um cenário de poucas informações, da fragilidade das regulamentações quanto ao controle sanitário de queijos elaborados com leite cru e da possibilidade de transmissão de *C. burnetii* durante a produção e ingestão desses alimentos contaminados, um estudo, desenvolvido pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), Embrapa Gado de Leite e Fiocruz, demonstraram a presença dessa bactéria em quase 10% das amostras de QMA analisadas pela primeira vez no Brasil (Rozental et al., 2020). Posteriormente, outro estudo utilizando a mesma metodologia também demonstrou a positividade desse patógeno em QMA de outra microrregião do mesmo estado do Brasil (Nascimento et al., 2021).

O presente estudo tem como objetivo avaliar a frequência de *C. burnetii* em dois tipos de queijo artesanal brasileiro, o Minas, produzido em quatro das

principais regiões produtoras de Minas Gerais, e o Coalho, produzido no município de Parnaíba, estado do Piauí. Adicionalmente, busca analisar as relações entre aglomerados espaciais de QALC contaminados por *C. burnetii* e os de exposições humanas e de concentração de pecuária, bem como com os de outras características dos queijos como tempo de maturação e resultados de outras análises microbiológicas. Este estudo auxiliará com bases científicas a instituição de medidas de monitoramento e controle, além da construção de padrões relacionados aos QALC para apoiar os órgãos oficiais de vigilância nos setores agricultura, saúde e ambiente.

2. Material e métodos

2.1 Desenho, local do estudo e planejamento da amostragem

Este é um estudo para avaliar a frequência e os fatores associados a *C. burnetii* em 100 amostras de QALC produzidas em quatro regiões de Minas Gerais – MG (n = 81) e na região de Parnaíba, Piauí – PI (n = 19), ambos estados do Brasil, coletados de outubro de 2017 a abril de 2018. As 100 amostras foram obtidas de 100 agroindústrias rurais de base familiar produtoras de queijos (ARFPQs), com critério de inclusão ser fabricante de QALC feitos com leite de uma única fazenda.

As regiões do estado de Minas Gerais – Serro, Canastra, Triângulo Mineiro e Cerrado -, receberam neste estudo os códigos de identificação R1, R2, R3 e R4 respectivamente, conforme ordem de registro no órgão fiscalizador oficial de cada estado. Ressalta-se que as ARFPQs da região de Parnaíba, estado do Piauí, sob código de registro R5, ainda não possuíam registro e foi considerada como tempo zero de registro.

A partir de uma lista de 235 ARFPQs em cinco regiões produtoras tradicionais do Brasil, Canastra, Serro, Cerrado, Triângulo Mineiro e Parnaíba, a amostra da população-alvo para estimar a frequência de QALC positivos para *C. burnetii* foi determinada por sorteio aleatório de 100 (42,5%) amostras. A amostra foi escolhida utilizando a função Randbetween (Microsoft Excel). Foi coletado um queijo inteiro de cada ARFPQ para representá-la, pois cada uma produz queijo utilizando leite proveniente exclusivamente de uma única fazenda. Assim, o

tamanho da amostra foi baseado em uma população finita de 235, margem de erro de 7,5%, nível de confiança de 95% e proporção esperada de 50% de QALC positivos para *C. burnetii*.

2.2 Coleta de dados e amostras

Os produtores de queijo foram entrevistados por meio de questionário estruturado organizado por grupo de conteúdo, com foco em características socioeconômicas, saúde animal, Boas Práticas Agrícolas (BPA) e Boas Práticas de Fabricação (BPF). As amostras de queijo foram coletadas em suas embalagens e mantidas em caixas isotérmicas sob refrigeração (-4 °C) com gelo reciclável durante o transporte até o laboratório para análise.

Dois conjuntos de dados de QALC foram obtidos para avaliar possíveis associações com queijos positivos para *C. burnetii*. Primeiramente, apenas para QMA, análise bacteriana, teores de umidade (%) e período de maturação (abaixo e acima da mediana de 10 dias). Além disso, utilizamos dados de um levantamento anterior de exposições humanas ao mesmo patógeno realizado em MG no mesmo período deste estudo, também por membros da nossa equipe (Meurer et al., 2021), que incluiu análises de aglomerados espaciais de duas variáveis, exposições humanas e concentrações de animais pecuários, para explorar possíveis sobreposições espaciais destes aglomerados com aqueles de QMAs positivos para *C. burnetii*. Em segundo lugar, para todos os tipos de queijo, também utilizamos dados obtidos de um estudo prévio de nossa equipe sobre a presença de vírus nas mesmas amostras, para avaliar possíveis associações com QALC positivos para *C. burnetii* (Silva et al., 2021).

2.3 Extração de DNA

As amostras de queijo foram divididas em porções menores, de 100 g, e acondicionadas em sacos estéreis para amostras sólidas ou líquidas (INLAB, São Luís, Brasil), lacrados, identificados e homogeneizados.

A extração de DNA foi realizada a partir de 0,5 g de cada queijo pelo método tradicional fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, conforme protocolo de

Darwish et al. (2009), com algumas modificações. Especificamente, no início do protocolo houve algumas mudanças nos volumes, 1100 µL de tampão de lise (10 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 e 0,5% SDS) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) (Silva et al., 2015). Para a precipitação do DNA, foram adicionados 3 vezes de volume de etanol absoluto resfriado.

2.4 Nested-PCR

O DNA bacteriano amplificado por nested PCR foi detectado com primers específicos de *C. burnetii* projetados para amplificar o gene IS1111, derivado de uma região repetida semelhante a um transposon do genoma deste patógeno, usando os mesmos primers, controles e condições de um nested PCR (Mares - Guia et al., 2018), que foi previamente validado em queijo Minas artesanal contaminado artificial e naturalmente (Rozental et al., 2020). O conjunto de primers e as condições são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Primers e condições utilizadas para detecção de *Coxiella burnetii* em amostra de queijo artesanal de leite cru, Brasil.

Primers	Sequência (5' – 3')	Tamanho do fragmento	Temperatura anelamento
Trans 1	TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C	687pb	60°C
Trans 2	CCC AAC AAC ACC TCC TTATTC		
N3+	AAG CGT GTG GAG GAG CGA ACC	440pb	66° C
N4+	CTC GTA ATC ACC AAT CGC TTC GTC		

2.5 Sequenciamento de DNA

Considerando que a região amplificada não possui polimorfismos suficientes para qualquer análise além da confirmação da espécie *C. burnetii*. Fragmentos de tamanho apropriado foram purificados usando o kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). O sequenciamento dos amplicons foi realizado com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing e purificação com o kit BigDye® X-Terminator Purification (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as

recomendações do fabricante. As análises dos amplicons foram realizadas em um ABI Prism 3730XL com 96 capilares (Applied Biosystems) e as sequências de nucleotídeos foram analisadas usando o software MEGA7 (www.megasoftware.net).

2.6 Análises epidemiológicas e espaciais

A frequência de QALC positivos para *C. burnetii* foi determinada com um intervalo de confiança (IC) de 95% e usada como teste de triagem para ARFPQs positivas para *C. burnetii*. Fatores associados aos QALC positivos para *C. burnetii* foram avaliados pelo teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Para os queijos das cinco regiões estudadas, foram avaliadas possíveis associações das proporções de QALC positivos para *C. burnetii* com o tempo de registro no órgão oficial de fiscalização, utilizando o qui-quadrado para tendência linear. Além disso, apenas para QMA, foram avaliadas possíveis tendências lineares de sua positividade com taxas de maturação acima da mediana de 10 dias (<https://epitools.ausvet.com.au/trend>).

As microrregiões, unidades da federação, limites municipais e população estimada foram obtidas no Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (<https://www.ibge.gov.br>). As análises espaciais realizadas foram: Mapas coropléticos da distribuição espacial para visualização da localização do número de casos nos municípios; estimativa de densidade de Kernel (EDK) para identificar a localização de aglomerados de ocorrências de casos; Mapa de varredura espacial (Scan) para identificar aglomerados espaciais e temporais com significância estatística.

Para a construção dos mapas coropléticos foi utilizado o software ArcGIS versão 10.4 (<https://www.arcgis.com>), com as classes 'Sem casos' (cor branca), 'Baixo' (verde), 'Médio' (amarelo), 'Alto' (laranja) e 'Muito Alto' (vermelho) para distribuição espacial dos casos utilizando o quartil.

A EDK foi realizada para identificar aglomerados de ARFPQ com QALC positivos para *C. burnetii* (função quadrática, cálculo de densidade e raio

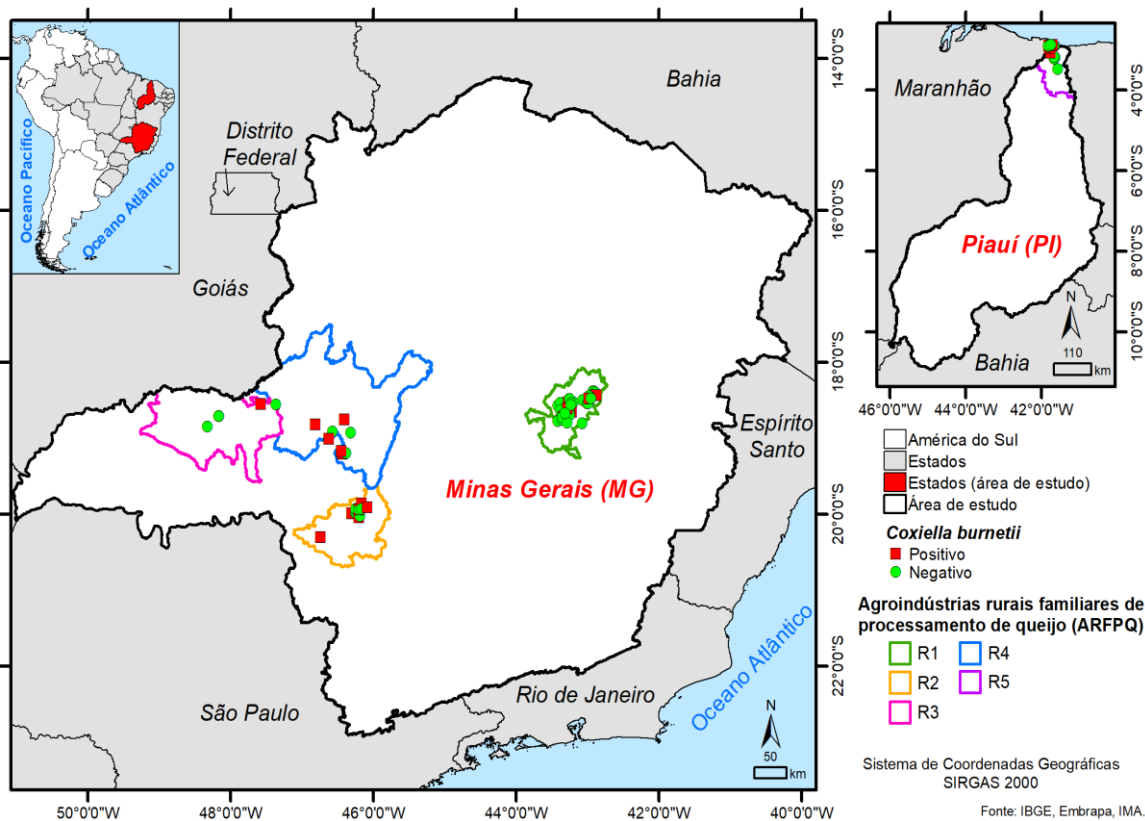
adaptativo), com a construção de um mapa de varredura espacial (Scan) para identificar aglomerados espaciais com significância estatística (espaço de varredura de análise pura), usando o modelo de Bernoulli. Apenas para QMA, as análises EDK também foram realizadas em amostras com outros resultados bacterianos positivos (*Estafilococos* coagulase-positivos e *Estafilococos* coagulase-negativos) e em amostras com períodos de maturação acima dos 10 dias medianos), para avaliar possíveis correlações entre os aglomerados. O processamento, interpretação, visualização e análise dos dados foram realizados usando ArcGIS ([//www.arcgis.com/](http://www.arcgis.com/)), TerraView ([//www.dpi.inpe.br/terralib5/wiki/doku.php](http://www.dpi.inpe.br/terralib5/wiki/doku.php)) e SatScan (<https://www.satscan.org/>).

Somente para o estado de MG, as análises espaciais de duas variáveis, exposições humanas a *C. burnetii* e concentrações de pecuária por área, pesquisadas no mesmo estado de estudo por nossa equipe (Meurer et al., 2021) foram reavaliadas para buscar possíveis associações espaciais com os aglomerados de QMAs positivos para *C. burnetii*.

3. Resultados

O fragmento parcial do gene IS1111 de *C. burnetii* foi detectado e confirmado por sequenciamento em 25 amostras de QALC (25,0%, IC95% 16,8%-34,6%). A Figura 1 mostra a distribuição espacial das ARFPQs com QALC positivo e negativo para *C. burnetii* nas cinco regiões produtoras tradicionais analisadas.

Figura 1. Distribuição espacial das agroindústrias rurais familiares de processamento de queijo artesanal de leite cru positivos (quadrados vermelhos) e negativos (círculos verdes) para *Coxiella burnetii* nas regiões Serro, Canastra, Triângulo Mineiro, Cerrado, Minas Gerais, e, Parnaíba, Piauí, Brasil, 2018. Produzido com o software ArcGIS.



Embora não significativa ($p = 0,12$), houve uma tendência a maiores taxas de QMA positivos para *C. burnetii* entre amostras com contagens mais baixas de *Estafilococcus* coagulase-positiva (ECP), contagens mais altas de *Estafilococcus* coagulase-negativa (ECN) ($p = 0,10$), períodos de maturação mais longos ($p = 0,12$) e menores graus de umidade ($p = 0,12$). Houve diferença significativa na taxa de QALC positivos para *C. burnetii* dependendo da microrregião produtora ($p = 0,04$) (Tabela 2), com tendência linear decrescente de QALC positivos para *C. burnetii* ao longo das diferentes microrregiões produtoras ordenadas por tempos de registros crescentes junto ao órgão oficial de fiscalização (Inclinação = $-0,011$, $p = 0,053$) (Figura 2).

Tabela 2. Análise univariada para positividade de *Coxiella burnetii* em queijos artesanais feitos de leite cru, Brasil, 2018.

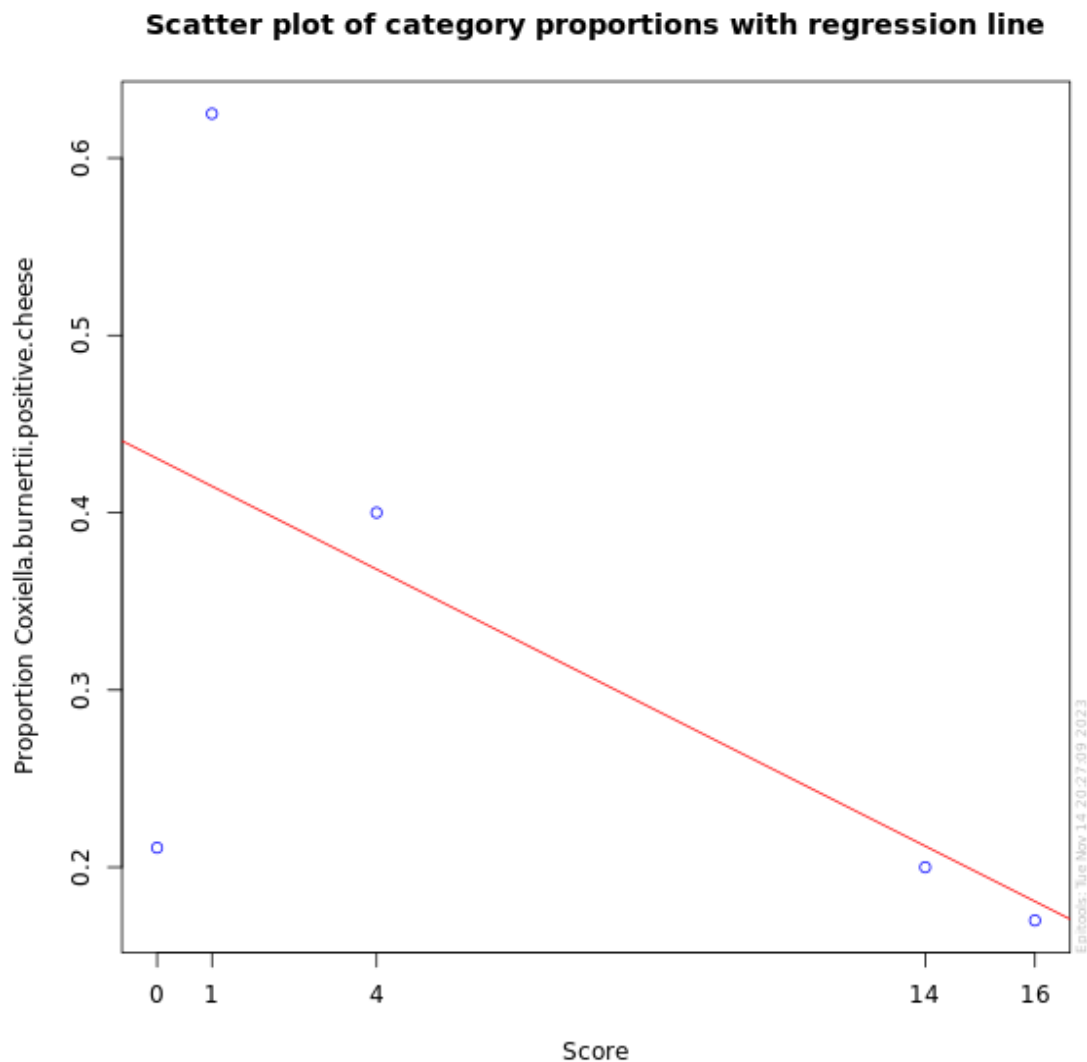
Variáveis	Total	Positivos (%)	P - valores ^a
Local de produção			
Piauí	19	4 (21.05)	0.04

Cerrado	8	5 (62.50)	
Canastra	15	6 (40.00)	
Triângulo Mineiro	5	1 (20.00)	
Serro	53	9 (17.00)	
Coliformes totais (CFU) ^b			0.40
10 a 4000	58	16 (27.60)	
5900 a 2500000	23	5 (21.70)	
Coliformes fecais (CFU) ^b			0.53
10 a 500	64	17 (26.60)	
730 a 170000	17	4 (23.50)	
<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva (CFU) ^b			0.12
10 a 10 ³	49	16 (32.65)	
>10 ³	32	5 (15.63)	
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativo (CFU) ^b			0.10
0 a 10 ³	14	1 (7.14)	
>10 ³	67	20 (29.85)	
Adenovírus humano			0.75
No	83	20 (24.10)	
Yes	17	5 (29.41)	
Norovírus humano			>0.99
No	72	18 (25.00)	
Yes	28	7 (25.00)	
Época de chuvas ^b			>0.99
No	36	9 (25.00)	
Yes	64	16 (25.00)	
Período de maturação (dias) ^b 4 a 10			0.12
12 a 46	47	9 (19.10)	
	34	12 (35.30)	
Grau de umidade (%) ^{b,c}			0.12
20.39 a 45.89	44	15 (34.10)	
46.12 a 56.33	34	6 (17.60)	
pH ^{b,c}			0.61
4.00 a 4.88	39	9 (23.08)	
4.89 a 5.36	39	12 (30.77)	

^aTestes exatos de Fisher; ^b análises não realizadas nos queijos coalho, Piauí; ^c análise não realizadas em todas as amostras de QMA.

Figura 2. Tendências lineares decrescentes das taxas de queijo artesanais de leite cru positivos para *Coxiella burnetii* por tempo (anos) de registro no órgão de defesa. A região de Parnaíba, Piauí, que ainda não é registrada, teve este tempo considerado como zero. Inclinação = -0,011 (p = 0,053), Qui-quadrado de Pearson = 9,84 (valor de p = 0,04). Os escores 0, 1, 4, 14 e 16 corresponderam aos tempos de registro (anos) como produtor de queijo artesanal de leite cru

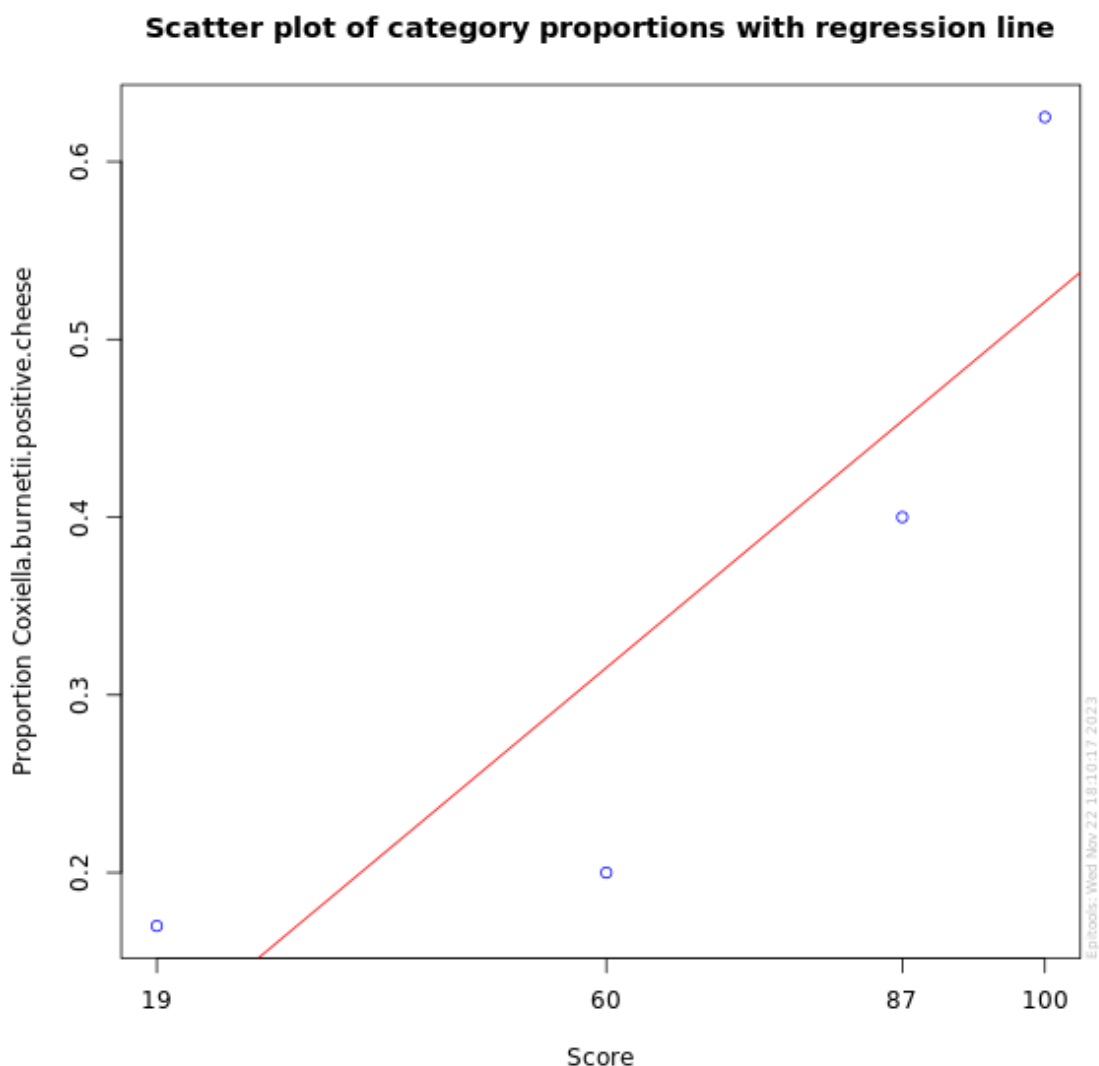
junto ao órgão oficial de fiscalização nas regiões de Parnaíba, Cerrado, Triângulo Mineiro, Canastra e Serro, respectivamente, Brasil, 2018.



Também foi observada uma tendência linear crescente de QMAS positivos para *C. burnetii* diretamente associada às proporções de queijos com maturação acima da mediana de 10 dias (Inclinação= 0,0042, $p = 0,0044$) (Figura 3).

Figura 3. Tendências lineares diretas entre taxas de queijos Minas artesanal positivos para *Coxiella burnetii* e escores de maturação acima da mediana de 10 dias, inclinação = 0,0042 ($p = 0,0044$). Os escores 19, 60, 87 e 100 correspondem aos percentuais de queijos com tempo de maturação acima da

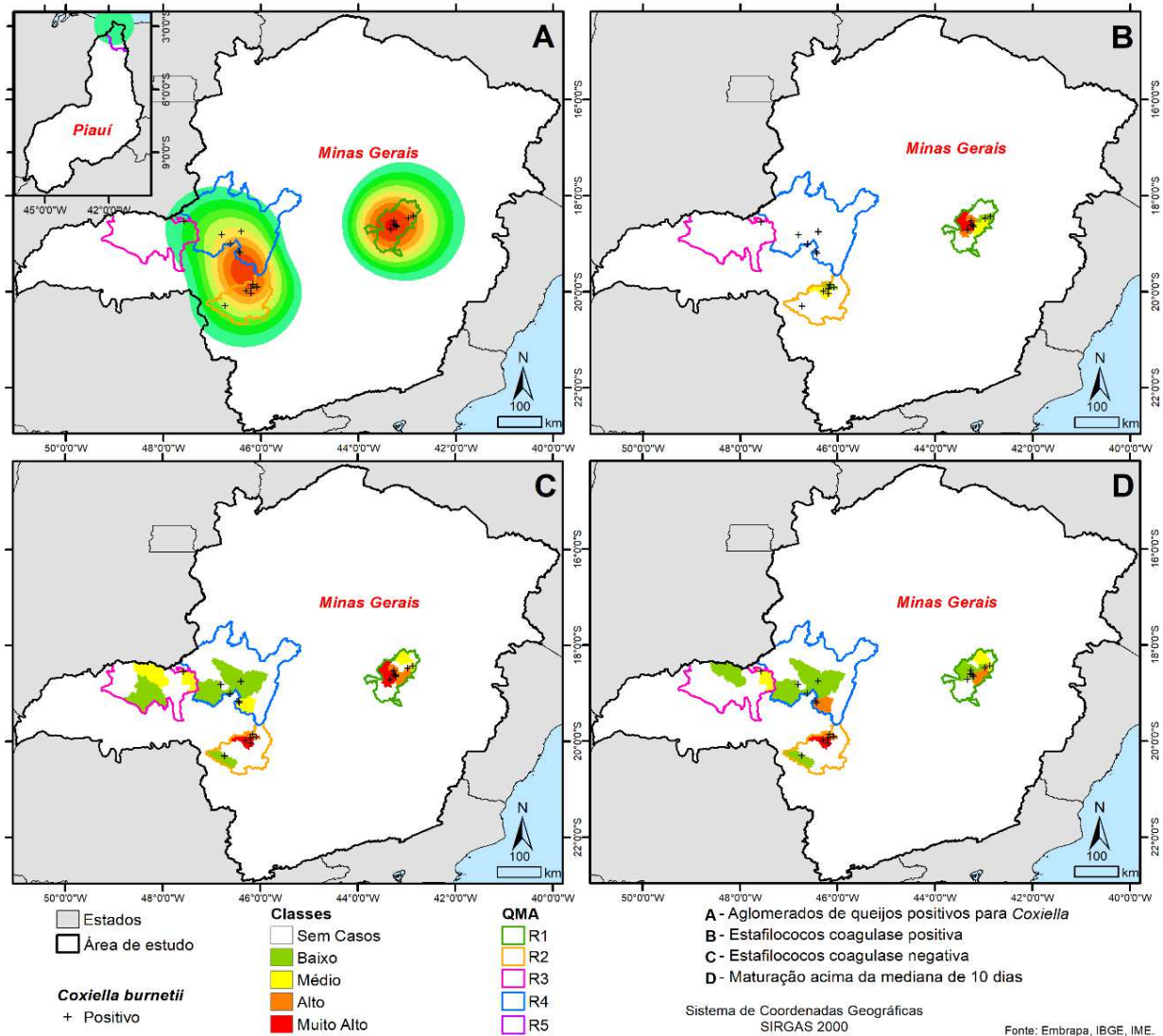
mediana nas microrregiões do Serro, Triângulo Mineiro, Canastra e Cerrado, respectivamente, Minas Gerais, Brasil, 2018.



A análise EDK revelou um agrupamento de alta densidade de ARFPQ com QMA positivos para *C. burnetii* localizados em R1, que se sobrepôs a agrupamentos de queijos com contagens mais altas de ECP e ECN; e outro aglomerado localizado em R2, que por sua vez se sobrepôs a queijos com maiores contagens de ECN e com maturação acima da mediana de 10 dias (Figura 4).

Figura 4. (A) Aplicação da estimativa de densidade de kernel (EDK) para queijos artesanais de leite cru positivos para *Coxiella burnetii* em agroindústrias rurais familiares de processamento de queijo em quatro regiões produtoras de queijo

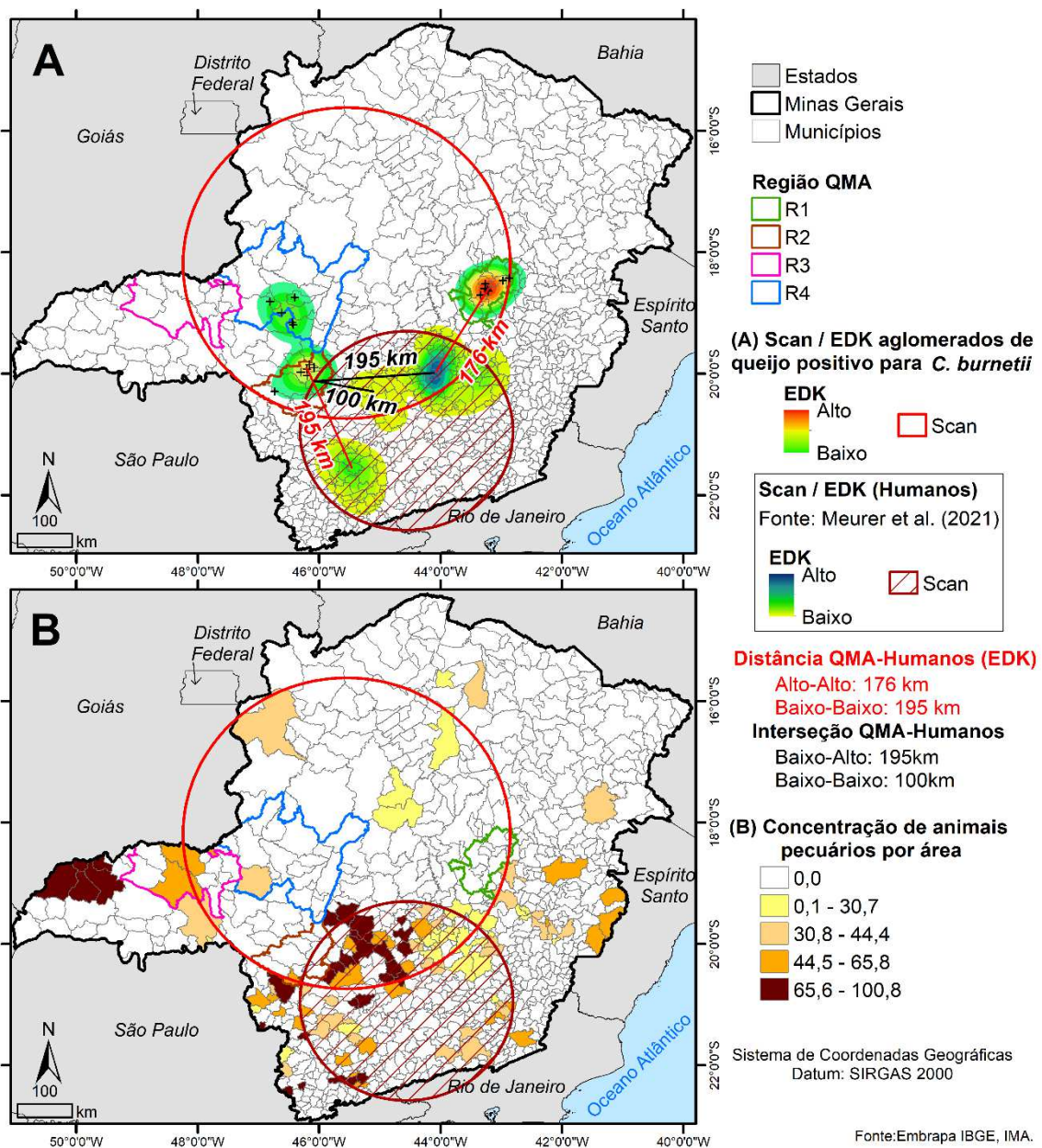
Minas artesanal (QMA), Minas Gerais, e uma região produtora de queijo artesanal de Coalho, Piauí, Brasil, 2018. Mapas coropléticos das distribuições de queijos Minas artesanais (QMA) (B) com maior contagem de *Estafilococos* coagulase positiva, (C) com maior contagem de *Estafilococos* coagulase negativa e (D) com maturação acima da mediana de 10 dias, Minas Gerais, Brasil, 2018.



No estado de MG, os aglomerados de alta e baixa densidades de QMAs positivos para *C. burnetii* apresentaram distâncias de 176 km e 195 km dos aglomerados de exposições humanas a *C. burnetii*, respectivamente. As duas áreas identificadas pelo Scan para resultados positivos de *C. burnetii* tanto em QMA quanto em seres humanos foram ambas significativas ($p < 0,0001$) e

mostraram uma interseção. Nesta interseção foi localizado um aglomerado EDK de alta densidade de exposições humanas a *C. burnetii* e uma parte de um aglomerado EDK de baixa densidade para QMAs positivos para *C. burnetii*, distantes entre si 195 Km (Figura 5A). Além disso, a área de interseção (Scan) apresentou sobreposição com áreas de maior concentração de animais pecuários por área (Figura 5B).

Figura 5. (A) Aglomerados por estimativa de densidade de kernel (KDE) e Scan de queijos Minas artesanais (QMA) positivos para *Coxiella burnetii*, de exposições humanas a *C. burnetii*, e (B) concentração de animais pecuários por área, Minas Gerais, Brasil, 2018.



4. Discussão

Este estudo encontrou um quarto dos queijos com DNA de *C. burnetii* e esta positividade mostrou heterogeneidade entre as regiões estudadas, embora todas tivessem alguma ARFPQ com queijo contaminado.

Até onde sabemos, nossa equipe foi a primeira a detectar *C. burnetii* em QALC no Brasil (Rozental et al., 2020), e ainda existem poucos estudos, dois de nosso conhecimento, que avaliaram a presença de *C. burnetii* em QALC no Brasil (Rozental et al., 2020; Nascimento et al., 2021). A frequência de QALC positivo para *C. burnetii* encontrada neste estudo foi superior às duas pesquisas existentes no Brasil, que encontraram 9,4% em queijos do Serro (Rozental et al., 2020) e 4,6% no Cerrado (Nascimento et al., 2021). Também foi superior aos 7,8% encontrados em queijos de leite cru do sul da Itália (Basanisi et al., 2022). Além disso, esta frequência foi tão elevada como a encontrada em inquéritos sobre queijo de leite cru em países como Espanha e Itália, que mostraram 17,2% e 21,3% em Itália, e 29,9% em Espanha (Capuano et al., 2012; Galieiro et al., 2016; Barandika et al., 2019) e inferior aos 65% encontrados em queijos franceses (Eldin et al., 2013).

Diferentemente de outro trabalho brasileiro (Nascimento et al., 2021), o presente estudo analisou o patógeno também em queijos já registrados e fiscalizados por órgãos oficiais, utilizando uma amostra maior, com maior representação espacial e coletada diretamente nas ARFPQs ao invés de pontos de vendas, para permitir rastreabilidade, monitoramento e controles futuros. Até onde sabemos, este é o maior levantamento nacional de *C. burnetii* em QALC, tanto em termos de tamanho da amostra quanto de representatividade espacial. Mesmo assim, pesquisas sobre esse patógeno ainda continuam sendo amplamente escassas no Brasil, em animais, alimentos e seres humanos, embora a febre Q seja considerada uma das dez zoonoses mais importantes do mundo e responsável por mais de 30% dos casos de pneumonia adquirida na comunidade na Guiana Francesa, um país cuja fronteira com o estado do Amapá alerta para a sua ocorrência na região amazônica (Epelboin et al., 2021).

A principal via de transmissão de *C. burnetii* aos seres humanos é via aerossóis contaminados. A infecção oral humana pelo consumo de leite não pasteurizado e produtos lácteos ainda não é completamente compreendida, embora um estudo de avaliação de risco tenha concluído que a transmissão via consumo de leite não pasteurizado seria relativamente baixa em comparação com a rota aérea, mas não pode ser negligenciada (Gale et al., 2015). Além disso, evidências epidemiológicas da associação de surtos de febre Q com o consumo de produtos lácteos não pasteurizados foram relatadas em vários estudos (Fishbein e Raoult, 1992; Signs et al., 2012; Gale et al., 2015; Mungai et al., 2015). Uma das evidências mais fortes é um surto que afetou cinco consumidores de leite bovino cru contaminado oriundo de um mesmo laticínio (Signs et al., 2012); a tal ponto que os EUA já admitem esse patógeno como um dos responsáveis por um (1,28%) dos 78 surtos de doenças associadas ao consumo de leite cru e derivados que tiveram um único patógeno envolvido, no período 2007-2012 (Mungai et al., 2015).

Como um fortalecimento das evidências epidemiológicas, estudos experimentais de infecção em modelos animais apoiam a via oral como um modo de transmissão de *C. burnetii*. Miller et al. (2020), descobriram que camundongos infectados com *C. burnetii* apresentaram esplenomegalia notável após a infecção, uma resposta imune robusta e persistência no estômago e nos gânglios linfáticos mesentéricos, e disseminação de *C. burnetii* para tecidos periféricos observada em todos os camundongos infectados.

O presente estudo mostra que a cadeia produtiva do QALC é vulnerável a contaminações por *C. burnetii*. Estudos mostram que os ruminantes são os principais reservatórios de *C. burnetii*, eliminando a bactéria por meio de produtos de nascimento e/ou aborto, leite, urina e fezes. Em bovinos, a principal via de excreção do patógeno é o leite, e essa bactéria permanece nos gânglios linfáticos e na glândula mamária, podendo ser eliminada por vários meses a anos (Gale et al., 2015; Barlozzari et al., 2020; Espí et al., 2021). Assim, Capuano et al. (2012) e Eldin et al. (2013) encontraram maiores taxas de positividade em queijo de leite bovino do que em outras espécies. Como *C. burnetii* é uma bactéria intracelular obrigatória, sua multiplicação não ocorre em leite e queijo (Gale et al., 2015). Porém, o seu ciclo de vida, passa por duas fases, a variante

de células grandes e a variante de células pequenas. Esta última é altamente resistente ao estresse físico e químico, e permite que o patógeno sobreviva por meses em diferentes tipos de matrizes e no ambiente (Eldin et al., 2017).

Este estudo mostrou que parte das amostras de QALC de todas as cinco regiões tradicionais produtoras analisadas apresentaram DNA de *C. burnetii*. Além de *C. burnetii*, as amostras de QMA também foram analisadas simultaneamente para outros patógenos e contaminantes apresentando 28%, 20%, 40% e mais de 80% com identificação de altas contagens de coliformes totais, coliformes fecais, ECP e ECN, respectivamente, fato que comprova falhas nos padrões microbiológicos estabelecidos. Além disso, 18% e 28% dos QALC analisados neste estudo também foram positivos para o adenovírus humano, que é um indicador de contaminação fecal humana em alimentos, e para o norovírus humano, um dos patógenos virais mais envolvidos em surtos de origem alimentar humana no mundo (Silva et al., 2021).

Além disso, em estudo anterior realizado sobre MAC produzido na região do Serro, o gênero *Brucella* foi detectado por PCR, sendo a espécie *B. abortus* recuperada em estado viável por cultivo em uma das amostras analisadas (Silva et al., 2022). Finalmente, nossas amostras de QMA foram uma subamostra de um estudo maior que constatou que 18,7%, 14,1% e 25,0% das amostras, respectivamente, não estavam em conformidade com a legislação para coliformes a 35°C, *Escherichia coli* e ECP (Firmo et al., 2023). Os resultados de não conformidade verificados neste estudo sugerem falhas nos programas de controle e erradicação de doenças dos bovinos e deficiências nos procedimentos de higiene aplicados durante a cadeia produtiva do queijo artesanal, bem como falhas no manuseio humano e/ou no processo de armazenamento desses produtos, o que pode resultar em riscos potenciais para os consumidores. Essa hipótese é corroborada por dados do Ministério da Saúde brasileiro, de 2014 a 2023, em que leite e derivados ocuparam a quinta posição (6,7%) entre os principais alimentos implicados em surtos de doenças transmitidas por alimentos (Brasil, 2024).

Houve uma tendência de uma relação direta entre a positividade para *C. burnetii* e a positividade para ECN, além de sobreposição de aglomerados de

queijos positivos para ECN e *C. burnetii*, em uma das regiões produtoras de MG. Isto pode sugerir que a presença de *C. burnetii* em queijos está mais diretamente associada à contaminação ambiental e falhas de higiene, uma vez que os ECN são mais ubiqüitários e facilmente encontrados no solo, na água, nas plantas e na microbiota do trato intestinal, pele e mucosas de seres humanos e animais, podendo formar biofilmes que aumentam sua sobrevivência em superfícies (Phophi et al., 2019). Por outro lado, em outra região de MG ocorreu sobreposição de aglomerados de QALC positivos para *C. burnetii* tanto com a positividade de ECP como de ECN, o que sugere que a presença de *C. burnetii* na cadeia de produção dos queijos nesta microrregião pode estar tanto relacionada a questões de falhas na higiene (Phophi et al., 2019) como também a falhas no controle da mastite. ECP encontrados em leite e derivados são em parte um marcador de mastite, já que são a principal causa desta infecção em bovinos. Isto sugere que parte da eliminação de *C. burnetii* aconteceu em animais com infecção da glândula mamária, visto que a ocorrência de mastite aumenta a taxa de macrófagos infectados por *C. burnetii*, que são eliminados no leite (Barlow et al., 2008).

A sobreposição de aglomerados de QMAs positivos para *C. burnetii* com aqueles com as maiores contagens de ECP e ECN, reforça a hipótese de maiores ocorrências de contaminação por fonte única. Como os QMAs são produzidos a partir de um conjunto de leite obtido de uma única fazenda, os próprios rebanhos poderiam ser os principais reservatórios (Acha e Szyfres, 2001). Estes aglomerados devem ser priorizados para vigilância, controle e monitoramento por parte de quem faz políticas públicas nos sectores da agropecuária, saúde e ambiente.

A distribuição das frequências de QALC positivos para *C. burnetii* nas diferentes regiões foi heterogênea, com uma relação inversa entre as taxas de QALCs positivos e o tempo de registro no órgão oficial de vigilância. Ou seja, os queijos do Piauí, ainda não registrados, e a última região reconhecida pelo órgão de fiscalização de MG, o Cerrado, apresentaram maiores chances de contaminações por *C. burnetii* que a primeira região registrada, o Serro. Uma possível explicação pode estar associada a um maior período de assistência técnica oferecida pela Emater-MG, com maiores índices de cumprimento de

boas práticas agropecuárias (BPA) e de fabricação (BPF) por cada ARFPQ. Além disso, a preparação do QMA envolve profissionais com diferentes níveis de formação e capacidade de aplicação de BPAs e BPFs. As diferentes condições sanitárias durante o processo de produção, aliadas ao maior período de manipulação dos queijos e ao maior tempo de exposição em possível ambiente contaminado, podem justificar as maiores taxas de QMA positivos para *C. burnetii* entre aqueles com maiores períodos de maturação, como visto neste estudo.

O aglomerado com maior densidade de exposições humanas a *C. burnetii* foi encontrado na região central do estado, onde está localizada a região metropolitana de Belo Horizonte, representando o maior mercado consumidor de QMAs do estado de Minas Gerais, apesar de ser um mercado não tradicional na produção de QMA. Este agrupamento de alta densidade e uma parte de um agrupamento para QMAs positivos para *C. burnetii* se localizaram na interseção entre as duas áreas de aglomerados significativos por Scan, ou seja, de QMAs positivos para *C. burnetii* e de exposições humanas a *C. burnetii*, respectivamente. Isto sugere evidências epidemiológicas de possíveis relações entre casos humanos com consumo de QALC, que precisam ser elucidadas. Além disso, identificamos em estudo anterior que esse mesmo aglomerado de exposições humanas a *C. burnetii* teve associação significativa com residência rural e se sobrepôs a municípios com maior concentração por área de animais pecuários, reforçando a associação entre a ocorrência de exposições humanas com a possível ocorrência de coxielose em animais pecuários (Meurer et al., 2021). Adicionalmente, sugere-se que a presença de *C. burnetii* em QALC pode ser utilizada como um marcador para a rastreabilidade de RFCPAs positivos e respectivos rebanhos contaminados, e, conseqüentemente, para procurar exposições humanas ocupacionais a *C. burnetii*.

A comercialização dos queijos Minas e Coalho artesanais, além do aspecto cultural, está diretamente relacionada ao desenvolvimento socioeconômico dos territórios tradicionais de produção. Com a regulamentação do Selo Arte e do Selo Queijo Artesanal, por meio do Decreto Federal 11.099/2022, os QALC ganharam notável reconhecimento nacional, sendo

apreciados em diversos estados deste país (Brasil, 2022). No entanto, os resultados deste estudo e de outros anteriores desta equipe mostram que a qualidade microbiológica precisa ser melhorada para tornar os queijos mais seguros para os consumidores.

Um estudo mostrou que *C. burnetii* permaneceu viável por quase 9 meses de maturação em queijos duros, apesar do pH ácido e da baixa atividade de água alcançada, sendo a positividade revelada em camundongos infectados experimentalmente e sacrificados aos 14 e 21 dias após a inoculação (Barandika et al., 2019). Entretanto, observamos em nossa pesquisa in loco que o QMA foi vendido fresco (<60 dias), dentro de uma mediana de 4 dias de maturação (Rozenal et al., 2020; Silva et al., 2022), apesar de a legislação vigente exigir pelo menos 17 dias de maturação para queijos produzidos numa das microrregiões do Serro (Minas Gerais, 2021). Assim, esses queijos podem representar uma fonte potencial de exposição humana à *C. burnetii* e demandam estudos nacionais de avaliação da viabilidade de *C. burnetii* ao longo do período de maturação, especialmente porque derivados de leite cru possuem maiores concentrações desta bactéria ($P = 0,02$) do que aqueles de leite pasteurizado (Eldin et al., 2013). Entretanto, tal avaliação, que é uma perspectiva futura de nossa equipe, ainda não foi possível por se tratar de um patógeno que requer laboratórios com altos níveis de biossegurança para seu isolamento ou métodos indiretos mais sofisticados para uma avaliação presuntiva.

Entretanto, este estudo tem alguns aspectos que o fortalece que devem ser destacados. Para atingir nossos objetivos, os órgãos oficiais brasileiros de inspeção de alimentos e saúde animal (IMA e MAPA) e os setores de pesquisa agropecuária (EMBRAPA) estabeleceram parcerias de colaboração transdisciplinares e intersetoriais com os de pesquisa em saúde pública (FIOCRUZ), os de vigilância em saúde (FUNED e Instituto Evandro Chagas) e os de educação (UFJF). Com essa estratégia, foi possível agregar a melhor infraestrutura laboratorial com experiência de pesquisa em *C. burnetii* no Brasil, com setores de vigilância em saúde humana e animal, de forma a reduzir as lacunas existentes e pesquisar esse patógeno na perspectiva de saúde única e apoiar políticas públicas relacionadas de forma mais abrangente.

5. Conclusão

Encontramos uma alta frequência de QALC contaminados por *C. burnetii* no presente estudo. Por se tratar de um produto elaborado a partir de leite cru, maiores são os desafios sanitários na aquisição de matérias-primas e no preparo de um produto que seja inócuo aos consumidores.

Além disso, a análise geoestatística mostrou possíveis ligações de um aglomerado de alta densidade de população humana exposta a *C. burnetii* em MG, Brasil, tanto com aglomerados de QMAs positivos para *C. burnetii* produzidos no mesmo estado deste país, bem como de altas concentrações de animais pecuários. Assim, são necessários mais estudos sobre *C. burnetii*, como a genotipagem de amostras circulantes em animais, alimentos e seres humanos, para fortalecer as relações de causa-efeito entre pecuária, positividade em queijos e casos humanos.

Diante dos resultados apresentados de baixa segurança dos QALC, mas dada a sua importância socioeconômica nesses estados do Brasil, concluímos sobre a necessidade de desenvolver e propor ações específicas de educação em saúde, voltadas ao preparo e consumo de derivados do leite cru, fortalecidas por estratégias integradas de vigilância, controle e prevenção que abranjam os domínios da saúde humana, animal e ambiental, com uma abordagem de saúde única.

6. Referências

- Acha, P. N., Szyfres, B., 2001. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales, second ed 1986. Organización Panamericana de la Salud, Washington.
- Basanisi, M.G., La Bella, G., Nobili, G., Raele, D. A., Cafiero, M. A., Coppola, R., Damato, A. M., Fracalvieri, R., Sottili, R., La Salandra, G., 2022. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in sheep and goat milk and dairy products by droplet digital PCR in south Italy. *Int J Food Microbiol.* 366, 109583.
- Brandão, H., Valle, L. A. R., Christóvão, D. A., 1953. Investigações sobre a febre Q em São Paulo. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. *Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo.* 7, 127-131.
- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S., Dubovi, E., Schukken, Y., 2008. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet Res.* 39, 23.
- Barandika, J. F., Alvarez-Alonso, R., Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A. L., 2019. Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk. *Int J Food Microbiol.* 303, 42-45.
- Barlozzari, G., Sala, M., Lacoconi, F., Volpi, C., Polinori, N., Rombolà, P., Vairo, F., Macri, G., Scarpulla, M., 2020. Cross-sectional serosurvey of *Coxiella burnetii* in healthy cattle and sheep from extensive grazing system in central Italy. *Epidemiol Infect.* 148, e9.
- Brasil, 2019. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019 - Queijos artesanais. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização e regulamentação de queijos artesanais e queijarias produtoras desses produtos artesanais. Available from <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte-selo-queijo-artesanal/legislacao/lei-no-13-860-de-18-de-julho-de-2019.pdf/view>
- Brasil, 2017. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem

animal. Available from <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/mpa/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/decreto-no-9-013-de-29-03-2017.pdf/view>

Brasil, 2022. Decreto nº 11.099, de 21 de Junho de 2022. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Available from http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2022/decreto/D11099.htm#:~:text=DECRETO%20N%C2%BA%2011.099%2C%20DE%2021,animal%20produzidos%20de%20forma%20artesanal.

Brasil, 2024. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe – 2024. Available from <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024>

Capuano, F., Mancusi, A., Casalnuovo, F., Perugini, A., Proroga, Y., Guarino, A., Berri, M., 2012. Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in cheeses. Eur Food Res Technol. 235, 1181-1186.

Darwish, S. F., Allam, H. A., Amin, A. S., 2009. Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. World Appl Sci J. 7, 461-467.

Eldin, C., Angelakis, E., Renvoisé, A., Raoult, D., 2013. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. Am J Trop Med Hyg. 88, 765-769.

Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J. L., Maurin, M., Raoult, D., 2017. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. Clin microbiol Rev. 30, 115-190.

Epelboin, L., Eldin, C., Thill, P., de Santi, V. P., Abboud, P., Walter, G., Melzani, A., Letertre-Gibert, P., Perez, L., Demar, M., Boutrou, M., Fernandes, J., Cermeño, J. R., Panizo, M. M., Vreden, S. G., Djossou, F., Beillard, E., de Waard,

J. H., Lemos, E. R. S., 2021. Human Q Fever on the Guiana Shield and Brazil: Recent Findings and Remaining Questions. *Curr Trop Med Rep.* 8, 173-182.

Espí, A., Cerro, A., Oleaga, Á., Rodríguez-Pérez, M., López, C. M., Hurtado, A., Rodríguez-Martínez, L. D., Barandika, J. F., García-Pérez, A.L., 2021. One Health approach: an overview of q fever in livestock, wildlife and humans in asturias (northwestern Spain). *Animals.* 11, 1395.

Fishbein, D.B., Raoult., D., 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg.* 47, 35–40.

Firmo, M. J. N., Menezes, L. D. M., de Assis Sales, G., de Carvalho, A. F., de Leon, N. M. E. P., Júnior, B. R. D. C. L., Martins, M. L., 2023. Diagnosis of the microbiological quality of fiscal artisanal Minas cheese samples. *Food Control.* 153, 109887.

Gale, P., Kelly, L., Mearns, R., Duggan, J., Snary, E. L., 2015. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. *J Appl Microbiol.* 118, 1083–1095.

Galieiro, A., Frantini, F., Domenico, M. D., Curini, V., Baronti, I., Turchi, B., Cerii, D., 2016. Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: screening and genotyping. *Int J Food Microbiol.* 237, 47-54.

Lemos, E. R. S., Rozental, T., Mares-Guia, M. A., Almeida, D. N. P., Moreira, N., Silva, R. G., Barreira, J. D., Lamas, C. C., Favacho, A. R., Damasco, P. V., 2011. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 85-87.

Lemos, E. R. S., Rozental, T., Siqueira, B. N., Júnior, A. A. P., Joaquim, T. E., da Silva, R. G., Leite, C. A., Arantes, A. A., da Cunha, M. F., Borghi, D. P., 2018. Q fever in military firefighters during cadet training in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 99, 303-305.

Mares-Guia, M. A. M. M., Rozental, T., Guterres, A., Gomes, R., Almeida, D. N., Moreira, N. S., Barreira, J. D., Favacho, A. R., Santana, A. L., Lemos, E. R. S.,

2014. Molecular identification of the agent of Q fever- *Coxiella burnetii* – in domestic animals in state of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bra de Med Tropical. 47, 231-234.

Mungai, E. A., Behraves, C. B., Gould, L. H., 2015. Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007-2012. Emerg Infect Dis. 21, 119-122.

Mares-Guia, M. A., Rozental, T., Guterres, A., Ferreira, M. S., Botticini, R. G., Terra, A. K., Marraschi, S., Bochner, R., Lemos, E. R. S., 2016. Molecular identification of Q fever in patients with a suspected diagnosis of dengue in Brazil in 2013-2014. Am J Trop Med Hyg. 94, 1090-1094.

Mares-Guia, M. A. M. M., Guterres, A., Rozental, T., Ferreira, M. D. S., Lemos, E. R. S., 2018. Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. Braz J Microbiol. 49,138–143.

Mioni, M. D. S. R., Ribeiro, B. L. D., Peres, M. G., Teixeira, W. S. R., Pelícia, V. C., Motta, R. G., Labruna, M. B., Ribeiro, M. G., Sidi-Boumedine, K., Megid, J., 2019. Real-time quantitative PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's milk sold for human consumption. Zoonoses Public Health. 66, 695–700.

Miller, H. K., Priestley, R. A., Kersh, G. J., 2020. Transmission of *Coxiella burnetii* by ingestion in mice. Epidemiol Infect. 148, e21.

Minas Gerais. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria IMA nº 2051, de 07 de abril de 2021. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Available from <http://ima.mg.gov.br/institucional/portarias/1819-portarias/1966-portarias-ano-2021>

Meurer, I. R., Silva, M. R., Silva, M. V. F., de Lima Duré, A. Í., Adelino, T. É. R., da Costa, A. V. B., Vanelli, C. P., Paula Souza, E., Guimarães, R. J., Rozental, T., Lemos, E. R. S., Corrêa, J.O. D. A., 2021. Seroprevalence estimate and risk

factors for *Coxiella burnetii* infections among humans in a highly urbanised Brazilian state. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 116, 261-269.

Nascimento, C. F., de Mello, V. V. C., Machado, R. Z., André, M. R., Bürger, K. P., 2021. Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in Unstandardized Minas Artisanal Cheese Marketed in Southeastern Brazil. *Acta Trop.* 220, 105942.

Oliveira, J. M. B., Rozental, T., Lemos, E. R. S., Forneas, D., Ortega-Mora, L. M., Porto, W. J. N., Oliveira, A. A. F., Mota, R. A., 2018. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. *Acta Trop.* 183, 19-22.

Phophi, L., Petzer, I. M., Qekwana, D.N., 2019. Antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from subclinical mastitis cow milk samples submitted to the Onderstepoort Milk Laboratory. *BMC Vet Res.* 15, 420.

Rozental, T., Faria, L. S. D., Forneas, D., Guterres, A., Ribeiro, J. B., Araújo, F. R., Lemos, E. R. S., Silva, M. R., 2020. First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. *Braz J Infect Dis.* 24, 208-212.

Signs, K. A., Stobierski, M. G., Gandhi, T. N., 2012. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011. *Clin Infect Dis.* 55, 1387–1389.

Silva, C.L.; Sales, G.A.; Santos Neto, J.G.; Silva, J.S.; de Lara, A.P.S.S.; Nunes, E.S.L.; Moraes, C.C.G.; Roos, T.B.; Moraes, C.M., 2015. Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 74, 21–29.

Siciliano, R. F., Castelli, J. B., Mansur, A. J., Santos, F. P., Colombo, S., Nascimento, E. M., Paddock, C. D., Brasil, R. A., Velho, P. E., Drummond, M. R., Grinberg. M., Strabelli, T. M., 2015. Bartonella spp. and *Coxiella burnetii* associated with community-acquired, culture-negative endocarditis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21, 1429-1432.

Souza, E. A. R., Castro, E. M. S., Oliveira, G. M. B., Azevedo, S. S., Peixoto, R. D. M., Labruna, M. B., Horta, M. C., 2018. Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep from the semi-arid region of northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 27 514-520.

Silva, M. R., Ferreira, F. C., Maranhão, A. G., Lanzarini, N. M., Carvalho Castro, K. N., Miagostovich, M. P., 2021. Assessment of viral contamination of five Brazilian artisanal cheese produced from raw milk: a randomized survey. *Food Environ Virol.* 13, 528-534.

Silva, M. R., Duch, A. A. S., Lage, R. T. P. D. A., de Faria, L. S., Menezes, L. D. M., Ribeiro, J. B., de Souza, G. N., Filho, P. M. S., Preis, I. S., Sales, E. B., de Souza, P. G., Araújo, F. R., Guimarães, R. J. P. S., Mendes, T., Pettan-Brewer, C., Fonseca-Junior, A.A., 2022. Recovery of *Brucella* in raw milk Minas artisanal cheese approved for consumption by official inspection agency in Brazil: assessment of prevalence and risk factors through One Health integrated approaches. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 116, 1091-1099.

***Coxiella burnetii* in Minas and Coalho raw milk artisanal cheese and possible spatial associations with human exposures in Brazil: a robust cross-sectional study ***

André Almeida Santos Duch^{a,1}, Vitória Barbosa Conceição^{b,1}, Jorlan Fernandes de Jesus^c, Danielle da Silva Forneas^c, Dominique Elvira de Souza Freitas^c, Henrique Oliveira Frank^d, Jonathan Gonçalves Oliveira^c, Karina Neob de Carvalho Castro^d, Ricardo José de Paula Souza e Guimarães^e, Igor Rosa Meurer^b, José Otávio do Amaral Corrêa^b, João Batista Ribeiro^{b,d}, Liliane Denize Miranda Menezes^a, Tatiana Rozental^c, Marcio Roberto Silva^{b,d,1}, Elba Regina Sampaio de Lemos^{c,1}.

^a Minas Gerais Agriculture and Livestock Institute, 31630-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Federal University of Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^c Oswaldo Cruz Institute, 21040-360, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Embrapa Dairy Cattle, 36038-330, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^e Evandro Chagas Institute, 67030-000, Ananindeua, Pará, Brazil

*Corresponding authors. erslemos@gmail.com (E.R. Lemos), Laboratório de Hantavíroses e Rickettsioses. Instituto Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, 21040-360

marcio-roberto.silva@embrapa.br (M.R.Silva), Embrapa Gado de Leite. Av. Eugênio do Nascimento 610 – Aeroporto, Juiz de Fora, MG, 36038-330

¹ Contributed equally as first authors.

ABSTRACT

Q fever is a zoonotic disease with worldwide distribution, caused by *Coxiella burnetii*, which infects a wide variety of vertebrates and invertebrates animals including human beings, with domestic ruminants considered its main natural reservoirs. Human infection occurs mainly via aerogenic, with the ingestion of raw milk being a less common, but not negligible, route. The aim was to carry out a randomized survey to evaluate the frequency of *C. burnetii* positive-raw milk artisanal cheese (RMAC) in five traditional Brazilian microregions, as well as evaluating the associated factors. Additionally, to analyze the relationships between spatial clusters of *C. burnetii* positive-RMAC and those of human exposures and concentration of livestock, as well as clusters of other cheese characteristics such as ripening time and results of other microbiological analyses. During the period from October/2017 to April/2018, 100 RMAC samples were collected from different rural family-based cheese-processing agroindustries (RFCPA) in four and one regions from the states of Minas Gerais and Piauí, respectively. DNA from fractionated RMAC samples was extracted using the traditional phenol-chloroform-isoamyl alcohol method. PCR was performed using specific oligonucleotides for the IS1111 gene. Possible associations of descriptive variables with *C. burnetii* positive-RMAC, and spatial analyzes for either RFCPA with positive RMAC, human exposures to this pathogen and livestock concentrations were also evaluated. The partial fragment of the *C. burnetii* IS1111 gene was detected and sequenced in 25 RMAC samples (25.0%; 95% CI 16.8%-34.6%), verifying a heterogeneity in the rates of positive cheeses between the five regions analyzed ($p = 0.04$). The rates of *C. burnetii* positive-RMAC showed direct and inverse linear relationships with the rates of cheese with ripening times above the median (10 days) (Slope = 0.0042, $p = 0.0044$) and the lapse since registration with the official surveillance body (Slope = -0.011, $p = 0.053$), respectively. Possible links between a high-density cluster of human population exposed to *C. burnetii* in MG, Brazil, and both clusters, *C. burnetii* positive-MAC, and high concentrations of livestock animals, were found. This study shows that *C. burnetii* positive-RMAC may represent risks for the consumer of these products, emphasizing the need for good agricultural and manufacturing practices, and for RMAC quality control systems. As a randomized

survey, we established baseline data on the *C. burnetii* frequencies in two types of ready-to-eat Brazilian RMAC, in order to allow monitoring of temporal and spatial trends, establishment of control targets and future local risk analysis studies.

Key words: Q fever; Minas artisanal cheese; Coalho artisanal cheese; Nested PCR; Zoonosis; One health.

1. Introduction

Q fever is a zoonotic disease with worldwide distribution, caused by *Coxiella burnetii*, an intracellular Gram-negative bacterium, first described in Australia in 1937 and later in various regions of the world (Mares-Guia et al., 2014; Lemos et al., 2018). In Brazil, the first serological evidence of Q fever in humans was in 1953 (Brandão et al., 1953). This disease is considered immediate notification in a confirmed animal case but has ceased to have mandatory notification for humans in the last decade in this country. However, an increasing number of human cases has been observed predominantly in the states of the Southeast region in Brazil (Lemos et al., 2011; 2018; Epelboin et al. 2021). In this context, in addition to the underreporting of cases in the majority of the national territory, and the difficulty in recognizing the disease by physicians and veterinarians, few studies related to the identification and characterization of *C. burnetii* in humans, animals and the environment have been developed (Lemos et al., 2011; 2018; Mares -Guias et al., 2014; 2016).

In addition to being a highly resistant agent, due to its spore-like form, this proteobacterium can resist in the environment for a long period under adverse conditions, with high infective power. Some studies indicate that only a single inhaled bacterium has the potential to trigger disease in humans. Due to these characteristics, *C. burnetii* is considered a biosafety class 3 agent belonging to bioterrorism category B (Epelboin et al., 2021).

C. burnetii has a worldwide distribution and infects a wide variety of vertebrates and invertebrates' animals. Domestic ruminants are considered its main natural reservoirs as they release large amounts of the agent into the environment in the postpartum period, through placental remains and fetal fluids, but also through milk, feces and urine (Barandika et al., 2019; Epelboin et al., 2021; Mares-Guia et al., 2014). The excretion of *C. burnetii* in milk remains active throughout the lactation period, however the magnitude of the risk of human contamination with the ingestion of raw milk is not yet fully established, although it is a possible source (Barandika et al., 2019). This is reinforced by strong epidemiological evidence associating Q fever outbreaks with consumption of

unpasteurized milk and dairy products (Fishbein and Raoult, 1992; Sings et al., 2012).

Minas artisanal (MAC) and Coalho artisanal are traditional kinds of cheese from the state of Minas Gerais, the Southeast region and the Northeast region of Brazil, respectively. These are associated with the sociocultural identity of the producing regions, representing a large part of the income of small producers, and both are produced with raw milk. These kinds of cheese were already intensely consumed clandestinely, even before there were laws that formalized their consumption, such as Brazilian Law 13.860/2019 (Brazil, 2019), which allows different types of RMAC with different maturation times. However, there is still a lot of uncertainty about the likely microbiological risks of these foods, such as *C. burnetii*, *Brucella*, *Mycobacterium bovis*, etc., for the consumer, even though produced following Federal Decree 9.013/2017 (Brazil, 2017), which determines a minimum maturation of 60 days.

Despite the scarcity of information on the incidence of Q fever in our territory, studies have shown evidence of the circulation of *C. burnetii* in humans (Siciliano et al., 2015; Mares-Guias et al., 2016; Lemos et al., 2011, 2018), animals (Mares-Guias et al., 2014; Oliveira et al., 2018; Souza et al., 2018), raw milk (Mioni et al., 2019) and raw milk cheese (Rozenal et al., 2020). Faced with a scenario of little information, the fragility of regulations regarding the sanitary control of cheeses made from raw milk, and the possibility of transmission of *C. burnetii* during production and through ingestion of these foods, a study, developed by the Minas Gerais Agriculture and Livestock Institute (IMA), Embrapa Dairy Cattle and Fiocruz, demonstrated the presence of this bacterium in almost 10% of MAC samples analyzed for the first time in Brazil (Rozenal et al., 2020). Later, another study using the same methodology also demonstrated the positivity of this pathogen in MAC from other region of the same state of Brazil (Nascimento et al., 2021).

The present study aims to assess the prevalence of *C. burnetii* in two types of Brazilian artisanal cheese, Minas, from four main producing regions of Minas Gerais, and Coalho, from Parnaíba municipality, state of Piauí. Additionally, it seeks to analyze the relationships between spatial clusters of *C. burnetii* positive-

RMAC and those of human exposures and livestock concentrations, as well as those of other cheese characteristics such as ripening time and results of other microbiological analyses. This will assist with scientific bases the monitoring and control measures and the construction of standards related to RMAC to support official surveillance bodies, whether in the agricultural, health, or environmental sectors.

2. Materials and Methods

2.1. Design, study location, and sample planning

This is a study to evaluate the frequency and factors associated with *C. burnetii* in 100 RMAC samples produced in four regions of Minas Gerais – MG (n = 81) and in the region of Parnaíba, Piauí – PI (n = 19), both states in Brazil, collected from October 2017 to April 2018. The 100 samples were obtained from 100 rural family-based cheese-processing agroindustries (RFPCAs), with the inclusion criteria being that they were manufacturers of RMAC produced from a set of single farm milk.

The regions of MG – Serro, Canastra, Triângulo Mineiro and Cerrado –, received in this study the identification codes R1, R2, R3 and R4 respectively, according to the order of registration with the official surveillance body of each state. It is noteworthy that the RFPCAs from the Parnaíba region, the state of Piauí, under registration code R5, did not yet have a registration, and was considered zero registration time.

From a list of 235 RFPCAs in five traditional producing regions in Brazil, Canastra, Serro, Cerrado, Triângulo Mineiro and Parnaíba, the target population sample to estimate the frequency of *C. burnetii* positive -RMAC was determined by random draw of 100 (42.5%) samples. The sample was chosen using the Randbetween function (Microsoft Excel). A whole cheese was collected from each RFPCA to represent it, as each one produces cheese from a set of single-farm milk. Thus, the sample size was based on a finite population of 235, margin of error of 7.5%, confidence level of 95% and expected proportion of 50% of *C. burnetii* positive-RMAC.

2.2. Data and sample collection

Cheese producers were interviewed using a structured questionnaire organized by content group, focusing on socioeconomic characteristics, animal health, Good Agricultural Practices (GAP) and Good Manufacturing Practices (GMP). The cheese samples were collected in their packaging and kept in isothermal boxes under refrigeration (-4 °C) with recyclable ice during transport to the laboratory for analysis.

Two sets of RMAC data were obtained to evaluate possible associations with *C. burnetii* positive-cheese. First, only for MAC, bacterial analysis, moisture levels (%) and ripening period (below and above the median of 10 days). Furthermore, we used data from a previous survey of human exposures to the same pathogen carried out in MG in the same period as this study, also by our team (Meurer et al., 2021), which included spatial cluster analyses of both human exposures and concentrations of livestock animals, to now explore possible spatial overlaps of these clusters with those of *C. burnetii* positive-MAC. Second, for all cheese types, we also used viral analysis data obtained from the same cheese samples by a previous study of our team, to evaluate possible associations with *C. burnetii* positive-RMAC (Silva et al., 2021).

2.3. DNA extraction

The cheese samples were divided into portions of less than 100 g, placed in sterile bags for solid or liquid samples (INLAB, São Luís, Brazil), sealed, identified, and homogenized.

DNA extraction was carried out from 0.5 g of each cheese using the traditional phenol-chloroform-isoamyl alcohol method, according to the protocol by Darwish et al. (2009), with some modifications. Specifically, at the beginning of the protocol there were some modifications in volumes, 1100 µL of lysis buffer (10 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 and 0.5% SDS) and 10 µL of proteinase K (20 mg /mL) (Silva et al., 2015). For DNA precipitation, 3 times the volume of chilled absolute ethanol was added.

2.4. Nested PCR

Nested PCR-amplified bacterial DNA was detected with *C. burnetii*-specific primers designed to amplify the IS1111 gene, derived from a transposon-like repeated region of this pathogen's genome, using the same primers, controls, and conditions as a nested PCR (Mares-Guia et al., 2018), which was previously validated in artificially and naturally contaminated Minas artisanal cheese (Rozenal et al., 2020). The primer set and conditions are presented in Table 1.

Table 1. Primers and conditions used to detect *Coxiella burnetii* in a sample of raw milk artisanal cheese, Brazil.

Primers	Sequency (5' – 3')	Fragment size	Annealing temperature
Trans 1	TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C	687bp	60°C
Trans 2	CCC AAC AAC ACC TCC TTATTC		
N3+	AAG CGT GTG GAG GAG CGA ACC	440bp	66° C
N4+	CTC GTA ATC ACC AAT CGC TTC GTC		

2.5. DNA sequencing

Our method aims to amplify a region that does not have enough polymorphisms for any analysis beyond confirming the *C. burnetii* species. Appropriately sized fragments were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification® kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). Direct nucleotide sequencing amplicon was performed with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit and purification with the BigDye® X-Terminator Purification kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. Amplicon analyzes were performed on an ABI Prism 3730XL with 96 capillaries (Applied Biosystems) and nucleotide sequences were analyzed using MEGA7 software (<https://www.megasoftware.net>).

2.6. Epidemiological and spatial analyses

The frequency of *C. burnetii* positive-RMAC was determined with a 95% confidence interval (CI) and used as a screening test for *C. burnetii* positive-

RFCPAs. Factors associated with *C. burnetii* positive-RMAC were assessed using Fisher's exact test. The significance level adopted was 0.05.

For cheeses from the five regions studied, possible associations of the proportions of *C. burnetii* positive-RMAC with the lapse since registration with the official surveillance body were evaluated using chi-square for linear trend. Also, only for MAC, possible linear trends of its positivity with rates of ripening above the median of 10 days were evaluated (<https://epitools.ausvet.com.au/trend>).

The microregion, federation units, and municipal boundaries, and estimated population were obtained from the Brazilian Institute of Geography and Statistics - IBGE (<https://www.ibge.gov.br>). The spatial analyses performed were: Choropleth maps of spatial distribution to visualize the location of the number of cases in the municipalities; Kernel density estimation (KDE) to identify the location of clusters for case occurrences; Spatial scanning map (Scan) to identify spatial and temporal clusters with statistical significance.

For the choropleth maps construction, the ArcGIS software version 10.4 (<https://www.arcgis.com>) was used, with the classes 'No cases' (white color), 'Low' (green), 'Medium' (yellow), 'High' (orange) and 'Very High' (red) for the spatial distribution of cases using the quartile.

KDE was performed to identify RFCPA clusters with *C. burnetii* positive-RMAC (quadratic function, density calculation, and adaptive radius), and a spatial scan map (Scan) was designed to identify spatial clusters with statistical significance (pure analysis scan space), using the Bernoulli model. For MAC only, KDE analyses were also performed on samples with other bacterial positive results (coagulase-positive *Staphylococci* and coagulase-negative *Staphylococci*) and on samples with higher ripening periods (above the 10 median days), to evaluate possible correlations between clusters. Data processing, interpretation, visualization, and analysis were performed using ArcGIS (<http://www.arcgis.com/>), TerraView (<http://www.dpi.inpe.br/terralib5/wiki/doku.php>), and SatScan (<https://www.satscan.org/>).

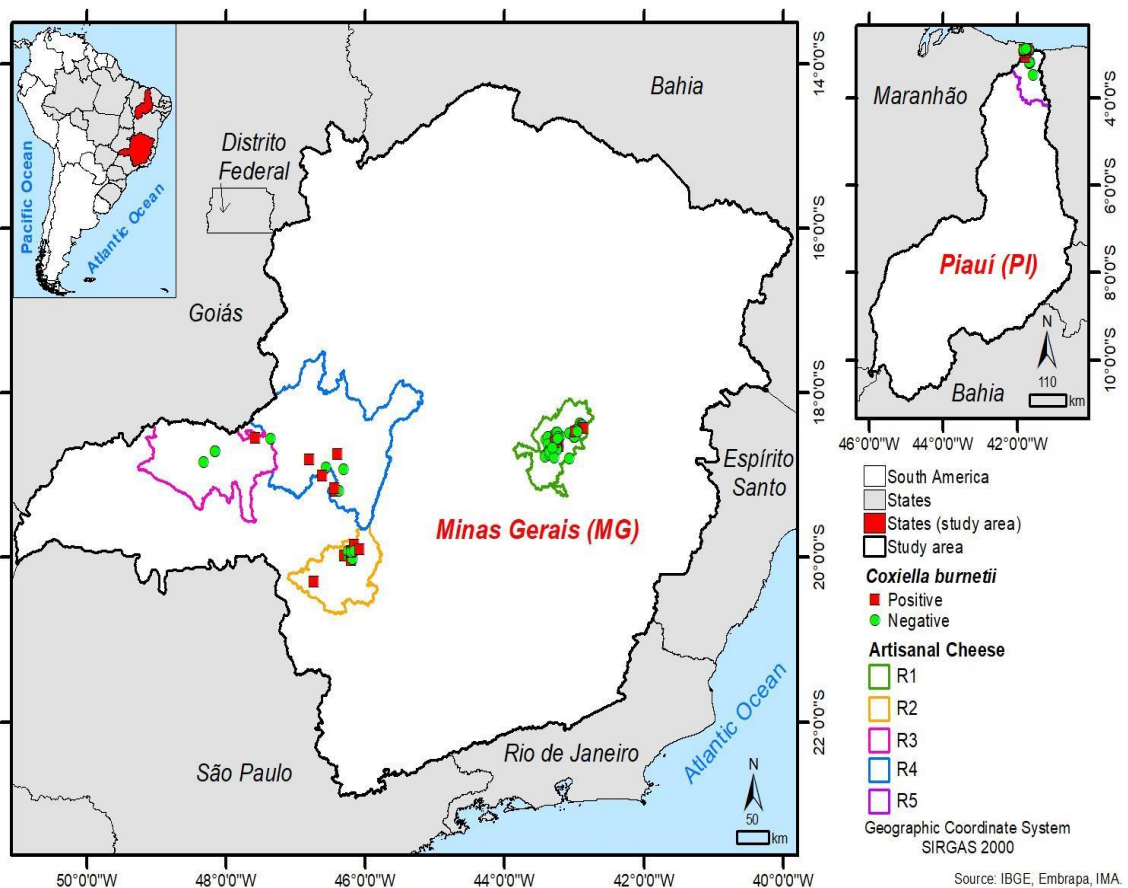
Only for MG state, spatial analyses of two variables, human exposures to *C. burnetii* and livestock concentrations, surveyed in the same study state, MG,

by our team (Meurer et al., 2021) were reassessed to seek possible spatial associations with the clusters of *C. burnetii* positive-MAC.

3. Results

The partial fragment of the *C. burnetii* IS1111 gene was detected and confirmed by sequencing in 25 RMAC samples (25.0%, 95%CI 16.8%-34.6%). Figure 1 shows the spatial distribution of RFCPAs with positive and negative *C. burnetii*-RMAC in the five traditional producing regions analyzed.

Figure 1. Spatial distribution of rural family-based cheese-processing agroindustries with raw milk minas artisanal cheese positive (red squares) and negative (green circles) for *Coxiella burnetii* from the regions Serro, Canastra, Triângulo Mineiro and Cerrado, Minas Gerais, and, Parnaíba, Piauí, Brazil, 2018. Produced with the ArcGIS software.



Although not significant ($p = 0.12$), there was a trend towards greater *C. burnetii* positive-MAC rates among samples with lower coagulase-positive *Staphylococci* counts (CPS), higher coagulase-negative *Staphylococci* counts (CNS) ($p = 0.10$), longer ripening periods ($p = 0.12$) and lower humidity degrees ($p = 0.12$). There was a significant difference in *C. burnetii* positive-RMAC depending on the producing microregion ($p = 0.04$) (Table 2), with a linear decreasing trend of *C. burnetii* positive-RMAC along the different producing microregions ordered by increasing the lapse since registration with the official surveillance body ($Slope = -0.011$, $p = 0.053$) (Figure 2).

Table 2. Univariate analysis for *Coxiella burnetii* positive-raw milk artisanal cheese, Brazil, 2018.

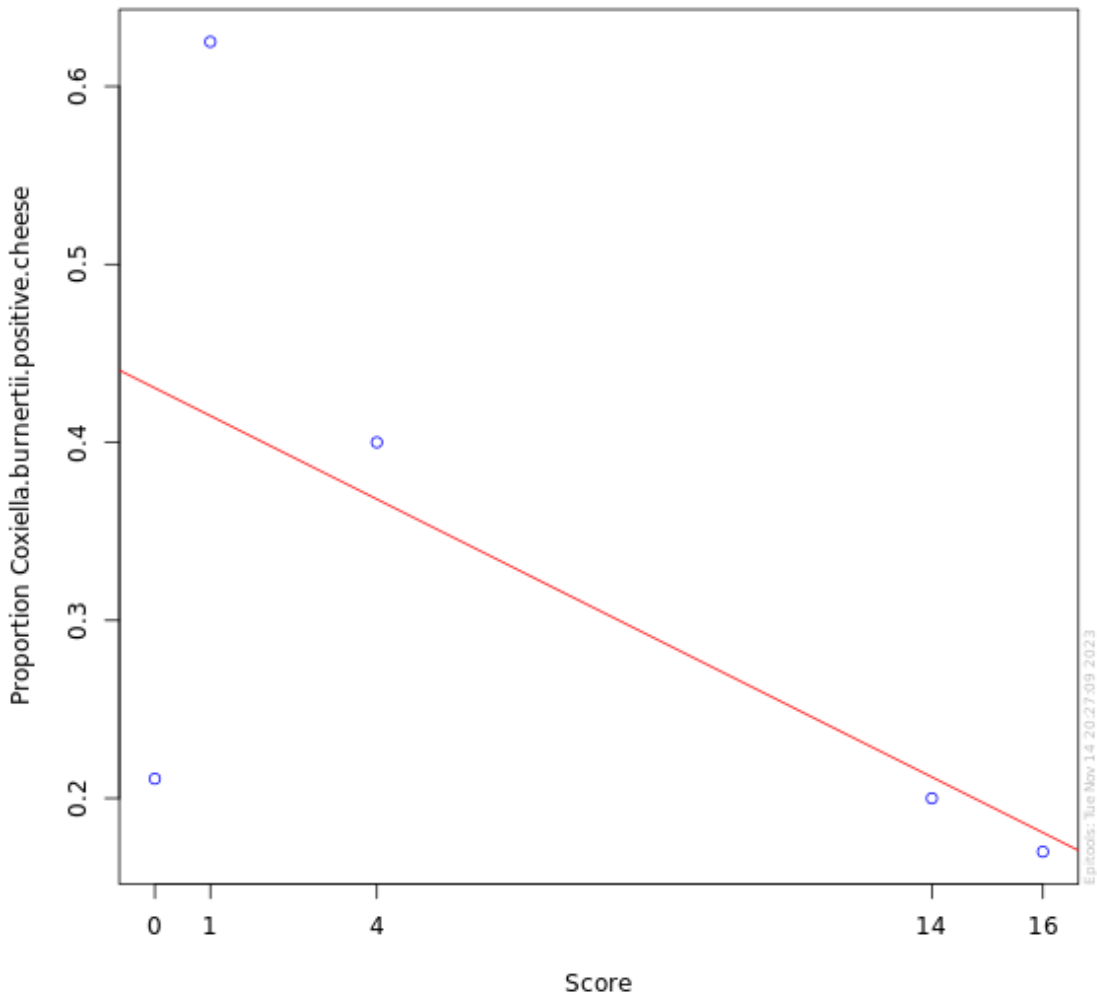
Variable	Total	Positive (%)	P - values ^a
Production site			
Piauí	19	4 (21.05)	0.04
Cerrado	8	5 (62.50)	
Canastra	15	6 (40.00)	
Triângulo Mineiro	5	1 (20.00)	
Serro	53	9 (17.00)	
Total coliforms (CFU) ^b			0.40
10 to 4000	58	16 (27.60)	
5900 to 2500000	23	5 (21.70)	
Fecal coliforms (CFU) ^b			0.53
10 to 500	64	17 (26.60)	
730 to 170000	17	4 (23.50)	
Coagulase Positive <i>Staphylococci</i> (CFU) ^b			0.12
10 to 10 ³	49	16 (32.65)	
>10 ³	32	5 (15.63)	
Coagulase Negative <i>Staphylococci</i> (CFU) ^b			0.10
0 to 10 ³	14	1 (7.14)	
>10 ³	67	20 (29.85)	
Human adenovirus			0.75
No	83	20 (24.10)	
Yes	17	5 (29.41)	
Human norovirus			>0.99
No	72	18 (25.00)	
Yes	28	7 (25.00)	
Rainy season ^b			>0.99
No	36	9 (25.00)	
Yes	64	16 (25.00)	

Ripening period (days) ^b			0.12
4 to 10	47	9 (19.10)	
12 to 46	34	12 (35.30)	
Humidity degree (%) ^{b,c}			0.12
20.39 to 45.89	44	15 (34.10)	
46.12 to 56.33	34	6 (17.60)	
pH ^{b,c}			0.61
4.00 to 4.88	39	9 (23.08)	
4.89 to 5.36	39	12 (30.77)	

^a by Fisher's exact test; ^b analyzes not carried out on coalho cheese, Piauí; ^c not all MAC samples were analyzed.

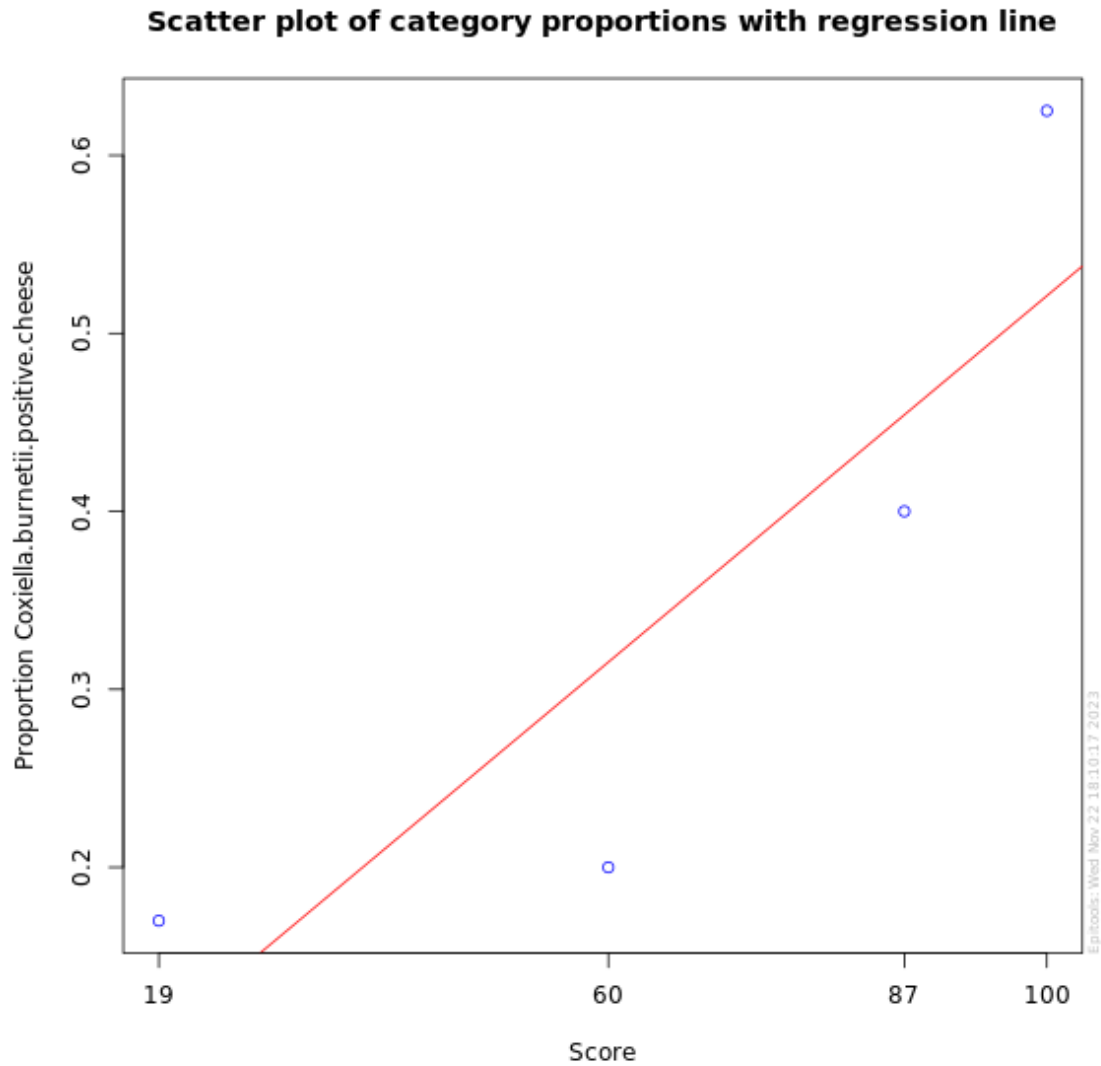
Figure 2. Decreasing linear trends of *Coxiella burnetii* positive-raw milk artisanal cheese by lapse (years) since registration with the official surveillance body. The region of Parnaíba, Piauí, which is not yet registered, had this lapse considered as zero. *Slope* = -0.011 (*p* = 0.053), Pearson Chi-Square = 9.84 (*p* value = 0.04). Scores 0, 1, 4, 14, and 16 corresponded to the lapse since registration (years) as a producer of raw milk artisanal cheese with the official surveillance body in the regions Parnaíba, Cerrado, Triângulo Mineiro, Canastra and Serro, respectively, Brazil, 2018.

Scatter plot of category proportions with regression line



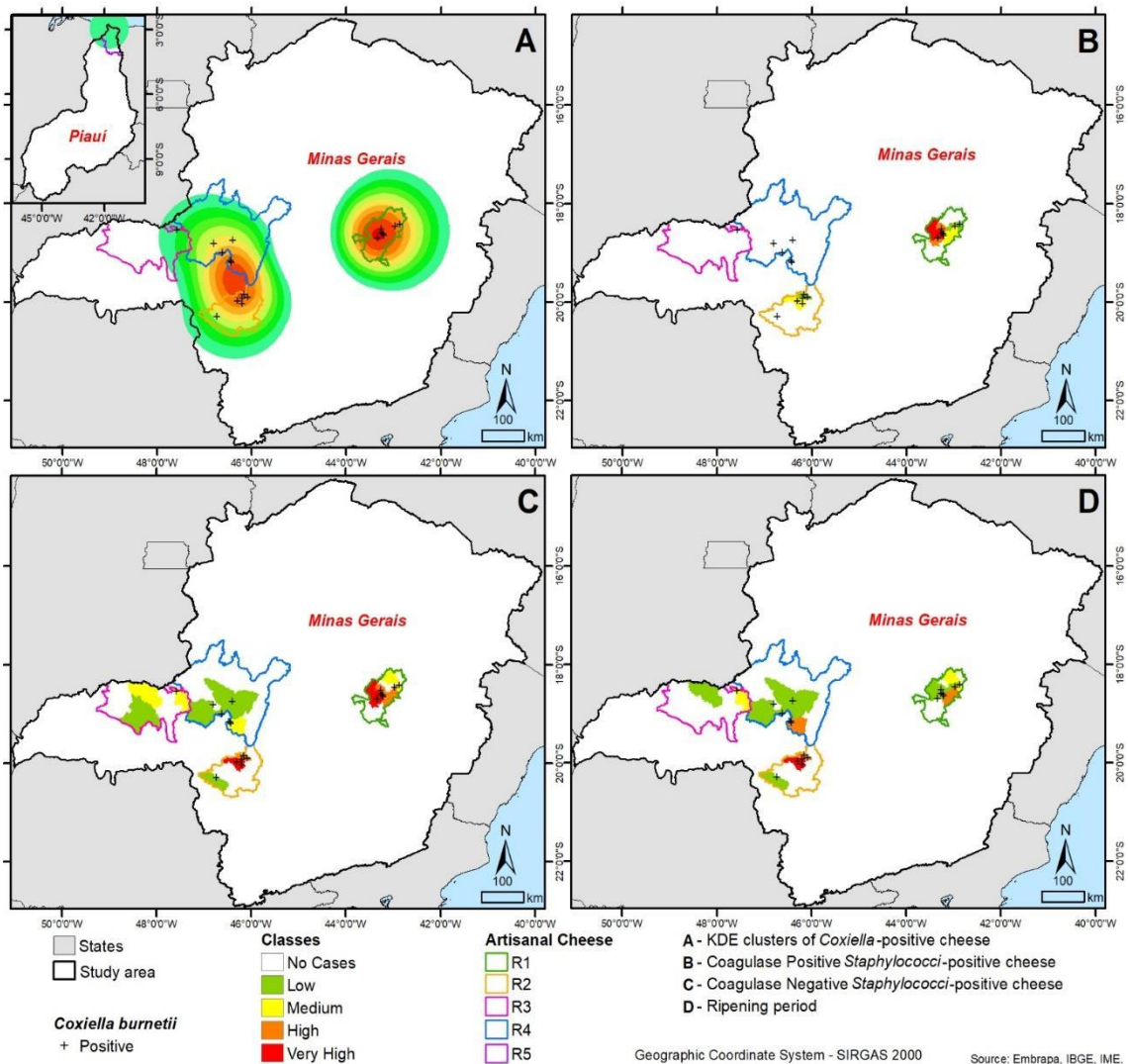
An increasing linear trend of *C. burnetii* positive-MAC was also observed associated with the proportions of cheeses with ripening above the median of 10 days ($Slope = 0.0042$, $p = 0.0044$) (Figure 3).

Figure 3. Direct linear trends between rates of *Coxiella burnetii* positive-Minas artisanal cheese and scores of ripening above the median of 10 days, $Slope = 0.0042$ ($p = 0.0044$). Scores 19, 60, 87, and 100 correspond to the percentages of cheeses with ripening time above the median in the microrregions Serro, Triângulo Mineiro, Canastra, and Cerrado, respectively, Minas Gerais, Brazil, 2018.



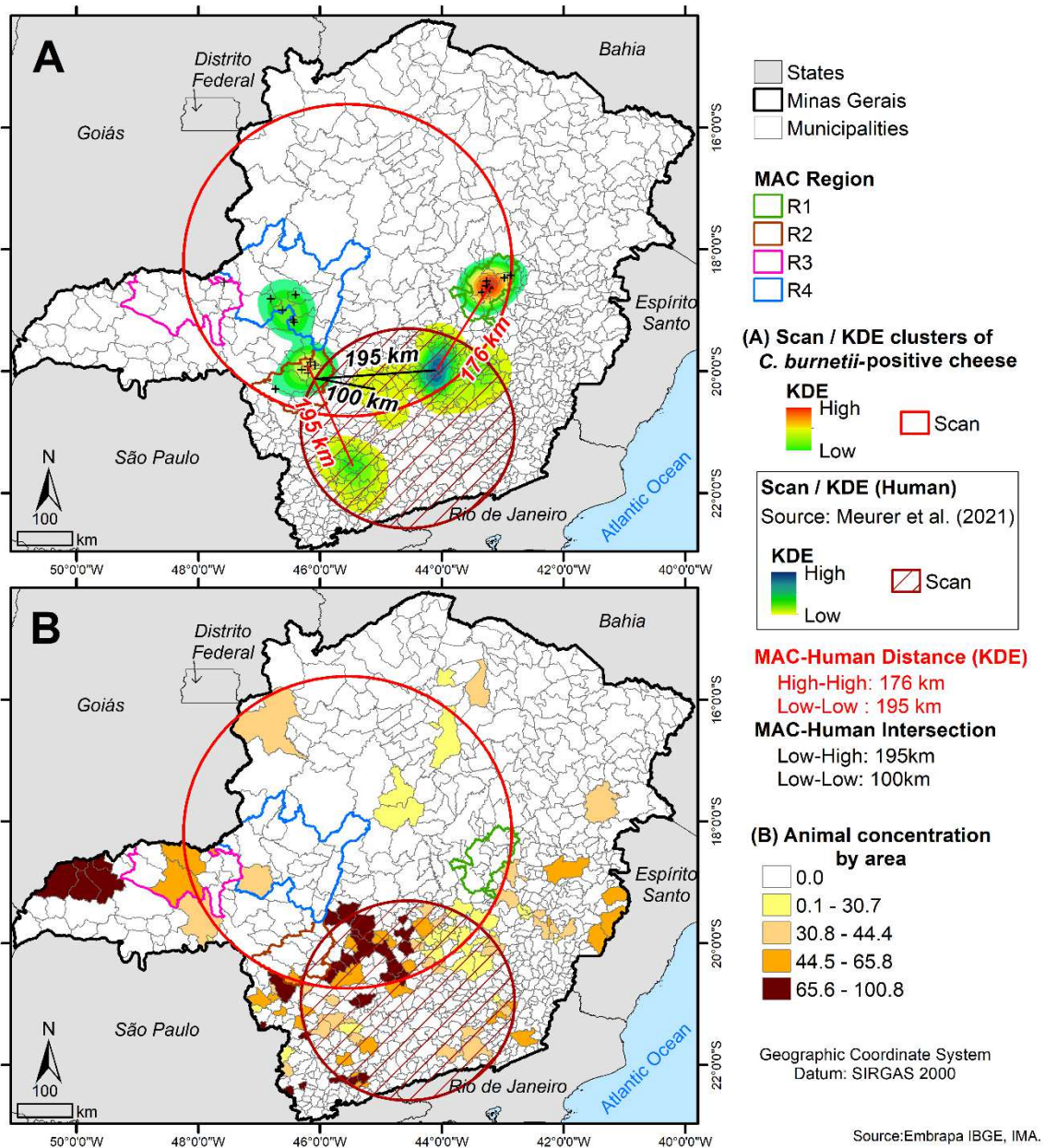
KDE analysis revealed a high-density cluster of RFCPA with *C. burnetii* positive-MAC located in R1, which overlapped with clusters of cheeses with higher CPS and CNS counts; and another cluster located in R2, which in turn overlapped with cheeses with higher CNS counts and those with maturation above the median of 10 days (Figure 4).

Figure 4. (A) Application of Kernel Density Estimation (KDE) for *Coxiella burnetii* positive-RMAC in rural family-based cheese-processing agroindustries in four Minas artisanal cheese producing regions, Minas Gerais, and a Coalho artisanal cheese producing region, Piauí, Brazil, 2018. Choropleth maps of distributions of Minas artisanal cheese (MAC) (B) with higher counts of coagulase-positive *Staphylococci*, (C) with higher counts of coagulase-negative *Staphylococci* and (D) with maturation above the median of 10 days, Minas Gerais, Brazil, 2018.



In MG state, the high- and low-density clusters of *C. burnetii* positive-MAC presented distances of 176 km and 195 km from cluster s of human expositions to *C. burnetii*, respectively. The two areas identified by Scan for *C. burnetii* positive results in both MAC and human beings were significant ($p < 0.0001$) and showed an intersection. At this intersection was located a high-density KDE cluster of human exposures to *C. burnetii* and a portion of a low-density KDE cluster for *C. burnetii*-positive MAC, which were 195 km apart (Figure 5A). Also, the intersection area (Scan) showed an overlap with areas of higher concentration of livestock animals per area (Figure 5B).

Figure 5. (A) Clusters by Kernel Density Estimation (KDE) and Scan of *Coxiella burnetii* positive-Minas artisanal cheese, human exposures to *C. burnetii*, and (B) livestock concentration by area, Minas Gerais, Brazil, 2018.



4. Discussion

This study found a quarter of *C. burnetii* DNA positive-cheese and this positivity showed heterogeneity between the regions studied, although all of them had some RFCPA with positive cheese.

To our knowledge, our team was the first to detect *C. burnetii* in RMAC in Brazil (Rozental et al., 2020), and there are still few studies, two to our knowledge, that evaluated the presence of *C. burnetii* in RMAC in Brazil

(Rozental et al., 2020; Nascimento et al., 2021). The frequency of *C. burnetii* positive-RMAC we found in this study was higher than the two existing surveys in Brazil, who found 9.4% in cheeses from Serro (Rozental et al., 2020), and 4.6% in Cerrado (Nascimento et al., 2021). It was also higher than the 7.8% found in raw milk cheeses from south Italy (Basanisi et al., 2022). Additionally, this frequency was as high as that found by surveys on raw milk cheese in countries such as Spain and Italy which have shown 17.2% and 21.3% in Italy, and 29.9% in Spain (Capuano et al., 2012; Galieiro et al., 2016; Barandika et al., 2019), and lower than the 65% found in French cheeses (Eldin et al., 2013).

Unlike other Brazilian study (Nascimento et al., 2021), our team has been researching this pathogen also in cheeses already registered and inspected by official surveillance bodies, using a larger sample, with greater spatial representation and collected directly at RFCPAs instead of points of sales, to enable future traceability, monitoring and controls. To our knowledge, this is the largest national survey of *C. burnetii* in RMAC both in terms of sample size and spatial representativeness. Even so, research on this pathogen is still largely scarce in Brazil in animals, food, and humans, although Q fever is considered one of the ten most important zoonoses globally and responsible for more than 30% of community-acquired pneumonia cases in French Guiana, a country whose border with the state of Amapá, Brazil, warns of its occurrence in the Amazon region (Epelboin et al., 2021).

The main route of transmission of *C. burnetii* to humans is through contaminated aerosols. Human oral infection by the consumption of unpasteurized milk and dairy products is not yet completely understood, although a risk assessment study concluded that the risk of infection by the consumption of unpasteurized milk would be relatively low in comparison with the aerial route, but not negligible (Gale et al., 2015). Furthermore, epidemiological evidence of the association of Q fever outbreaks with the consumption of unpasteurized dairy products has been reported in several studies (Fishbein and Raoult, 1992; Signs et al., 2012; Gale et al., 2015; Mungai et al., 2015). One of the strongest evidence is an outbreak that affected five consumers of contaminated raw cow's milk from the same dairy (Signs et al., 2012); to the point that the USA already admits this pathogen as one of those responsible for one (1.28%) of the 78 outbreaks of

diseases associated with the consumption of raw milk and dairy products that had a single pathogen involved in that country, in the period 2007-2012 (Mungai et al., 2015).

As a strengthening of epidemiological evidence, experimental infection studies in animal models support the oral route as a mode of transmission of *C. burnetii*. Miller et al. (2020), found that mice infected with *C. burnetii* showed notable splenomegaly after infection, a robust immune response, persistence in the stomach and mesenteric lymph nodes, and dissemination of *C. burnetii* to peripheral tissues observed in all infected mice.

The present study shows that the artisanal cheese production chain produced from raw milk is vulnerable to *C. burnetii* contaminations. Studies show that ruminants are the main reservoirs of *C. burnetii*, eliminating the bacteria through birth and/or abortion products, milk, urine and feces. In cattle, the main route of excretion of the pathogen is milk, and this bacterium remains in the lymph nodes and mammary gland and can be eliminated for several months to years (Gale et al., 2015; Barlozzari et al., 2020; Espí et al., 2021). Thus, Capuano et al. (2012) and Eldin et al. (2013) found higher positivity rates in bovine milk cheese than in other species. As *C. burnetii* is an obligate intracellular bacterium, its multiplication does not occur in milk and cheese (Gale et al., 2015). However, depending on its life cycle, it goes through two phases, the large cell variant and the small cell variant. The latter is highly resistant to physical and chemical stress, and allows the pathogen to survive for months in different types of matrices and in the environment (Eldin et al., 2017).

This study showed that a part of the RMAC samples from all five traditional producing regions analyzed presented *C. burnetii* DNA. In addition to *C. burnetii*, MAC samples were also analyzed simultaneously for other pathogens and contaminants, with 28%, 20%, 40%, and more than 80% failing microbiological standards for having high counts of total coliforms, fecal coliforms, CPS and CNS, respectively, which proves flaws in established microbiological standards. Furthermore, 18% and 28% of the RMAC analyzed in this study were also positive for the human adenovirus, which is an indicator of human fecal

contamination in food, and human norovirus, one of the viral pathogens most involved in human foodborne outbreaks in the world (Silva et al., 2021).

Furthermore, in a previous study carried out on MAC produced in the Serro region, *Brucella* was detected by PCR, with *B. abortus* recovered in a viable state by cultivation in one of the analyzed samples (Silva et al., 2022). Finally, our MAC samples were a subsample of a larger study that found 18.7%, 14.1%, and 25.0% of samples, respectively, to be non-compliant with legislation for coliform at 35°C, *Escherichia coli* and CPS (Firmo et al., 2023). Non-compliance results verified in this study suggest flaws in control and eradication programs for cattle diseases and deficiencies in the hygiene procedures applied during the artisanal cheese production chain, as well as flaws in human handling and/or in the storage process of these products, which may result in potential risks to consumers. This hypothesis is corroborated by data from the Brazilian Ministry of Health, from 2014 to 2023, in which milk and dairy products occupied the fifth position (6.7%) among the main foods implicated in outbreaks of food-borne diseases (Brazil, 2024).

There was a trend for a direct relationship between positivity for *C. burnetii* and positivity for CNS, in addition to overlapping clusters of RMAC positive-*C. burnetii* and -CNS, in one of the producing regions of MG. This may suggest that the presence of *C. burnetii* in cheese is more directly associated with environmental contamination and hygiene failures since CNS are more ubiquitous and easily found in soil, water, plants, and the microbiota of the intestinal tract, skin, and mucous membranes of humans and animals, which can form biofilms that increase their survival on surfaces (Phophi et al., 2019). On the other hand, in another region of MG there were overlapping clusters of RMAC positive-*C. burnetii*, -CPS, and -CNS, suggesting that the presence of *C. burnetii* in the cheese production chain in this microregion may be related both to issues of hygiene failures (Phophi et al., 2019) and also to failures in mastitis control. The CPS found in milk and dairy products is partly a marker of mastitis, as they are the main cause of this infection in cattle. This suggests that part of the elimination of *C. burnetii* occurred in animals with mammary gland infection since mastitis increases the rate of macrophages infected by *C. burnetii*, which are eliminated in the milk (Barlow et al., 2008).

The overlapping clusters of *C. burnetii* positive-MAC with those with the highest counts of CPS and CNS strengthens the hypothesis of greater chances of contamination from common sources. As MAC are produced from a set of single farm milk, the own herds could be the main reservoirs (Acha and Szyfres, 2001). These clusters must be prioritized for surveillance, control, and monitoring by those who make public policies in the agriculture, health, and environmental sectors.

The distribution of *C. burnetii* positive-RMAC frequencies in the different regions was heterogeneous, with an inverse relationship between *C. burnetii* positive-RMAC rates and the lapse since registration with the official surveillance body. In other words, cheeses from Piauí, not yet registered, and the last region recognized by the surveillance body of MG, Cerrado, showed greater chances for *C. burnetii* contaminations than the first region registered, Serro. A possible explanation is that longer times may be associated with a longer period of technical assistance offered by Emater-MG with higher rates of compliance with good agricultural practices (GAP) and manufacturing practices (GMP) for each RFCPA. Furthermore, the preparation of MAC involves professionals with different levels of education and the ability to apply GAP and GMP. The different sanitary conditions during the production process combined with the longer period of cheese handling and the longer exposure time in a possible contaminated environment may justify the higher rates of *C. burnetii* DNA positive-MAC among those with longer maturation periods, as seen in this study.

The cluster with the highest density of human exposure to *C. burnetii* was found in the center of the state, where the Belo Horizonte metropolitan area is located, representing the largest MAC consumer market in the state of MG, despite being a non-traditional region in MAC production. This high-density KDE cluster and a portion of a KDE cluster of *C. burnetii*-positive MAC were located at the intersection between the two clustering significant areas by Scan, that is of *C. burnetii* positive-MAC and human exposures to *C. burnetii*, respectively. This result suggests epidemiological evidence of possible relationships between human cases and consumption of contaminated RMAC, which needs to be elucidated. In addition, our team identified in a previous study that this same cluster of human exposures to *C. burnetii* had a significant association with rural

residence and overlapped with municipalities with a higher concentration per area of livestock animals, reinforcing the association between the occurrence of human exposures and the possible occurrence of coxiellosis in livestock animals (Meurer et al., 2021). Additionally, the authors propose that *C. burnetti* positive-RMAC can be used as a marker for the traceability of positive RFCPAs and their respective contaminated livestock herds, and, consequently, search of occupational human exposures to *C. burnetii*.

The commercialization of RMAC, in addition to the cultural aspect, is directly related to the socioeconomic development of traditional production territories. With the regulation of the Art Seal (Selo Arte) and the Artesanal Cheese Seal (Selo Queijo Artesanal), through Federal Decree 11,099/2022, these traditional dairy products gained notable national recognition, being appreciated in several states in this country (Brazil, 2022). However, the results of this and previous studies show that their microbiological qualities need to be improved to make them safer for consumers.

A study showed that *C. burnetii* remained viable for almost 9 months of ripening in hard cheese, despite the acidic pH and low water activity achieved, and positivity was revealed in mice experimentally infected and euthanized at 14- and 21-days post-inoculation (Barandika et al., 2019). However, we observed in our on-site research that MAC was sold fresh (<60 days), within a median of 4 days of ripening (Rozental et al., 2020; Silva et al., 2022), despite current legislation requiring at least 17 days for cheeses produced in this microregion, Serro (Minas Gerais, 2021). Thus, this cheese may represent a potential source of human exposures to *C. burnetii* and demands national studies to assess the viability of this pathogen throughout the ripening period, especially because raw milk derivatives have higher concentrations of this bacterium ($P = 0.02$) than those from pasteurized milk (Eldin et al., 2013). However, such assessment, which is a future perspective of our team, has not yet been possible because it is a pathogen that requires high-level biosafety laboratories for its isolation or more sophisticated indirect methods for a presumptive assessment.

Finally, this study has some aspects that strengthen it that should be highlighted. To achieve our objectives, the official Brazilian food and animal

health surveillance bodies (IMA and MAPA) and the agricultural research sector (EMBRAPA) established transdisciplinary and intersectoral collaboration partnerships with the health research sector (FIOCRUZ), health surveillance (FUNED and Instituto Evandro Chagas), and education (UFJF). With this strategy, it was possible to combine the best laboratory infrastructure with research experience in *C. burnetii* in Brazil, with human and animal health surveillance sectors, to reduce existing gaps and research this pathogen in a One Health perspective to support related public policies more comprehensively.

5. Conclusion

We found a high frequency of *C. burnetii* positive-RMAC in the present study. As it is a product made from raw milk, there are greater health challenges in acquiring raw materials and preparing cheese harmless to consumers.

Furthermore, geostatistical analysis showed possible links between a high-density cluster of human population exposed to *C. burnetii* in MG, Brazil, and both clusters, *C. burnetii* positive-MAC, and high concentrations of livestock animals. Therefore, more studies on *C. burnetii* are needed, such as genotyping of circulating samples in animals, food, and humans, to strengthen the cause-effect relationships between livestock, positivity in cheese, and human cases.

Given the results presented of low safety of RMAC, but given their socioeconomic importance in these states of Brazil, we conclude on the need to develop and propose specific health education actions, aimed at the preparation and consumption of raw milk derivatives, strengthened by strategies integrated surveillance, control, and prevention systems that cover the domains of human, animal and environmental health, with a One Health approach.

Funding

This work was supported by Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation; grants SEG 02.13.10.007.00.00 and SEG 12.13.10.007.00.00) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; grants APQ-02746-14, APQ-03989-17, APQ 04335-17, and PPM-00526-16), and CNPq

(grant number 421748/2022-2). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, interpretation of the data, decision to publish or the preparation of the manuscript.

Acknowledgments

We thank the cheese producers who participated in this study, the IMA for carrying out the fieldwork, and the Ezequiel Dias Foundation for conducting serological laboratory analyzes to characterize possible human exposures. The authors would like to thank the Postgraduate Program in Science and Technology of Milk and Dairy Products of the Federal University of Juiz de Fora and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel programme for their total support in the development of this study, which was the theme of a master of science dissertation of the first author VBC.

CRediT authorship contribution statement

MRS, ERL, TR, JOAC, IRM: Conceptualization; MRS, ERL, TR, JOAC: Project administration and Funding acquisition; MRS, ERL, TR, JFJ, DSF, DESF, HOF, JGO, JBR, LDMM, VBC: Methodology; MRS, ERL, TR, JFJ, DSF, DESF, HOF, JGO, KNCC, AASD: Investigation; MRS, RJPS: Formal analysis; MRS, AASD, VBC: Writing - Original Draft; MRS, ERL, JOAC, JBR, KNCC, LDMM, HOF, RJPS: Writing - Review & Editing; All authors corrected and approved the manuscript.

Declaration of competing interest

None.

Data availability

Data will be made available on request.

References

Acha, P. N., Szyfres, B., 2001. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales, second ed 1986. Organización Panamericana de la Salud, Washington.

Basanisi, M.G., La Bella, G., Nobili, G., Raele, D. A., Cafiero, M. A., Coppola, R., Damato, A. M., Fracalvieri, R., Sottili, R., La Salandra, G., 2022. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in sheep and goat milk and dairy products by droplet digital PCR in south Italy. Int J Food Microbiol. 366, 109583.

Brandão, H., Valle, L. A. R., Christóvão, D. A., 1953. Investigações sobre a febre Q em São Paulo. Estudo sorológico em operários de um frigorífico. Arq Fac Hig Saude Publica Univ Sao Paulo. 7, 127-131.

Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S., Dubovi, E., Schukken, Y., 2008. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. Vet Res. 39, 23.

Barandika, J. F., Alvarez-Alonso, R., Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A. L., 2019. Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk. Int J Food Microbiol. 303, 42-45.

Barlozzari, G., Sala, M., Lacoconi, F., Volpi, C., Polinori, N., Rombolà, P., Vairo, F., Macri, G., Scarpulla, M., 2020. Cross-sectional serosurvey of *Coxiella burnetii* in healthy cattle and sheep from extensive grazing system in central Italy. Epidemiol Infect.148, e9.

Brazil, 2019. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019 - Queijos artesanais. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização e regulamentação de queijos artesanais e queijarias produtoras desses produtos artesanais. Available from <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte-selo-queijo-artesanal/legislacao/lei-no-13-860-de-18-de-julho-de-2019.pdf/view>

Brazil, 2017. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem

animal. Available from <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/mpa/legislacao/legislacao-geral-da-pesca/decreto-no-9-013-de-29-03-2017.pdf/view>

Brazil, 2022. Decreto nº 11.099, de 21 de Junho de 2022. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019, para dispor sobre a elaboração e a comercialização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Available from http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2022/decreto/D11099.htm#:~:text=DECRETO%20N%C2%BA%2011.099%2C%20DE%2021,animal%20produzidos%20de%20forma%20artesanal.

Brazil, 2024. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe – 2024. Available from <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024>

Capuano, F., Mancusi, A., Casalnuovo, F., Perugini, A., Proroga, Y., Guarino, A., Berri, M., 2012. Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in cheeses. Eur Food Res Technol. 235, 1181-1186.

Darwish, S. F., Allam, H. A., Amin, A. S., 2009. Evaluation of PCR assay for detection of cow's milk in water buffalo's milk. World Appl Sci J. 7, 461-467.

Eldin, C., Angelakis, E., Renvoisé, A., Raoult, D., 2013. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. Am J Trop Med Hyg. 88, 765-769.

Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J. L., Maurin, M., Raoult, D., 2017. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. Cli microbiol Rev. 30, 115-190.

Epelboin, L., Eldin, C., Thill, P., de Santi, V. P., Abboud, P., Walter, G., Melzani, A., Letertre-Gibert, P., Perez, L., Demar, M., Boutrou, M., Fernandes, J., Cermeño, J. R., Panizo, M. M., Vreden, S. G., Djossou, F., Beillard, E., de Waard,

J. H., Lemos, E. R. S., 2021. Human Q Fever on the Guiana Shield and Brazil: Recent Findings and Remaining Questions. *Curr Trop Med Rep.* 8, 173-182.

Espí, A., Cerro, A., Oleaga, Á., Rodríguez-Pérez, M., López, C. M., Hurtado, A., Rodríguez-Martínez, L. D., Barandika, J. F., García-Pérez, A.L., 2021. One Health approach: an overview of q fever in livestock, wildlife and humans in asturias (northwestern Spain). *Animals.* 11, 1395.

Fishbein, D.B., Raoult., D., 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg.* 47, 35–40.

Firmo, M. J. N., Menezes, L. D. M., de Assis Sales, G., de Carvalho, A. F., de Leon, N. M. E. P., Júnior, B. R. D. C. L., Martins, M. L., 2023. Diagnosis of the microbiological quality of fiscal artisanal Minas cheese samples. *Food Control.* 153, 109887.

Gale, P., Kelly, L., Mearns, R., Duggan, J., Snary, E. L., 2015. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. *J Appl Microbiol.* 118, 1083–1095.

Galieiro, A., Frantini, F., Domenico, M. D., Curini, V., Baronti, I., Turchi, B., Cerii, D., 2016. Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: screening and genotyping. *Int J Food Microbiol.* 237, 47-54.

Lemos, E. R. S., Rozental, T., Mares-Guia, M. A., Almeida, D. N. P., Moreira, N., Silva, R. G., Barreira, J. D., Lamas, C. C., Favacho, A. R., Damasco, P. V., 2011. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 85-87.

Lemos, E. R. S., Rozental, T., Siqueira, B. N., Júnior, A. A. P., Joaquim, T. E., da Silva, R. G., Leite, C. A., Arantes, A. A., da Cunha, M. F., Borghi, D. P., 2018. Q fever in military firefighters during cadet training in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 99, 303-305.

Mares-Guia, M. A. M. M., Rozental, T., Guterres, A., Gomes, R., Almeida, D. N., Moreira, N. S., Barreira, J. D., Favacho, A. R., Santana, A. L., Lemos, E. R. S.,

2014. Molecular identification of the agent of Q fever- *Coxiella burnetii* – in domestic animals in state of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bra de Med Tropical. 47, 231-234.

Mungai, E. A., Behraves, C. B., Gould, L. H., 2015. Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007-2012. Emerg Infect Dis. 21, 119-122.

Mares-Guia, M. A., Rozental, T., Guterres, A., Ferreira, M. S., Botticini, R. G., Terra, A. K., Marraschi, S., Bochner, R., Lemos, E. R. S., 2016. Molecular identification of Q fever in patients with a suspected diagnosis of dengue in Brazil in 2013-2014. Am J Trop Med Hyg. 94, 1090-1094.

Mares-Guia, M. A. M. M., Guterres, A., Rozental, T., Ferreira, M. D. S., Lemos, E. R. S., 2018. Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. Braz J Microbiol. 49,138–143.

Mioni, M. D. S. R., Ribeiro, B. L. D., Peres, M. G., Teixeira, W. S. R., Pelícia, V. C., Motta, R. G., Labruna, M. B., Ribeiro, M. G., Sidi-Boumedine, K., Megid, J., 2019. Real-time quantitative PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in unpasteurized cow's milk sold for human consumption. Zoonoses Public Health. 66, 695–700.

Miller, H. K., Priestley, R. A., Kersh, G. J., 2020. Transmission of *Coxiella burnetii* by ingestion in mice. Epidemiol Infect. 148, e21.

Minas Gerais. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria IMA nº 2051, de 07 de abril de 2021. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Available from <http://ima.mg.gov.br/institucional/portarias/1819-portarias/1966-portarias-ano-2021>

Meurer, I. R., Silva, M. R., Silva, M. V. F., de Lima Duré, A. Í., Adelino, T. É. R., da Costa, A. V. B., Vanelli, C. P., Paula Souza, E., Guimarães, R. J., Rozental, T., Lemos, E. R. S., Corrêa, J.O. D. A., 2021. Seroprevalence estimate and risk

factors for *Coxiella burnetii* infections among humans in a highly urbanised Brazilian state. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 116, 261-269.

Nascimento, C. F., de Mello, V. V. C., Machado, R. Z., André, M. R., Bürger, K. P., 2021. Molecular Detection of *Coxiella burnetii* in Unstandardized Minas Artisanal Cheese Marketed in Southeastern Brazil. *Acta Trop.* 220, 105942.

Oliveira, J. M. B., Rozental, T., Lemos, E. R. S., Forneas, D., Ortega-Mora, L. M., Porto, W. J. N., Oliveira, A. A. F., Mota, R. A., 2018. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. *Acta Trop.* 183, 19-22.

Phophi, L., Petzer, I. M., Qekwana, D.N., 2019. Antimicrobial resistance patterns and biofilm formation of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from subclinical mastitis cow milk samples submitted to the Onderstepoort Milk Laboratory. *BMC Vet Res.* 15, 420.

Rozental, T., Faria, L. S. D., Forneas, D., Guterres, A., Ribeiro, J. B., Araújo, F. R., Lemos, E. R. S., Silva, M. R., 2020. First molecular detection of *Coxiella burnetii* in Brazilian artisanal cheese: a neglected food safety hazard in ready-to-eat raw-milk product. *Braz J Infect Dis.* 24, 208-212.

Signs, K. A., Stobierski, M. G., Gandhi, T. N., 2012. Q fever *cluster* among raw milk drinkers in Michigan, 2011. *Clin Infect Dis.* 55, 1387–1389.

Silva, C.L.; Sales, G.A.; Santos Neto, J.G.; Silva, J.S.; de Lara, A.P.S.S.; Nunes, E.S.L.; Moraes, C.C.G.; Roos, T.B.; Moraes, C.M., 2015. Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) Multiplex. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 74, 21–29.

Siciliano, R. F., Castelli, J. B., Mansur, A. J., Santos, F. P., Colombo, S., Nascimento, E. M., Paddock, C. D., Brasil, R. A., Velho, P. E., Drummond, M. R., Grinberg, M., Strabelli, T. M., 2015. *Bartonella* spp. and *Coxiella burnetii* associated with community-acquired, culture-negative endocarditis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 21, 1429-1432.

Souza, E. A. R., Castro, E. M. S., Oliveira, G. M. B., Azevedo, S. S., Peixoto, R. D. M., Labruna, M. B., Horta, M. C., 2018. Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep from the semi-arid region of northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 27 514-520.

Silva, M. R., Ferreira, F. C., Maranhão, A. G., Lanzarini, N. M., Carvalho Castro, K. N., Miagostovich, M. P., 2021. Assessment of viral contamination of five Brazilian artisanal cheese produced from raw milk: a randomized survey. *Food Environ Virol.* 13, 528-534.

Silva, M. R., Duch, A. A. S., Lage, R. T. P. D. A., de Faria, L. S., Menezes, L. D. M., Ribeiro, J. B., de Souza, G. N., Filho, P. M. S., Preis, I. S., Sales, E. B., de Souza, P. G., Araújo, F. R., Guimarães, R. J. P. S., Mendes, T., Pettan-Brewer, C., Fonseca-Junior, A.A., 2022. Recovery of *Brucella* in raw milk Minas artisanal cheese approved for consumption by official inspection agency in Brazil: assessment of prevalence and risk factors through *One Health* integrated approaches. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 116, 1091-1099.