



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UnICEUB

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

CAMILA DE CARVALHO GALLO PEREIRA

PEDRO LEMGRUBER XAVIER MATTOSO PAVIE

ENDOCARDITE INFECCIOSA POR COXIELLA BURNETTI EM VÁLVULAS CARDÍACAS HUMANAS
CONGELADAS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM BRASÍLIA APÓS SUA DETECÇÃO:
CONTINUAÇÃO DE UMA LINHA DE PESQUISA

BRASÍLIA

2020



CAMILA DE CARVALHO GALLO PEREIRA

PEDRO LEMGRUBER XAVIER MATTOSO PAVIE

ENDOCARDITE INFECCIOSA POR COXIELLA BURNETTI EM VÁLVULAS CARDÍACAS HUMANAS
CONGELADAS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM BRASÍLIA APÓS SUA DETECÇÃO:
CONTINUAÇÃO DE UMA LINHA DE PESQUISA

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assembleia de Pós-Graduação e
Pesquisa.

Orientação: Fabíola Fernandes dos Santos Castro

BRASÍLIA

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaríamos de agradecer a orientadora **Fabíola Fernandes dos Santos Castro** por permitir-nos a continuidade do projeto de pesquisa tão instigante e de relevância para a prática clínica, o qual, no ano anterior, nos gerou premiações, destaque na iniciação científica e vontade de ampliar o trabalho em busca de resultados mais sólidos.

Em seguida, gostaríamos também de agradecer ao professor e doutor **Paulo Roberto Martins Queiroz** cuja disponibilidade e assistência foi de fundamental importância para a realização da análise técnica molecular, especialmente, em momentos de pandemia.

Não menos importante, agradecemos também a antiga monitora e atual biomédica **Jeannie Yokoyama de Sousa** por todo o auxílio dado ao longo do estudo, desde orientações e informações até a colaboração na prática.

Por fim, gostaríamos de agradecer ao **Instituto de Cardiologia do Distrito Federal - ICDF** e a **EMBRAPA-DF** pela disponibilidade e assistência que permitiram a viabilidade da pesquisa.

RESUMO

Coxiella burnetii é uma bactéria de morfologia cocobacilo, gram negativa, estritamente intracelular, do gênero *Rickettsia* causadora de zoonoses em mamíferos. Ela está envolvida na patogênese da febre Q e, na maioria das vezes, desencadeia um quadro agudo que tende a ser subclínico (60% dos casos) ou autolimitado. Sabe-se que a febre Q está associada a 5% das ocorrências desta afecção cardíaca, como também está entre as principais causadoras de endocardite com cultura bacteriana negativa. O diagnóstico da endocardite passa por cultura de sangue, excisão de tecido da válvula cardíaca ou dos êmbolos, PCR e sorologia. Para se confirmar o diagnóstico é necessário que haja a detecção microbiana por cultura ou PCR com um perfil sorológico correspondente e, ainda, ausência de indícios de infecção.

O objetivo desse trabalho foi verificar a prevalência de endocardites por *Coxiella burnetii* dentre endocardites com culturas negativas em válvulas cardíacas humanas congeladas em um hospital de referência em Brasília. Inicialmente, foram selecionadas novas 25 amostras de valvas cardíacas humanas, além das 20 anteriormente processadas, que se encontram congeladas a 20° C negativos, acondicionadas em frascos individuais estéreis, no Instituto de Cardiologia do Distrito Federal-ICDF, nas quais se utilizou metodologia com princípios moleculares de detecção desenvolvida no PIC 2018/2019. Sendo assim, a análise segue o seguinte fluxo. O material genético é extraído a partir de aproximadamente 200 mg de tecido originário de valvas cardíacas que são colocadas em tubos plásticos de 1,5 mL e macerados mecanicamente com pistilo de vidro durante 2 minutos. O tampão de extração utilizado é 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 e 0,3% Triton X-100 sendo posteriormente usados fenol/ clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) no processo de extração do DNA. Em seguida, realiza-se nested-PCR com consequente amplificação do material genético. A extração de DNA produz, em média, 40 ng/ul de DNA total. Esses DNA's são então diluídos e usados nas reações de nested-PCR. A primeira reação de PCR gera fragmentos de tamanho esperado de 485 pb. Submetendo-se as amostras ao segundo ciclo de PCR deve-se obter fragmentos de tamanho esperado de 260 pb. Das **20** amostras de DNA testadas (incluídas as mesmas do PIC 2018-2019), **7** amostras de válvulas cardíacas foram identificadas como positivas para a presença de DNA da bactéria *Coxiella burnetii*. As demais amostras não resultaram em amplificação, sendo consideradas como negativas quanto à presença do DNA dessa bactéria. Em conclusão, a suspeita dos pesquisadores se confirmou pelos resultados obtidos gerando esperança com a expectativa de resultados futuros nas demais amostras congeladas disponíveis.

Deve-se salientar que o primeiro projeto aprovado no programa de PIC 2018/2019 recebeu premiação por menção honrosa, no 25º Congresso de iniciação científica da Universidade de Brasília, e indicação ao Prêmio UniCEUB de Destaque em Iniciação Científica. Em 2020, nos deparamos com a pandemia do COVID-19. No segundo semestre de 2019, as 20 amostras inicialmente preparadas, contando as do PIC 2018-2019, foram analisadas, os materiais deste projeto de 2019-2020 foram solicitados e novas bibliografias foram avaliadas. Em 2020, não foi possível o preparo de novas valvas, que estão congeladas, e nem a realização das pesquisas, uma vez que os laboratórios do UniCEUB permanecem sem acesso e o funcionamento do laboratório da EMBRAPA está restrito e sobrecarregado com outras demandas, devido ao período paralisado pelo isolamento social. Além disso, a realização das nossas pesquisas utiliza rt-PCR e solventes, o que retarda todo o processo. Dessa forma, infelizmente, não foi possível concluir a pesquisa da maneira esperada, mesmo havendo os materiais comprados e as valvas disponíveis. Os autores, devido a grande relevância da pesquisa, conseguiram nova aprovação para realização de projeto de iniciação científica com

o título de “**SERIA A COXIELLA BURNETII UM POSSÍVEL PATÓGENO RESPONSÁVEL POR ENDOCARDITES COM CULTURA NEGATIVA EM VÁLVULAS CARDÍACAS HUMANAS CONGELADAS EM UM SERVIÇO REFERÊNCIA DE BRASÍLIA?**”. Entretanto, devido a quantidade máxima de aprovações permitidas, em edital, por professor, foi desconsiderada a aprovação. Dessa forma, lamentamos a impossibilidade de continuar a linha de pesquisa, que seria tema de Trabalho de Conclusão de Curso e Mestrado, sob iniciativas de apoio científico do UniCEUB.

Palavras-Chave: Endocardite. *Coxiella burnetii*. PCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
3. METODOLOGIA.....	11
3.1 Tipificação	11
3.2 Caracterização do Local de Pesquisa	11
3.3 Objeto de Estudo	11
3.4 Delimitação e Universo das Amostras	12
3.5 Geração de Dados	12
3.6 Procedimentos Metodológicos	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	17
7. APÊNCIES	19

INTRODUÇÃO

A endocardite é uma doença grave que se não tratada pode ser letal e é caracterizada pela inflamação do tecido mais interno do coração, o endocárdio. Vários são os gatilhos para que esta inflamação ocorra, sendo um deles a infecção por microorganismos, sendo assim, endocardite infecciosa. Dentro desta causa específica, há um microorganismo que chama atenção para a sua capacidade de desencadear tal processo e ser de difícil identificação, a bactéria *Coxiella burnetti*.

Esta é um cocobacilo, gram-negativo, causadora de zoonoses e exclusivamente intracelular, transmitida tanto por aerossóis como por contato com ruminantes. (AGERHOLM et al., 2016; ARMSTRONG, MCCARTHY e HORVATH, 2018; ELDIN et al., 2017; MATTAR et al., 2014; MILLION e RAOULT, 2015; STAIN e RAOULT, 1992; SICILIANO, 2014; FENOLLAR, FOURNIER e RAOULT, 2004). É o patógeno associado a febre Q, uma enfermidade que pode transcorrer com quadro agudo (síndrome febril, pneumonia atípica e hepatite granulomatosa) ou com quadro crônico, o qual tende a ser subdiagnosticado. (DRAGAN, KURTEN e VOTH, 2019; BROUQUI, DUMLER e RAOULT, 1994; MILLION, LEPIDI e RAOULT, 2009; DUPONT, THIRION e RAOULT, 1994; SICILIANO et al., 2008; MARRIE, 1985). Ademais, pacientes que já apresentam ou possuem uma valvulopatia, implante cardíaco, anormalidade vascular ou imunossupressão estão mais predispostos a desenvolverem o quadro crônico quando infectados.

Dentro deste contexto, sabe-se que a febre Q está associada a 5% das endocardites infecciosas e é uma das principais causas de endocardite com cultura bacteriana negativa. (TATTEVIN et al., 2015; SICILIANO, 2014; BROUQUI e RAOULT, 2001). Soma-se a isto, o fato do diagnóstico de endocardite infecciosa por *Coxiella burnetti* ser baseado em métodos pouco sensíveis a sua detecção como hemocultura e sorologia, já que o germe é intracelular, como também, o fato dos achados macroscópicos das valvas acometidas serem inespecíficos para a febre Q. Portanto, os métodos mais adequados para uma correta análise desta situação são métodos que possibilitem a detecção de proteínas específicas desta bactéria, como a imunohistoquímica, ou de seu DNA, como a análise por PCR.

Alguns autores já conseguiram detectá-la em válvulas cardíacas congeladas por análise genômica de PCR e, portanto, o objetivo deste estudo é reproduzir este achado em válvulas

cuja cultura bacteriana foi negativa, mas ainda assim suspeitava-se de uma endocardite infecciosa. Dessa forma, com achados positivos para a bactéria, os autores acreditam que possam traçar um novo raciocínio epidemiológico, focado na incidência desta bactéria específica, para as endocardites infecciosas em Brasília.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Endocardite é uma infecção crônica e grave dos folhetos internos cardíacos que pode levar a inúmeras complicações e até mesmo ao óbito, sendo uma de suas causas a febre Q. Esta enfermidade, por sua vez, é um quadro infeccioso de difícil diagnóstico tanto clínico quanto laboratorial, uma vez que a maioria dos casos são subclínicos ou autolimitados e seu agente etiológico é raramente detectado por métodos de pesquisa microbiológicos convencionais. Sendo assim, torna-se uma hipótese diagnóstica pouco considerada. Ao trabalhar com o cocobacilo gram negativo intracelular *Coxiella burnetii*, causador de zoonoses em mamíferos e especificamente da febre Q, o presente estudo teve o propósito de associar casos clínicos de endocardite com resultados negativos de cultura bacteriana, para a bactéria em questão, a fim de se estabelecer uma relação de prevalência entre endocardites com estas características e a presença, até então não confirmada, da *C. burnetii*, uma vez que na maioria das vezes os quadros agudos são subclínicos ou autolimitados (60% dos casos são assintomáticos) e 5 % das endocardites podem estar associadas a bactéria em questão (AGERHOLM et al., 2016; DUPONT, THIRION e RAOULT, 1994; RAOULT, MARRIE e MEGE, 2005; ARMSTRONG, MCCARTHY e HORVATH, 2018; AGERHOLM et al., 2016; ELDIN et al., 2017; MILLION e RAOULT, 2015; MATTAR et al., 2014; STEIN e RAOULT, 1992; SICILIANO, 2014; FENOLLAR, FOURNIER e RAOULT, 2004; TATTEVIN et al., 2015; SICILIANO, 2014; BROUQUI e RAOULT, 2001). Quando sintomáticos, a clínica é manifestada por síndrome febril, pneumonia atípica e hepatite granulomatosa (BROUQUI, DUMLER e RAOULT, 1994; MILLION e RAOULT, 2015; DUPONT, THIRION e RAOULT, 1994; SICILIANO, 2014; MARRIE, 1985). Segundo Agerholm (2016), naqueles pacientes que apresentam alguma comorbidade associada como valvulopatias, implantes cardíacos, imunossupressão e anormalidades vasculares, encontramos uma alta predisposição ao desenvolvimento da infecção crônica a qual possui taxas de mortalidade que atingem os 60% (RAOULT, MARRIE e MEGE, 2005; KAMPSCHREUR et al., 2012). É nesse contexto que o paciente apresenta o quadro de inflamação do endocárdio, que foi alvo do presente estudo (RAOULT et al., 2011). O acometimento do folheto interno do coração envolve as valvas aórticas e/ou mitral, válvulas prostéticas e inclui a formação de aglomerados de fibrina-vegetações. Infiltrado leucocitário e calcificações também são encontrados (FENOLLAR et al., 2006; LEPIDI et al., 2006; BROUQUI, DUMLER e RAOULT, 1994; LEPIDI et al., 2003). Êmbolos sépticos podem se desprender do tecido valvar e repercutir em

infartos esplênicos, renais e cerebrais (FAUCON et al., 2018; BROUQUI, DUMLER e RAOULT, 1994). As vegetações fibrinóides são encontradas em apenas 12,5% dos exames ecocardiográficos sendo tal fato explicado por sua particular ausência ou apresentação nodular pequena (BROUQUI e RAOULT, 2001). Assim, os diagnósticos só ocorrem após meses ou até mesmos ficam ocultados (LANDAIS et al., 2007; BROUQUI, DUMLER e RAOULT, 1994).

O diagnóstico da endocardite passa por cultura de sangue, excisão de tecido das válvulas cardíacas ou dos êmbolos, PCR e sorologia (GAUDUCHON et al., 2003). Para que seja confirmado, é necessário que haja a detecção bacteriana por cultura ou PCR, junto a um perfil sorológico correspondente e ainda ausência de evidências de infecção aguda (MARES-GUIA et al., 2014; KAMPSCHREUR et al., 2012). Além disso, os achados patológicos das valvas de pacientes acometidos com a febre Q são inespecíficos e os métodos citados possuem baixa sensibilidade (LEPIDI et al., 2003; FENOLLAR, FOURNIER e RAOULT, 2004). Sendo assim, a imuno-histoquímica e a PCR são potentes alternativas para a confirmação etiológica em materiais biológicos (BROUQUI, DUMLER e RAOULT, 1994; LEPIDI et al., 2003). Além disso, a técnica possibilita utilizar formas de microrganismos que não são mais viáveis em outros métodos que não envolvam amplificação genética (STEIN e RAOULT, 1992).

Nos últimos anos, diversos ensaios utilizando PCR, nested PCR ou real-time PCR por LightCycler vem sendo desenvolvidos para detecção de DNA em culturas e amostras clínicas (ZEAITER et al., 2003). A reação em cadeia da polimerase (PCR) utiliza primers de oligonucleotídeos específicos e Taq DNA polimerases para amplificar a quantidade de cópia do material genético, uma vez que sua aplicação aumenta drasticamente a sensibilidade e aplicabilidade dos testes moleculares (JANE et al., 2014; SHPYNOV et al., 2018). Os alvos da detecção são sequências genéticas singulares originárias de cromossomos (*com1* or *htpB*), plasmídeos (*QpH1*, *QpRS*) ou de genes de transposição de elementos inseridos *IS1111*, que estão presentes em 20 cópias do genoma da *C. burnetii* Nine Mile RSA493 strain (WACHTER et al., 2018; KLEE et al., 2006). Desta maneira, para se fazer o diagnóstico por PCR é pré-requisito ter uma sequência alvo específica para a *C. burnetii* que afaste os resultados falsos positivos, se mantenha conservada e esteja presente em todas as bactérias isoladas, a fim de que se previna também os falsos negativos (KLEE et al., 2006). Assim, os autores buscaram a partir do estudo da literatura e de experiências prévias de pesquisadores, formas de pesquisa molecular para encontrar material genético das amostras teciduais congeladas.

METODOLOGIA

Tipificação

A natureza do estudo desenvolvido é uma análise genômica por meio de experimentos laboratoriais. Ou seja, é a pesquisa da presença do DNA da bactéria *Coxiella burnetti* via reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de válvulas cardíacas congeladas.

Caracterização do Local de Pesquisa

Uma vez que a pesquisa lida com material biológico e um método de análise molecular muito específico, foram necessárias várias colaborações para desenvolvê-la. Primeiramente, o material biológico (as válvulas cardíacas) saiu do laboratório de microbiologia clínica do Instituto de Cardiologia do Distrito Federal (ICDF), onde estavam armazenadas em uma geladeira a -20°C e cada amostra em um frasco individual estéril.

O segundo local de pesquisa foi o laboratório de microbiologia do UniCEUB, onde após o transporte estéril das amostras, elas foram armazenadas na geladeira deste ambiente até o dia da coleta de fragmentos das válvulas, conforme o mais adequado para o sequenciamento de DNA. Após a extração de fragmentos (apêndice 1), todo o material continuou armazenado neste laboratório até poder ser transportado para o próximo laboratório.

O terceiro e último local de pesquisa foi o laboratório de bacteriologia da EMBRAPA. Este teve de ser incluído no processo, uma vez que é o único que possui a instrumentação necessária para se realizar um sequenciamento de DNA por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Por meio da ajuda do Prof. e Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz, professor do UniCEUB e funcionário da EMBRAPA, as amostras já quantificadas e identificadas foram submetidas ao sequenciamento.

Objeto de Estudo

Como já mencionado, o objeto de pesquisa é dar continuidade à análise de válvulas cardíacas humanas que foram extraídas de pacientes que apresentaram endocardite e cultura bacteriana negativa, porém, com grande suspeita clínica de endocardite infecciosa. Estas

foram extraídas em cirurgias de substituição de válvulas devido a gravidade do quadro clínico destes pacientes acometidos, sendo assim, a melhor terapêutica vigente nestes contextos.

Delimitação e Universo das Amostras

A definição da população estudada se restringiu a pacientes cujo quadro clínico era compatível com endocardite infecciosa, investigação clínica e laboratorial também diziam a favor da enfermidade, mas a cultura bacterina não correspondia ao raciocínio diagnóstico. Como o intuito da pesquisa é identificar a presença da bactéria e correlaciona-la a um perfil epidemiológico, principalmente quanto a incidência desta, nenhum critério de exclusão quanto a qual válvula foi analisada, faixa etária dos pacientes em que elas foram removidas, se havia a presença de comorbidades associadas e se as válvulas acometidas eram originais ou já válvulas substitutas foram aplicados.

Geração de Dados

Os dados coletados foram obtidos por meio dos resultados apresentados pela metodologia PCR.

Procedimentos Metodológicos

Primeiramente, 20 amostras foram transportadas do ICDF para o laboratório de microbiologia do UniCEUB dentro de um recipiente de isopor com gelo dentro para manter a temperatura ao longo do transporte. Chegando ao 2º laboratório, elas foram armazenadas na geladeira deste até o dia seguinte em que seria feita a extração de fragmentos.

Na segunda etapa do processo, no laboratório do UniCEUB, as amostras foram retiradas da geladeira e deixadas sobre a bancada para descongelar por 1 hora. Enquanto isto, o material para a extração dos fragmentos foi organizado. Neste momento, foram necessários 20 tubos de eppendorf, 20 pares de luvas estéreis, uma balança, 20 lâminas de bisturi, 2 cabos de bisturi, 2 pinças Kelly, 1 estante para eppendorf, caneta e fita crepe.

Sendo assim, após as amostras terem sido descongeladas, cada uma foi aberta e com o auxílio de um bisturi e uma pinça Kelly foi extraído um fragmento de cada válvula. Cada fragmento foi acondicionado em um eppendorf separadamente, pesado e identificado com uma letra do alfabeto. Devido aos diferentes tamanhos das válvulas e, algumas vezes, a presença de material ressecado foi difícil manter um padrão de quantidade e o peso dos fragmentos variou de 0,147g a 0,645g. Ademais, para evitar qualquer tipo de contaminação entre as amostras devido à manipulação, o par de luvas estéreis utilizado pelos pesquisadores e a lâmina do bisturi eram trocadas, assim com o cabo do bisturi e a pinça Kelly eram lavados com água corrente e álcool a 70%. Desta etapa da pesquisa, resultou no **apêndice 1**. Após este processo, a estante de eppendorf com as respectivas amostras voltou a ser condicionada na geladeira do laboratório de microbiologia junto ao restante das amostras originais.

Após esta etapa de preparo, a estante de eppendorf com as amostras identificadas foi transportada, também dentro de um isopor com gelo para manter a temperatura, para o 3º laboratório da pesquisa (de bacteriologia da EMBRAPA). Deu-se início aos procedimentos do sequenciamento de DNA.

A primeira etapa nesta fase foi a extração de DNA. Para isso, aproximadamente 100mg de 20 amostras de eppendorf foi retirada e colocada em tubos de plástico de 1,5mL e maceradas manualmente com um pistilo de vidro por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado de 500 a 1000 µL de tampão de extração (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 e 0,3% Triton X-100) a cada tubo e repetiu-se o ciclo de maceração por mais 5 minutos.

Após o referido tempo, adicionou-se 500µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) em cada tubo e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 segundos. Daí, o material de cada recipiente foi centrifugado por 10 minutos a 10.000xg e a 10°C, permitindo a separação de fases. A fase aquosa obtida foi retirada e transferida para um novo turno plástico de 1,5 mL e, então, repetiu-se a fase de centrifugação descrita.

Logo em seguida, o DNA foi precipitado pela adição de 30µL de NaCl 5M e 1 mL de etanol absoluto incubando os tubos durante 2h a -20°C. Mais uma vez o material foi submetido a centrifugação a 10.000xg por 10 min a 10°C. A partir disto, o DNA precipitado foi lavado 2 vezes com 500 µL de etanol a 70%, secado à temperatura ambiente e ressuspensão

em TE 0,1 X (Tris-HCl 1mM ph 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a -20°C. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído 10X em TE 0,1X.

A próxima etapa é a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a qual a reação de nested-PCR foi feita adicionando-se 16,63 µL de água milliQ, 2,5 µL de tampão 10X de PCR, 1,25µL de cloreto de magnésio, 0,5µL de dNTP (10mM), 0,75 µL dos iniciadores (10µM) e 0,125 µL da enzima Taq DNA polymerase. A isto somou-se ainda 5µL de DNA (10µg/µL) e os iniciadores (primers) utilizados foram IS111-1 direto e IS111-1 reverso.

O ciclo de amplificação feito foi uma desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto, 35 ciclos (94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto), mais uma amplificação final a 72°C por 5 minutos. Após estes ciclos, foram retirados 5µL da 1ª reação de PCR e os submetidos a uma nova reação para completar o nested PCR. As condições da reação para completá-lo foram as mesmas já descritas anteriormente. Desta vez, porém, utilizou-se os iniciadores (primers) IS111-2 direto e IS111-2 reverso.

Seguiu-se com outro ciclo de amplificação, sendo uma desnaturação inicial de 48°C por minuto, 35 ciclos (94°C por 1 minuto, 52°C por minuto e 72°C por 1 min) e finalizado com uma amplificação final a 72°C por 5 minutos. Enfim, a visualização dos fragmentos de PCR foi feita em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em sistema foto documentado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa foi desenvolvida após adequação das pendências sinalizadas pelo CEP do UniCEUB, com o parecer de número 3.197.055. Das 10 amostras analisadas, a extração de DNA produziu em média 40 ng/ μ L de DNA total. Estes DNA's foram então diluídos e usados nas reações de nested-PCR. A primeira reação de PCR gerou um fragmento de tamanho esperado de 485 pb. E o segundo ciclo de PCR a que as amostras foram submetidas, gerou um fragmento também de tamanho esperado de 260pb. Como mostrado na **Figura 1**. Realizou-se o processo novamente, com as outras 10 amostras disponíveis e preparadas no ano anterior, totalizando 20.

Sendo assim, destas 20 amostras de DNA testadas, 7 delas positivaram para a presença de DNA da bactéria *Coxiella burnetti*: amostras **E, H, K, M, N, P, Q. (Mostradas na Tabela 1)**. As demais não resultaram em amplificação, portanto, não foram identificadas como infectadas pela bactéria.

Diante deste resultado, fica claro que há associação da bactéria causadora da febre q com quadros de endocardite e que a metodologia desenvolvida e adaptada para a realidade de laboratórios na Capital Federal se mostrou capaz de identificar o material genético do patógeno, assim como em outros países. Diferentemente dos resultados encontrados na literatura que estimam a associação em 5% das endocardites soronegativas, nós encontramos 35% nas amostras analisadas (7 em 20 amostras). (TATTEVIN et al., 2015; SICILIANO, 2014; BROUQUI e RAOULT, 2001). Uma vez que no Brasil há poucos relatos da doença e a notificação dos casos em animais ou humanos não é compulsória, os achados dos pesquisadores são de notório impacto (DAMASCENO e GUERRA, 2018). A expectativa é expandir as buscas da associação nas demais valvas disponíveis, mesmo sem a manutenção da linha de pesquisa por projetos de iniciação científica do UniCEUB. Imaginamos que a ampliação da pesquisa para nível multicêntrico seja capaz (em uma visão não tão idealizada) de sugerir mudanças na cobertura antibiótica e que reforce a vigilância epidemiologia e infecciosa em pacientes com suspeita de endocardite.

Ressalta-se que as 25 amostras inicialmente selecionadas, não chegaram a sofrer processamento. As valvas analisadas foram todas já previamente processadas na pesquisa anterior.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados superaram as expectativas preliminares e indiscutivelmente são de notório impacto: das 20 amostras de DNA testadas, 7 positivaram para a presença de DNA da bactéria *Coxiella burnetti*. Mesmo não mantendo 60% de positividade, como foi encontrado na pesquisa anterior, onde 10 valvas apenas foram analisadas. Porém, é um resultado que se mostra muito superior ao relatado previamente na literatura (apenas 5%), embora o número ainda pequeno de amostras. As demais não resultaram em amplificação, portanto, não foram identificadas como infectadas pela bactéria. Diante deste resultado, fica claro que há associação da bactéria causadora da febre q com quadros de endocardite.

Mesmo com as adversidades, acreditamos na continuidade e ampliação da pesquisa, por meios próprios ou pela perpetuação via outros acadêmicos do curso de medicina, uma vez que os presentes autores irão se formar em breve. Acreditamos que os resultados continuarão corroborando com a escolha assertiva dos pesquisadores em suspeitar da presença da bactéria *Coxiella burnetti* em valvas cardíacas que até então teriam sua destinação para descarte.

REFERÊNCIAS

1. AGERHOLM, Jørgen S. et al. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in inflamed bovine cardiac valves. *BMC veterinary research*, v. 13, n. 1, p. 69, 2016.
2. ARMSTRONG, Mark R.; MCCARTHY, Kate L.; HORVATH, Robert L. A contemporary 16-year review of *Coxiella burnetii* infective endocarditis in a tertiary cardiac center in Queensland, Australia. *Infectious Diseases*, p. 1-8, 2018.
3. BROUQUI, P.; RAOULT, D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clinical microbiology reviews*, v. 14, n. 1, p. 177-207, 2001.
4. BROUQUI, Philippe; DUMLER, J. Stephen; RAOULT, Didier. Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnetii* in the valves of patients with Q fever endocarditis. *The American journal of medicine*, v. 97, n. 5, p. 451-458, 1994.
5. DAMASCENO, Iângla Araujo de Melo; GUERRA, Ricardo Consiglierio. *Coxiella burnetii* e a febre Q no Brasil, uma questão de saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 23, p. 4231-4239, 2018.
6. DUPONT, H. Tissot; THIRION, XAVIER; RAOULT, D. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 1, n. 2, p. 189-196, 1994.
7. ELDIN, Carole et al. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clinical microbiology reviews*, v. 30, n. 1, p. 115-190, 2017.
8. FAUCON, Anne-Laure et al. *Coxiella burnetii* endocarditis on bioprosthetic aortic valve, with peripheral arterial embolism. *Cardiovascular Pathology*, v. 34, p. 38-39, 2018.
9. FENOLLAR, F.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 11, p. 4919-4924, 2004.
10. FENOLLAR, Florence et al. Endocarditis after acute Q fever in patients with previously undiagnosed valvulopathies. *Clinical infectious diseases*, v. 42, n. 6, p. 818-821, 2006.
11. GAUDUCHON, Valérie et al. Molecular diagnosis of infective endocarditis by PCR amplification and direct sequencing of DNA from valve tissue. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 2, p. 763-766, 2003.
12. JANE, S. C. et al. Polymerase chain reaction. U.S. Patent Application n. 13/902,060, 6 mar. 2014.
13. KAMPSCHEUR, Linda M. et al. Prevalence of chronic Q fever in patients with a history of cardiac valve surgery in an area where *Coxiella burnetii* is epidemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 19, n. 8, p. 1165-1169, 2012.
14. KLEE, Silke R. et al. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *Bmc Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 2, 2006.
15. LANDAIS, Cécile et al. From acute Q fever to endocarditis: serological follow-up strategy. *Clinical Infectious Diseases*, v. 44, n. 10, p. 1337-1340, 2007.
16. LEPIDI, Hubert et al. Autoimmunohistochemistry: a new method for the histologic diagnosis of infective endocarditis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 193, n. 12, p. 1711-1717, 2006.
17. LEPIDI, Hubert et al. Cardiac valves in patients with Q fever endocarditis: microbiological, molecular, and histologic studies. *The Journal of infectious diseases*, v. 187, n. 7, p. 1097-1106, 2003.
18. MARES-GUIA, Maria Angélica Monteiro de et al. Molecular identification of the agent of Q fever—*Coxiella burnetii*—in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 2, p. 231-234, 2014.

19. MARRIE, Thomas J. Pneumonia and meningo-encephalitis due to *Coxiella burnetii*. *Journal of infection*, v. 11, n. 1, p. 59-61, 1985.
20. MATTAR, Salim et al. Infection by *Coxiella burnetii* in a patient from a rural área of Monteria, Colombia. *Revista de Salud Pública*, v. 16, n. 6, p. 789-792, 2014.
21. MILLER, Robert JH et al. Development and evaluation of a novel fast broadrange 16S ribosomal DNA PCR and sequencing assay for diagnosis of bacterial infective endocarditis: multi-year experience in a large Canadian healthcare zone and a literature review. *BMC infectious diseases*, v. 16, n. 1, p. 146, 2016.
22. MILLION, Matthieu; RAOULT, Didier. Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management. *Journal of Infection*, v. 71, p. S2-S9, 2015.
23. RAOULT, D.; MARRIE, T. J.; MEGE, J. L. Natural history and pathophysiology of Q fever. *The Lancet infectious diseases*, v. 5, n. 4, p. 219-226, 2005.
24. RAOULT, Didier et al. Chronic Q fever detection in the Netherlands. *Clinical infectious diseases*, v. 53, n. 11, p. 1170-1171, 2011.
25. SHPYNOV, S. N. et al. Comparison of genomes of *Coxiella burnetii* strains using formal order analysis. *New Microbes and New Infections*, v. 23, p. 86-92, 2018.
26. SICILIANO, Rinaldo Focaccia. Endocardites comunitárias por *Bartonella* spp. E *Coxiella burnetii*: Investigações etioepidemiológica e clínica em pacientes com endocardite com culturas negativas. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
27. STEIN, Andreas; RAOULT, Didier. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. *Nucleic acids research*, v. 20, n. 19, p. 5237, 1992.
28. TATTEVIN, P. et al. Update on blood culture-negative endocarditis. *Medecine et maladies infectieuses*, v. 45, n. 1-2, p. 1-8, 2015.
29. WACHTER, Shaun et al. Identification of novel MITEs (miniature inverted-repeat transposable elements) in *Coxiella burnetii*: implications for protein and small RNA evolution. *BMC genomics*, v. 19, n. 1, p. 247, 2018.
30. ZEAITER, Zaher et al. Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 3, p. 919-925, 2003

APÊNDICES

Apêndice A – Figura 1



Figura 1 – Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, mostrando o fragmento de **265 pb** nas amostras **4, 5, 7, 9, 10 e 11**.

Apêndice B – Tabela de Identificação das Amostras

Dados das Válvulas Cardíacas - 04/06/2019									
Letra de Identificação	Peça	Data da Coleta	Médico	Convênio	Nº do Pedido	Nº do Atendimento	Peso da Amostra Extraída	Letra de Identificação da Amostra	
▼ A									
A	Válvula aórtica	16/05/2019	Dr. Cláudio	—	1096100	1130966	0,594g	A	
▼ B									
B	Prótese da Válvula Mítral	08/06/2018	Dr. Fernando	—	1035435	1040002	0,270g	B	
▼ C									
C	Prótese Mecânica da Válvula Mítral	09/05/2016	—	SUS	1605091100	—	0,441g	C	
▼ D									
D	Válvula Biológica Aórtica	21/03/2018	Dr. Elson	—	1018309	1030329	0,398g	D	
▼ E									
E	Prótese Biológica de Válvula Mítral	20/04/2016	—	Saúde Caixa	1604201114	—	0,313g	E	
▼ F									
F	Prótese da Válvula Aórtica	01/11/2017	Dr. Fernando	—	988676	994007	0,236g	F	
▼ G									
G	Prótese Biológica de Válvula Aórtica	20/05/2016	—	SUS	1605201123	—	0,622g	G	
▼ H									
H	Válvula aórtica	14/09/2016	Dr. Cláudio	—	1609141096	—	0,574g	H	
▼ I									
I	Válvula aórtica	19/02/2018	Dr. Fernando	HFA	1012082	1020735	0,216g	I	
▼ J									
J	Válvula aórtica	27/03/2017	Dr. Cláudio	—	—	932985	0,147g	J	
▼ K									
K	Prótese de Válvula Aórtica	08/12/2016	Dr. Fernando	—	16120811031	—	0,241g	K	

▼ L									
	L	Prótese da Válvula Mitral	25/07/2018	————	————	1044649	1063855	0,220g	L
▼ M									
	M	Prótese da Válvula Aórtica	13/03/2018	Dr. Cláudio	————	1016622	1027453	0,472g	M
▼ N									
	N	Válvula Mitral	16/01/2018	Dr. Cláudio	————	1004796	1012856	0,645g	N
▼ O									
	O	Prótese da Válvula Mitral	29/10/2016	Dr. Fernando	————	————	898249	0,368g	O
▼ P									
	P	Prótese da Válvula Mitral	14/02/2017	Dr. Cláudio	————	————	1005432	0,232g	P
▼ Q									
	Q	Válvula Biológica Aórtica	18/05/2018	————	————	1030481	1043064	0,509g	Q
▼ R									
	R	Válvula Biológica Mitral	18/05/2008	————	————	1030481	1043064	0,326g	R
▼ S									
	S	Prótese Metálica da Válvula Mitral	03/10/2016	Dr. Fernando	SUS	————	————	0,166g	S
▼ T									
	T	Prótese de Válvula Aórtica	02/10/2016	Dr. Fernando	SUS	1610031132	————	0,439g	T