

DISTRIBUCIÓN DE *COXIELLA BURNETII* EN LOS RUMIANTES
DOMÉSTICOS Y EN LA FAUNA SILVESTRE DE LA COMUNIDAD
AUTÓNOMA VASCA.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO Y DE
LA VACUNACIÓN EN EL CONTROL DE LA FIEBRE Q EN REBAÑOS
OVINOS NATURALMENTE INFECTADOS

Trabajo dirigido por:

Ana L. García Pérez

Memoria del trabajo realizado en el Departamento de Sanidad Animal de
NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, para optar
al grado de Doctora por la Universidad del País Vasco

Ianire Astobiza Pérez

2012



Esta obra está bajo una licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivada 4.0 Unported](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Fotografía de contraportada:

Copyright © 2006, American Society for Microbiology.

Célula Vero infectada con *Coxiella burnetii*. Microfotografía electrónica de escaneado (SEM) x 7800.

A mi aita y a mi ama

A Marina

AGRADECIMIENTOS

¡¡¡Conseguido!!! No me puedo creer que esté escribiendo lo que es sin duda para mí uno de los capítulos más complicados de este trabajo, que no es otro que el de los agradecimientos. He de sintetizar en unas breves líneas mi sentida y sincera gratitud hacía las personas que me han ayudado a realizar lo que ha constituido para mí una etapa muy importante. Sin ellas, hubiese sido del todo imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en el que tanta ilusión he puesto. Sois sin duda lo mejor de esta Tesis.

En primer lugar, quiero darle las gracias a mi directora de tesis, Ana L. García-Pérez, por confiar en mí desde un principio, por dirigir este trabajo y por introducirme en el apasionante mundo de la investigación y de la fiebre Q.

También a los componentes del equipo investigador de fiebre Q en NEIKER: Ana Hurtado, Fran Ruiz-Fons, Jesse Barandika y Ramón Juste por todas sus importantes contribuciones desde los diferentes ámbitos de la investigación, a lo largo de estos 4 años de trabajo. Así mismo, quiero agradecer la colaboración de Marta Barral en el estudio de los animales silvestres, a Raquel Atxaerandio en el diagnóstico serológico, a Nieves Gómez y Esme Minguijón en el estudio histopatológico, así como a Inés Povedano por su apoyo día a día en el laboratorio. No puedo olvidarme de agradecer la colaboración de los ganaderos, que nos han abierto las puertas de sus casas y han compartido con nosotros sus experiencias y trabajos diarios. Así como a Miren Basaras, por haber actuado como puente entre NEIKER y la Universidad.

Gracias al Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco por la aportación de los medios necesarios a NEIKER que han permitido el desarrollo de esta Tesis. Agradezco también el interés mostrado por todos mis compañer@s y amig@s del departamento de Sanidad Animal de NEIKER con los cuales he compartido incontables horas de trabajo y de diversión y principalmente con los que he tenido más relación: Álvaro, Bea, Belén, Elena, Iratxe, Itziar, Iker, Jon Imanol, Jon Paul, Laura, Maialen, Mónica, Naiara, Natalia, Patricia (ánimo que ya queda poco!), Sandra, Sonia y Vega. En especial quiero agradecer a Amaia, Xeiider, Zuri, Ainara y Eli todos los buenos momentos que hemos pasado, todo vuestro apoyo y toda vuestra energía positiva, ¿cuándo volvemos a cantar?

A mis amig@s de siempre, por sus ánimos y su interés. ¿Para cuando otra quedada “entrañable”? Y también a nuestro último gran fichaje: Julene!, que en breve tendrá compañera! Ya sabéis, a las 19:45 horas donde siempre que a ésta invito yo!!!

Y por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia, en especial a mis aitas, que siempre me han estado apoyando incondicionalmente, desde el momento en el que empecé mi carrera hasta ahora. A mi amama y a mi tía por intentar comprender lo que suponía una tesis y a mi prima Sonia, mi otro yo. También quiero agradecer a mi familia “política” todo su apoyo transmitido y por cuidarme tanto siempre.

Y como no...a Alberto. Por confiar en mí mucho más que yo misma. Gracias por estar a mi lado y por tener toda esa paciencia que te caracteriza. Se acabó el PROCRASTINATION!!! Porque siempre has sido y serás mi gran punto de apoyo.

ESKERRIK ASKO DANORI!

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

El presente trabajo de tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Sanidad de Animal de NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Su desarrollo ha sido posible gracias a la financiación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por el proyecto coordinado titulado “Ecología y control de la fiebre Q: Epidemiología molecular de *Coxiella burnetii*”(FAU2006-00002-C04-01), y del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco a través de una beca predoctoral (febrero 2008/12).

La investigación realizada en esta tesis ha dado lugar a seis publicaciones sobre la situación actual de la fiebre Q en los rumiantes domésticos de la CAPV, los posibles reservorios silvestres presentes en la comunidad así como la eficacia de las posibles opciones de control en rebaños ovinos infectados, que se citan a continuación:

1. Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing Systems. *BMC Veterinary Research* 6, 3.
2. Astobiza, I., Barral, M., Ruiz-Fons, F., Barandika, J.F., Gerrikagoitia, X., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2011. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Veterinary Microbiology* 147, 190-194.
3. Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *The Veterinary Journal* 184, 2, 172-175.
4. Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Research in Veterinary Science* 91, 3, e58-63.
5. Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 20, 7405-7407.
6. Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L. Evaluation of the efficacy of oxitetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock. *The Veterinary Journal*. Enviado el 03/11/2011.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	22
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	25
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	33
II.1 Aspectos históricos de la fiebre Q.....	35
II.2 Clasificación taxonómica de <i>C. burnetii</i>	37
II.3 Aspectos bacteriológicos de <i>C. burnetii</i>	38
II.3.1 Variación antigénica de <i>C. burnetii</i>	39
II.3.2 Fases de <i>C. burnetii</i> en el ciclo intra y extracelular	40
II.3.3 Características de resistencia de <i>C. burnetii</i>	43
II.3.4 Tipado de cepas.....	43
II.3.5 Tropicismo tisular	45
II.4 Respuesta inmune frente a <i>C. burnetii</i>	46
II.5 La fiebre Q en humana.....	48
II.6 El ciclo doméstico de la fiebre Q.....	54
II.6.1 Ganado vacuno	57
II.6.2 Ganado ovino	59
II.6.3 Ganado caprino.....	61
II.6.4 Otras especies domésticas	62
II.7 El ciclo silvestre de la fiebre Q	63
II.8 Diagnóstico de la fiebre Q.....	66
II.8.1 Métodos directos de identificación de <i>C. burnetii</i>	66
II.8.2 Métodos indirectos de identificación de <i>C. burnetii</i> : Técnicas serológicas.....	71
II.8.3 Estrategias para la identificación de rebaños infectados.....	72
II.9 Control de la fiebre Q	74
II.9.1 Tratamiento antibiótico	74
II.9.2 Vacunación.....	75
II.9.3 Otras medidas de control y profilaxis	79
III. MATERIALES Y MÉTODOS	83
III.1 Selección de las poblaciones de estudio y toma de muestras	85
III.2 Técnicas serológicas.....	93
III.3 Técnicas moleculares.....	94
III.3.1 Extracción DNA	94
III.3.2 PCR convencional.....	97
III.3.3 PCR a tiempo real.....	99
III.4 Análisis estadísticos generales	99
IV. ARTÍCULOS / ESTUDIOS.....	101
Artículo / Estudio 1	103
Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems	103
Artículo / Estudio 2	115

Molecular investigation of the occurrence of <i>Coxiella burnetii</i> in wildlife and ticks in an endemic area	115
Artículo / Estudio 3.....	127
Kinetics of <i>Coxiella burnetii</i> excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline	127
Artículo / Estudio 4.....	141
<i>Coxiella burnetii</i> shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination.....	141
Artículo / Estudio 5.....	157
Four-year evaluation of the effect of vaccination against <i>Coxiella burnetii</i> on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock.....	157
Artículo / Estudio 6.....	165
Evaluation of the efficacy of oxitetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock	165
V. RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN	179
VI. CONCLUSIONES.....	199
VII. RESUMEN, SUMMARY, LABURPENA.....	205
VIII. ANEXOS	215
IX. BIBLIOGRAFÍA	219

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. 1. Evolución de los casos de fiebre Q en humana en la CAPV durante el periodo 1994-2007	28
Figura II. 1. Variación antigénica de <i>C. burnetii</i>	40
Figura II. 2. Microfotografías electrónicas de las formas A) SCVs y B) LCVs	41
Figura II. 3. Ciclo de desarrollo de <i>C. burnetii</i> en una célula eucariota	42
Figura II. 4. Distribución mundial de la fiebre Q	49
Figura II. 5. Ciclo doméstico y silvestre de <i>C. burnetii</i>	56
Figura III. 1. Localización de las diferentes explotaciones muestreadas	85
Figura III. 2. Localización de los puntos de muestreo	86
Figura III. 3. Toma de muestras de leche, heces y fluidos vaginales.	89
Figura III. 4. Muestreador de aire (Air Sampler, MD8 airscan, Sartorius)	91
Figura III. 5. Toma de muestras de medioambientales de las diferentes superficies de la explotación.	92
Figura III. 6. Robot de extracción.	94
Figura IV. 1. Geographic distribution of the sampled herds in the study area.	107
Figura IV. 2. Kinetics of the shedding of <i>C. burnetii</i> after parturition by different routes	134
Figura IV. 3. Experimental procedure followed along 4 reproductive seasons	170
Figura IV. 4. Evolution of the percentage of animal shedders and bacterial shedding through vaginal mucus along four seasons	174
Figura V. 1. Localización de los puntos de muestreo de animales silvestres	185

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II. 1. Clasificación taxonómica de <i>C. burnetii</i>	37
Tabla II. 2. Algunos estudios de seroprevalencia de la fiebre Q humana en España.	50
Tabla II. 3. Resumen de algunos brotes publicados de fiebre Q humana y especie animal asociada. 52	
Tabla II. 4. Resultados de diferentes estudios de seroprevalencia realizados en el ganado vacuno. . 57	
Tabla II. 5. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia publicados en España en rumiantes domésticos.	58
Tabla II. 6. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencia realizados en el ganado ovino.60	
Tabla II. 7. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencia realizados en el ganado caprino	61
Tabla II. 8. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencia en la fauna silvestre.	64
Tabla II. 9. Comparación de los diferentes métodos de diagnóstico de la fiebre Q en rumiantes.	73
Tabla III. 1. Número de animales estudiados con su familia correspondiente.	87
Tabla III. 2. Cebadores empleados en la PCR.	97
Tabla III. 3. Componentes en la reacción de PCR.	98
Tabla III. 4. Temperaturas, tiempos y número de ciclos empleados en la reacción de PCR.	98
Tabla IV. 1. Mean anti- <i>C. burnetii</i> antibody prevalence (Serop.) and its associated standard error (SE) throughout ruminant species-by-age class in the study region	110
Tabla IV. 2. Number of animals investigated, including the number of animals hunted vs. those found dead, and <i>C. burnetii</i> PCR results with a detailed description of the positive species.	119
Tabla IV. 3. Animals parasitized by ticks, number of ticks collected in each animal species, and adult ticks identified and analyzed by PCR.	121
Tabla IV. 4. Chronogram of treatments and samplings done in the study flock.	132
Tabla IV. 5. Individual kinetics of <i>C. burnetii</i> through vaginal swabs, milk and faeces from 13 selected ewes from day +15 to day +150 after lambing.	137
Tabla IV. 6. Characteristics of management and animal premises in each flock.	146
Tabla IV. 7. Bacterium load (in log of <i>Coxiella</i> /vaginal swab) shed through vaginal mucus in the sampled ewes at the 2007/08 season when abortion happened, and by groups of age. Bacterium load in the next season (2008/09) considering if animals were vaccinated or not, and their immune status at time of vaccine was given.	151
Tabla IV. 8. Environmental contamination during the lambing season	152
Tabla IV. 9. Summary of the evolution of shedding during the first two vaccination seasons when shedders were detected. No shedding was detected in seasons 2009/10 and 2010/11.	161
Tabla IV. 10. Evolution of results of the vaccination programme in four years periods: abortion rates, <i>C. burnetii</i> shedding in animals, and study of <i>C. burnetii</i> in aerosols.	162
Tabla IV. 11. Percentage of animal shedders and bacterial load excreted after antibiotic treatment in 2007/2008 lambing season, and after vaccination in 2008/2009 lambing season.	173
Tabla V. 1. Seroprevalencia frente a <i>C. burnetii</i> en rumiantes domésticos en sistemas semi-extensivos e intensivos del País Vasco (2007-2010)	184

LISTA DE ABREVIATURAS

AEM: Agencia Española del Medicamento.
CAPV: Comunidad Autónoma del País Vasco.
CI: Control interno de amplificación.
CMRV: Chloroform-metanol residue vaccine.
DIVA: Differentiating infected from vaccinated animals.
DNA: Deoxyribonucleic acid.
EDTA: Ethylene-di-amine-tetra-acetic acid.
EEUU: Estados Unidos de America.
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.
FC: Fijación de complemento
FRET: Fluorescence resonance energy transfer.
IFI: inmunofluorescencia indirecta.
IFN- γ : Interferón-gamma.
IgG: Inmunoglobulina G.
IgM: Inmunoglobulina M.
IHQ: Inmunohistoquímica.
IL 10: Interleuquina 10
IRS-PCR: fragmentos de restricción infrecuentes-PCR
IS: Insertion sequence.
LCV: Large cell variant.
LPS: Lipopolisacárido.
MLVA: Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis.
MST: Multispacer sequence typing.
NK: Natural killer
OIE: Organización mundial de Sanidad Animal.
OTC: Oxitetraciclina.
PBS: Phosphate Buffered Saline.
PCR: Polymerase Chain Reaction
PCR-n: Nested PCR.
PCR-RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisms.
PFGE: Pulsed field gel electrophoresis.
qPCR: Quantitative Real Time PCR.
SCV: Small cell variant.
SDC: Small dense cell.
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
TE: Tris-EDTA buffer.
UV: Ultravioleta.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial causada por una bacteria intracelular, *Coxiella burnetii*. En la especie humana, la fiebre Q muestra un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde procesos leves asintomáticos que pasan desapercibidos, hasta casos agudos que requieren hospitalización, o crónicos, que pueden tener un fatal desenlace. En los casos agudos los pacientes padecen una fiebre alta de duración intermedia, y puede haber neumonía y/o hepatitis. Además, la fiebre Q puede presentarse en forma de brotes epidémicos, con un gran número de personas afectadas, suponiendo un gran problema de salud pública.

La fiebre Q humana es endémica en la CAPV, habiéndose diagnosticado hasta la fecha un importante número de casos de neumonía por fiebre Q en las tres provincias (Aguirre et al., 1984; Montejo et al., 1985; Montes et al., 2006; Sanzo et al., 1991; Sobradillo et al., 1989). En la década de los ochenta, tras el brote epidémico que tuvo lugar en Álava en 1981, la fiebre Q comenzó a reconocerse como un problema creciente (Sanzo et al., 1991). En trabajos más recientes realizados en Gipuzkoa, entre 1984 y 2004 se diagnosticaron por serología 1261 casos (Montes et al., 2006). En los últimos años se ha observado que el número de notificaciones de personas afectadas por *C. burnetii* en la CAPV ha aumentado, así, el número de casos en 2006 se ha duplicado respecto a 1994, sobre todo debido al incremento de declaraciones de Bizkaia en los dos últimos años (Figura I.1). Las mayores tasas se dieron en Bizkaia (6.3 casos por 100.000), en comparación con Álava (3.3 casos) y Gipuzkoa (3.0 casos).

En el resto de España, también se han descrito brotes de fiebre Q tanto en comunidades autónomas del norte como del sur (Bartolomé et al., 2004; Bolaños et al., 2003b; de los Ríos-Martína et al., 2006; García-Clemente et al., 2007; García de Cruz et al., 2010; Martínez-Luengas et al., 1985; Muñoz-Sanz et al., 2007; Nebreda et al., 2001; Nuño et al., 2002; Ramos et al., 2005; Sampere et al., 2003), y se han publicado diversos estudios de seroprevalencia revelando tasas altas de anticuerpos frente a *C. burnetii* en la población de Cantabria (48,6%) (Pascual-Velasco et al., 1998), de Albacete (23.1%) (Bartolomé et al., 2007), de Cataluña (15.3%) (Cardeñosa et al., 2006), de Soria (60.0%) (Nebreda et al., 2001), de León (40.6%) (Suárez-Estrada et al., 1996), de las islas Canarias (21.5%) (Bolaños et al., 2003a), de Madrid (34.5%), de Guadalajara (33.3%) y Cáceres (59.3%) (Cour et al., 1990) y bajas tasas en otras provincias como Huelva con un 5.1% (Lepe et al., 1999). Debido a la presencia de numerosos casos de fiebre Q humana en las diferentes áreas geográficas de España, se podría sugerir que esta enfermedad es endémica en este país (Ramos et al., 2005).

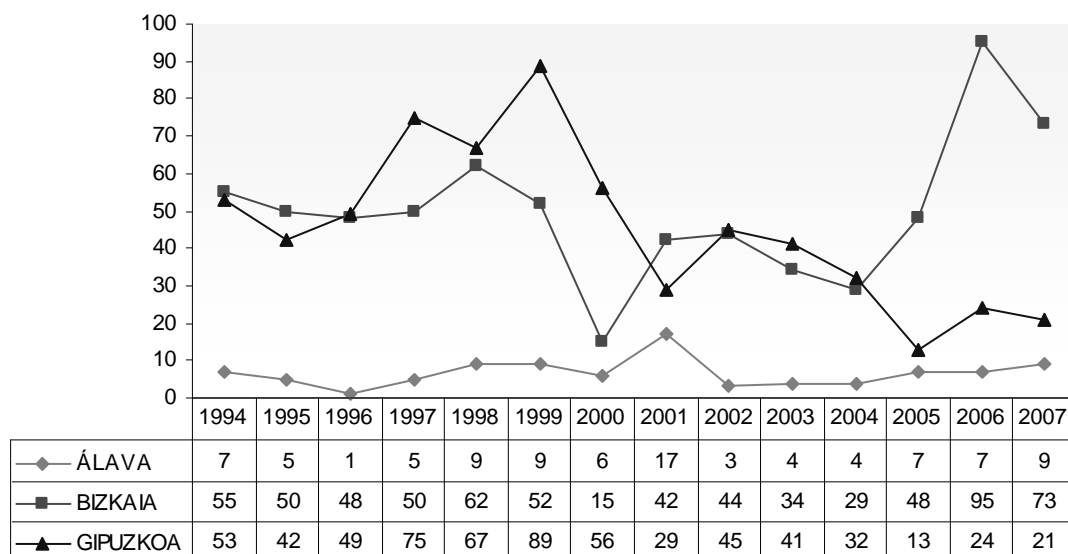


Figura I. 1. Evolución de los casos de fiebre Q en humana en la CAPV durante el periodo 1994-2007 (Fuente: Servicio de Epidemiología de Salud Pública del Gobierno Vasco).

La sintomatología clínica de la enfermedad es distinta en la zona norte y sur de España, no conociéndose por el momento las causas de estas variaciones. En la zona norte la principal manifestación clínica en la mayoría de casos de fiebre Q aguda es la neumonía atípica (Montejo et al., 1985; Nebreda et al., 2001), mientras que en la zona sur y en Canarias es la forma hepática la principal manifestación (Bolaños et al., 2003b; Romero-Jiménez et al., 2003).

Los rumiantes domésticos son los principales reservorios de la bacteria, aunque también los animales silvestres y las garrapatas están implicados en el ciclo de *C. burnetii* en la naturaleza. Además de las consecuencias para la salud pública, la fiebre Q en rumiantes causa abortos, endometritis e infertilidad, lo que supone importantes pérdidas económicas para los ganaderos. Debido a estas razones, es importante conocer la situación actual de la fiebre Q en los rumiantes domésticos de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) para poder tomar medidas para su control y así reducir, y finalmente eliminar la infección en las explotaciones ganaderas, con la consiguiente disminución de casos humanos. Si bien existen estudios serológicos puntuales realizados en diferentes comunidades autónomas (Carballedo et al., 2008; Pérez-Gallardo et al., 1949; Pérez-Gallardo et al., 1952; Rodríguez et al., 2010; Ruiz-Fons et al., 2008; Téllez et al., 1989), realmente no se conoce la incidencia e importancia económica de la fiebre Q para el sector ganadero. En cuanto a la situación en los rumiantes de la CAPV a mediados de los años 80 se realizó un estudio serológico en ganado ovino mediante Fijación de complemento (FC) (Sáez de Ocariz et al., 1987) y se comprobó que el 36.0% de rebaños y el 6.4% de los

animales presentaban anticuerpos frente a *C. burnetii*. Años más tarde se ha comprobado que en la CAPV el ganado ovino puede representar una de las principales fuentes de transmisión al ser humano, ya que se ha estimado que en el 9% de los rebaños con problemas de abortos, la causa de éstos es la fiebre Q (Oporto et al., 2006). Sin embargo, no existen datos de incidencia en otras especies de rumiantes domésticos, por lo que se desconoce qué papel desempeñan el ganado caprino y bovino como reservorios de *C. burnetii*, ya que, junto con el ganado ovino, son las potenciales fuentes de transmisión a humanos (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Berri et al., 2003; Woldehiwet, 2004). Por este motivo, en el momento de comenzar esta tesis se planteó la hipótesis de que el ganado caprino y bovino podrían también representar un papel importante como reservorio de *C. burnetii* y que, por tanto, sería interesante conocer la seroprevalencia que presentan estas especies en la CAPV ya que podrían presentar niveles similares a los del ganado ovino.

También se ha demostrado que la infección está presente en otros animales domésticos tales como perros y gatos, caballos, etc. que también pueden transmitir la infección al hombre (Lang, 1990; Pascual-Velasco, 1996), si bien su importancia parece ser mucho menor. Así mismo, la infección se ha detectado en especies silvestres que podrían jugar un papel como reservorios, manteniendo y difundiendo la infección, por ejemplo, a través de las garrapatas, o directamente por contacto directo con especies domésticas. Se han involucrado diferentes especies debido a evidencias serológicas y moleculares. Así, recientemente, se ha detectado DNA de *C. burnetii* en ratones domésticos y ratones de campo en el entorno de las explotaciones ovinas de la CAPV (Barandika et al., 2007) así como en ciervos de la zona centro de España (Ruiz-Fons et al., 2008). Sin embargo, hasta la fecha se han realizado pocos estudios en animales silvestres en la CAPV, por lo que, teniendo en cuenta que los rumiantes en sistemas extensivos comparten las zonas de pastoreo con diversas especies silvestres, se desconoce el riesgo que éstas pueden suponer para la transmisión de *C. burnetii* y otros agentes patógenos a las especies domésticas.

Por otra parte, la fiebre Q está incluida en el grupo de enfermedades transmitidas por garrapatas, pero el papel de las garrapatas en la epidemiología de la fiebre Q es complejo y aparentemente su importancia radica en ser reservorios de la infección (Angelakis y Raoult, 2009). En España, los primeros aislamientos a partir garrapatas tuvieron lugar a finales de los años 40 y principios de los 50 (revisado por Pascual Velasco, 1996), siendo los principales géneros implicados *Hyalomma* (*H. marginatum* y *H. excavatum*) y *Rhipicephalus* (*R. bursa* y *R. sanguineus*). Más recientemente con la aplicación de las técnicas moleculares, se ha observado la presencia de DNA de *C. burnetii* en diversas especies de

ixódidos. Así, Toledo y cols. (2009a) en la zona centro de España encontraron positividad en un 7% de garrapatas recogidas en la vegetación, siendo las garrapatas del género *Hyalomma* las que mostraban una prevalencia más alta. En el Norte de España, por el contrario, no parece que las garrapatas jueguen un papel importante ya que la presencia de *C. burnetii* ha sido detectada a niveles mínimos (Barandika et al., 2008). La hipótesis en el momento de comenzar este estudio era que *C. burnetii* también podría estar circulando en diversas poblaciones de animales silvestres y en sus garrapatas y, por tanto, transmitir la bacteria a especies domésticas y/o a humanos, por lo que en esta tesis se ha pretendido estudiar la importancia que tiene la población silvestre en el ciclo de transmisión de *C. burnetii*.

La principal fuente de contagio de *C. burnetii* para los animales y personas es la vía aerógena, mediante la inhalación de aerosoles contaminados con *C. burnetii* eliminados al medio por animales infectados que, tras el aborto o durante la paridera, expulsan grandes cantidades de bacterias a través la placenta y fluidos fetales. Además, tras el parto (o el aborto), estos animales excretan la bacteria en la orina, heces y leche durante unos meses (Arricau-Bouvery et al., 2003a; Arricau-Bouvery et al., 2003b; Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a; Guatteo et al., 2006; Guatteo et al., 2007a), lo cual desempeña un papel primordial en la propagación de la bacteria en el medio ambiente y por lo tanto, en la transmisión de la enfermedad al hombre y a las especies animales susceptibles. Además, *C. burnetii* es muy resistente en el medio ambiente, y puede ser transportada por el viento a varios kilómetros, hecho que se ha constatado en varios estudios epidemiológicos de diversos brotes humanos (Tissot-Dupont et al., 1999; Tissot-Dupont et al., 2004). Por ello, el control de la fiebre Q en los animales domésticos es clave para reducir la incidencia de la enfermedad en humanos, por lo que es importante establecer planes de control basados principalmente en el tratamiento y en la profilaxis. El tratamiento antibiótico con oxitetraciclina se ha aplicado para reducir el número de abortos y la eliminación de *C. burnetii*, pero a la hora de comenzar esta tesis su eficacia en rumiantes no estaba claramente probada (Behymer et al., 1977; Berri et al., 2002; Berri et al., 2005b). Por ello, se planteó como objetivo no solo comprobar la eficacia del tratamiento antibiótico con oxitetraciclina en rebaños ovinos infectados, sino además comprobar la hipótesis de que la combinación de un tratamiento antibiótico basado en oxitetraciclina junto con vacunación en las siguientes parideras era una combinación adecuada para controlar la infección. Además, la vacuna en fase I (Coxevac, Ceva Salud Animal) había demostrado reducir la incidencia de los abortos, y disminuir la eliminación de la bacteria a través de fluidos vaginales, heces y leche (Arricau-Bouvery et al., 2005), con la consecuente disminución de carga bacteriana en el ambiente, por lo que se consideró que era la mejor opción para plantear un plan de control de la fiebre Q en rebaños ovinos

infectados. Esta vacuna había sido aplicada en el ganado caprino en condiciones experimentales (Arricau-Bouvery et al., 2005), y en ganado caprino y bovino infectados naturalmente (Guatteo et al., 2008; Hogerwerf et al., 2011; Rousset et al., 2009b) resultando especialmente eficaz en animales susceptibles no infectados previamente. Por ello, una de las hipótesis de partida a la hora de plantear los objetivos de esta tesis fue que el plan de vacunación en rebaños ovinos altamente infectados podría requerir más de un año, tal y como habían demostrado Camuset y Remmy (2008) en ganado bovino.

En resumen, teniendo en cuenta las hipótesis expuestas, se plantearon los siguientes objetivos específicos que han constituido el trabajo de esta tesis:

1. Actualizar la información acerca de la seroprevalencia de *C. burnetii* en el ganado ovino, bovino y caprino de la CAPV en régimen semi-extensivo.
2. Estudiar el papel de los animales silvestres y de sus garrapatas como posibles reservorios de *C. burnetii* en la CAPV.
3. Estudiar la eficacia del doble tratamiento antibiótico con oxitetraciclina al final de la gestación en la reducción de los abortos en un rebaño ovino infectado, en la reducción del porcentaje de animales eliminadores de *C. burnetii*, así como en la reducción de la carga bacteriana.
4. Estudiar la eficacia de la vacuna en fase I a corto y medio plazo para el control de la fiebre Q en rebaños ovinos naturalmente infectados, y estudio de su efecto en la reducción de la contaminación medioambiental por *C. burnetii*
5. Estudiar la eficacia de la combinación del tratamiento con oxitetraciclina y posterior vacunación en la reducción de la infección por *C. burnetii* en un periodo de cuatro años, en un rebaño ovino altamente infectado

Con los resultados obtenidos se han elaborado 6 artículos científicos, que constituyen este trabajo de tesis, realizada en el marco del subproyecto de investigación financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y titulado “Ecología y plan piloto de control de la fiebre Q en el País Vasco” (FAU2006-00002-C04-01).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Aspectos históricos de la fiebre Q

Los orígenes de la fiebre Q se remontan a 1935, cuando se produjo un brote febril entre los trabajadores del matadero situado en Brisbane, Queensland, Australia que, tras los análisis laboratoriales resultaron ser negativos a todos los patógenos conocidos hasta ese momento (Babudieri, 1959). Ted Derrick, Director del Laboratorio de Microbiología y Patología del Departamento de Salud de Queensland, inoculó sangre de estos enfermos en cobayas y éstos presentaron un cuadro febril. De estos animales infectados se extrajo sangre y otros extractos, que se volvieron a inocular en nuevas cobayas, apareciendo de nuevo la enfermedad y descubriendo de esta forma la implicación de un agente infeccioso. De este modo, Derrick en 1937 denominó a esta nueva enfermedad como Q fever (la "Q" es la abreviatura de "query" que en inglés significa interrogación o pregunta: "query fever") (Babudieri, 1959). A pesar de que se identificaron organismos similares a rickettsias en los bazos de los animales infectados en el laboratorio (Reimer, 1993), se pensó que el agente causal de esta enfermedad era un virus. Ese mismo año, en 1937, Burnet y Freeman aislaron un microorganismo a partir de los tejidos de cobayas inoculados por Derrick, al que denominaron *Rickettsia burnetii* (Reimer, 1993).

Casi al mismo tiempo, un grupo de investigadores en Nine Mile Creek liderado por Herald Cox, en Montana, USA, detectaron un agente filtrable en la garrapata *Dermacentor andersoni*. Este agente tenía características afines a los de una rickettsia y era transmisible al cobaya, el cual, tras ser inoculado con muestras sospechosas, desarrollaba fiebre y esplenomegalia. Además, un trabajador del laboratorio sufrió un cuadro similar al descrito por Derrick en Australia. Debido a la capacidad de filtrabilidad de este agente, se propuso la denominación de *Rickettsia diaporica*.

Tras sucesivas investigaciones, se observó que el organismo aislado por Cox era el mismo que se había aislado en el brote febril de Brisbane (Babudieri, 1959). Además, los investigadores australianos continuaron con sus investigaciones, destacando la habilidad del microorganismo de infectar animales silvestres (Derrick et al., 1939, Smith et al., 1940) y la posibilidad de que los artrópodos fueran vectores de la bacteria (Smith et al., 1940). Así, especularon que la garrapata *Haemaphysalis humerosa* estaba implicada en el ciclo silvestre del organismo y que podía transmitir la infección al ganado (Derrick et al., 1939). En cuanto a la transmisión de la infección a humanos, se pensó que se transmitía por picadura o, quizás, por la inhalación de polvo contaminado. En 1940, se demostró que la principal ruta de transmisión de la infección era la inhalación y que algunos casos que habían sido catalogados como "neumonía primaria atípica" podrían haber sido casos de fiebre Q.

En 1948, Cornelius B. Philip propone que *Rickettsia burnetii* sea considerada como una especie única de un género distinto, y propone el nombre de *Coxiella burnetii* para el agente causal de la fiebre Q (Marrie, 1990), en honor de Cox y Burnet. Posteriormente, el cuadro clínico característico de la fiebre Q humana descrito por Derrick en su primer trabajo, fue detallado y ampliado posteriormente por el mismo autor (Derrick, 1973).

Durante la Segunda Guerra Mundial, surgieron diversas epidemias de cuadros febriles, ocasionalmente neumónicos, que posteriormente pudieron ser clasificados como fiebre Q. Durante las sucesivas décadas, se ha ido describiendo la fiebre Q prácticamente en todo el mundo con la excepción de Nueva Zelanda (Greenslade et al., 2003).

Hoy en día, el brote de fiebre Q humana acontecido en Holanda a partir de 2007 (Roest et al., 2011b), ha tenido como consecuencia el incremento de las investigaciones realizadas sobre esta enfermedad, que en estos momentos se considera como una zoonosis re-emergente. Este hecho puede deberse a diversos factores tales como cambios epidemiológicos, cambios en la virulencia del agente, a modificaciones en el cuadro clínico, a mejoras en los métodos de diagnóstico, etc. (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). En Holanda en el año 2007 se confirmaron un total de 168 casos, en 2008 el número de casos aumentó hasta 1000 y en 2009 llegó a registrarse un total de 2357 casos, siendo este año el que presentó una mayor incidencia (EFSA, 2010) ya que en 2010 se diagnosticó un menor número de casos (508) de fiebre Q. El brote de fiebre Q en Holanda se cree que fue consecuencia del aumento del censo caprino, ya que de 5000 cabezas censadas en el año 1985, se pasó a 375000 cabezas en el año 2009 (Roest et al., 2011b). Además, el ganado caprino había experimentado varios brotes de abortos por fiebre Q durante los años anteriores, con una tasa media de abortos del 20%. Entre otros factores que podrían explicar el brote, se pueden citar la proximidad de las granjas a grandes núcleos urbanos, y la dimensión de las explotaciones, con una media de 700 cabezas por explotación, entre otros (Roest et al., 2011b).

En lo que respecta a España, en 1949 se realizaron los primeros aislamientos de *Coxiella burnetii* por Pérez Gallardo et al., (1949), cuando detectaron la bacteria en tres especies de garrapatas recogidas en animales (*Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus sanguineus*). Un año más tarde (1950), se comunicó el primer caso de fiebre Q humana en Salamanca (Prada et al., 1959) y dos años más tarde, en 1952, se detectaron anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en animales silvestres (conejos y lirones) de Madrid (Pérez-Gallardo et al., 1952). Ya a partir de la década de los ochenta, comenzó a diagnosticarse la enfermedad en humana en diversas zonas de España (Téllez

et al., 1988), entre las cuales se encontraban Madrid (Hellín et al., 1981), Barcelona (Mensa et al., 1983; Prats et al., 1982; Villalta et al., 1981), Badajoz (Sáenz de Santamaría et al., 1983) y Sevilla (Martínez-Luengas et al., 1958), entre otras. Además, muchos de los casos descritos presentaban manifestaciones clínicas poco frecuentes, lo que demostraba la diversidad clínica de la fiebre Q. Cabe destacar que el primer gran brote epidémico de fiebre Q en España fue en la CAPV en 1981, más concretamente en Murgia (Álava) (Ruiz-Téllez et al., 1985) con un total de 63 personas afectadas en 3 semanas. Al año siguiente, entre marzo y mayo de 1982, se describe otro segundo brote epidémico de fiebre Q en Balmaseda (Bizkaia), con 42 casos de fiebre Q aguda. En 1983, se diagnostican en Bilbao 25 casos más (Montejo et al., 1985). La confirmación de 249 casos de fiebre Q entre los años 1981 y 1985 (González, 1995), indicaba la alta incidencia de la enfermedad en el País Vasco. Además, el 6% de los casos fueron confirmados como fiebre Q crónica. Ya en la década de los noventa son numerosas las publicaciones de casos aislados de fiebre Q en diversas Comunidades Autónomas (González, 1995).

Hoy en día, a pesar de que el número de casos de fiebre Q que se declara en España es mayor que los casos declarados de otras zoonosis bacterianas, como por ejemplo la brucelosis o la listeriosis, la financiación concedida para I+D en temas relacionados con la fiebre Q es mucho menor (Bartolomé-Álvarez et al., 2010).

II.2 Clasificación taxonómica de *C. burnetii*

Coxiella burnetii fue clasificada inicialmente dentro del orden *Rickettsiales*, familia *Rickettsiaceae* junto con los géneros *Rickettsia* y *Rochalimaea*. Tras el posterior análisis de la secuencia de rRNA 16S (Weisburg et al., 1989), la bacteria fue reclasificada dentro de la subdivisión de las gamma proteobacterias, en el orden *Legionellales* y en la familia *Coxiellaceae* (Tabla II.1).

Tabla II. 1. Clasificación taxonómica de *C. burnetii*.

Phylum Proteobacteria
Clase Gammaproteobacteria
Orden <i>Legionellales</i>
Familia <i>Coxiellaceae</i>
Género <i>Coxiella</i>

A pesar de que *Coxiella* tiene un ciclo vital y estrategias parasitarias similares a otros miembros de la familia *Rickettsiae* y *Chlamydiae*, un análisis genómico reveló que sus estructuras genómicas diferían considerablemente, con un genoma de menor tamaño y con presencia de elementos genéticos móviles, entre otros (Seshadri et al., 2003).

Las especies más cercanas filogenéticamente a *Coxiella* son *Legionellae* spp y *Rickettsiella* spp (Raoult et al., 2005). Por ejemplo *L. pneumophila* y *C. burnetii* se multiplican en los fagosomas de los macrófagos alveolares del huésped y además tienen un sistema similar de secreción tipo IV Icm/Dot que favorece la multiplicación intracelular de las bacterias (Zusman et al., 2003).

Desde que *Rickettsia burnetii* pasó a llamarse *Coxiella burnetii* en 1948, ha permanecido como el único miembro del género *Coxiella*. Sin embargo, las investigaciones recientes indican que existe un mayor número de miembros en este género pero todavía no han sido cultivados o identificados. Así, se han descrito endosimbiontes, organismos similares a *Coxiella*, en varias especies de garrapatas de diversas localizaciones geográficas (Bernasconi et al., 2002; Klyachko et al., 2007; Lee et al., 2004; Mediannikov et al., 2010).

II.3 Aspectos bacteriológicos de *C. burnetii*

C. burnetii es un bacilo intracelular obligado, de pequeño tamaño, no capsulado, inmóvil y pleomórfico (0.2-0.4 μm ancho, 0.4-1.0 μm de largo), y que se multiplica en gran número en el interior de los fagolisosomas celulares. Esto es debido a la capacidad que tiene la bacteria para desenvolverse en un pH ácido, sin embargo, este organismo no es capaz de desarrollar su metabolismo en un medio con un pH neutro. Por otra parte, posee actividad superóxido-dismutasa, ácido fosfatasa y catalasa, enzimas que le permiten evadir la actividad microbicida de los macrófagos, ya que inhiben los intermediarios reactivos del oxígeno secretados por los macrófagos para combatir la infección. Además, es capaz de generar aniones superóxido a un pH de 4.5 pero no a pH de 7.4 (Akpориaye y Baca, 1983). Todas estas características confieren a *C. burnetii* la capacidad de poder resistir en el interior del fagolisosoma.

Aunque posee una pared celular similar a las bacterias gram-negativas, con dos membranas, una interior y otra exterior en la que se sitúan los determinantes antigénicos responsables de la variación de fase de la bacteria, que posteriormente se describirá, posee otra tercera capa central electrodensa, compuesta por péptidoglicano, adherida a la cara interna de la membrana exterior. Todo ello influye en su capacidad para poderse visualizar e identificar mediante tinciones, así el resultado de la técnica de tinción de Gram, generalmente, no es concluyente (Maurin y Raoult, 1999); sin embargo, sí que es susceptible de teñirse por los métodos Giemsa, Machiavello, Giménez y Stamp.

Esta bacteria puede presentarse en tres diferentes variantes: variante celular grande (large cell variant, LCV), variante celular pequeña (small cell variant, SCV) y célula pequeña y densa (small dense cell, SDC). Las variantes SCV y las SDC están consideradas como formas de resistencia extracelular, y muestran una gran resistencia a las radiaciones ultravioleta, al calor, a la desecación, a la sonicación y a la presión (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Este apartado se explicará con más detalle en la siguiente sección.

C. burnetii posee un cromosoma circular de aproximadamente 2Mb, y un genoma reducido resultado de una fuerte selección genética que le permite mantener un ciclo evolutivo característico, así como mecanismos de patogénesis complejos. La mayoría de los aislados presentan en su genoma de uno a cuatro plásmidos de 32-51kb que suponen el 2% de la información del genoma. Las cepas que no contienen ningún tipo de plásmido, sin embargo, tienen integrada en el cromosoma una secuencia de 16kb parecida a la de un plásmido (Mallavia, 1991). Los cuatro plásmidos se denominan QpH1, QpRS, QpDG y QpDV, y la secuencia que se encuentra insertada en el genoma de la cepa sin plásmidos, se denomina 'QpRS-like plasmid'. El genoma posee un contenido de G+C de 43% y tiene aproximadamente unas 2134 secuencias codificantes de las cuales 719 (33.7%) no presentan ninguna similitud con otros genes descritos (Hoover et al., 1992; Seshadri et al., 2003). Tras la secuenciación del genoma de *C. burnetii*, se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de los diferentes mecanismos moleculares que intervienen en la virulencia de esta bacteria. Se han identificado numerosos pseudogenes que indican que la reducción del genoma es un proceso que se ha llevado a cabo recientemente (Seshadri et al., 2003) ya que genes que tenían funciones importantes han ido acumulando mutaciones y al final han ido desapareciendo debido a la pérdida de funcionalidad. La presencia de numerosas secuencias de inserción (IS) y de repeticiones palindrómicas, sugieren una gran plasticidad en el genoma. Se han identificado genes implicados en la adhesión, invasión y detoxificación, genes que codifican los componentes para llevar a cabo un sistema similar de secreción de tipo IV Icm/Dot, y genes que codifican para las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y ácido fosfatasa. Estos genes junto con el LPS de la membrana y los plásmidos presentes en el genoma representarían los principales factores de virulencia de *C. burnetii* (Ghigo et al., 2009).

II.3.1 Variación antigénica de *C. burnetii*

Se ha observado que varias cepas de *C. burnetii* tienen variaciones antigénicas en el lipopolisacárido (LPS) de la membrana exterior denominadas "variación de fase", fenómeno similar al que ocurre en algunas enterobacterias, en el que se da la transición de un

lipopolisacárido liso a uno rugoso (Baca y Paretsky, 1983), y que es detectable mediante métodos serológicos (Brezina, 1958). Cuando *Coxiella* expresa un LPS completo, la bacteria se encuentra en fase I, que es la forma virulenta, altamente infectiva y que se aísla principalmente de huéspedes infectados (animales, artrópodos, o humanos infectados) (Fournier et al., 1998). En contraste, cuando *C. burnetii* se propaga en un cultivo celular o en huevos embrionados, tras numerosos pases, su membrana externa sufre una serie de variaciones y se transforma en la fase II, no patogénica. Este paso está caracterizado principalmente por la pérdida gradual de los azúcares metilados virensa y dihidrohidroestreptosa (Slaba et al., 2003), así como de otros azúcares componentes del antígeno O del LPS.

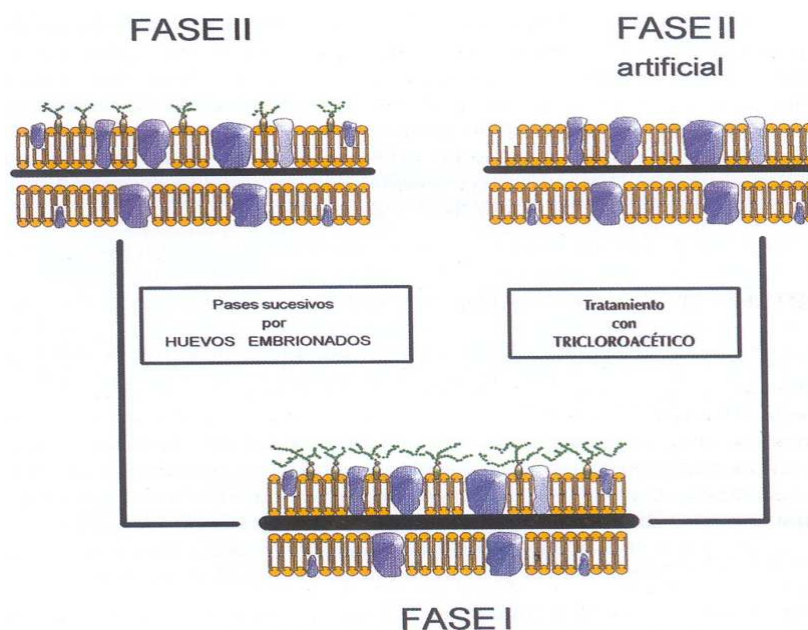


Figura II. 1. Variación antigénica de *C. burnetii* (imagen obtenida de Pascual Velasco, 1996).

Asimismo, durante la variación de fase (Figura II.1) se producen deleciones cromosómicas que provocan cambios irreversibles en la composición del LPS (Fournier et al., 1998). Diversos estudios han mostrado que si se hace un número suficientemente grande de pases a través de huevos embrionados, todas las bacterias pasan de fase I a fase II, y al reinocularlas en un animal no vuelven a transformarse en fase I. Sin embargo, si el número de pases no es el suficiente y quedan bacterias en fase I, cuando éstas vuelven a ser reinoculadas en un animal, es posible recuperar las bacterias de nuevo en fase I.

II.3.2 Fases de *C. burnetii* en el ciclo intra y extracelular

Tal y como se ha comentado anteriormente, *C. burnetii* presenta tres tipos de variantes celulares: la variante celular grande (LCV), la variante celular pequeña (SCV) y la célula

pequeña y densa (SDC). Estas tres variantes se diferencian por sus características morfológicas, antigénicas y metabólicas así como por el diferente grado de resistencia a los agentes físicos y químicos (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Las LCVs comparten, como se ha comentado anteriormente, características similares a las bacterias gram negativas, con cromatina difusa y una membrana citoplasmática interna y otra externa con el LPS expuesto en la superficie. Además, son estructuras intracelulares ovaladas con un tamaño de 2 μm de largo mientras que las SCVs y SDCs son las formas extracelulares de la bacteria, alargadas con aproximadamente un tamaño de 0.45 μm de largo y un nucleóide electrodenso (Figura II.2) (McCaul y Williams, 1981). Otra diferencia entre las LCVs y las SCVs, es que las SCVs contienen en el espacio periplásmico un material compuesto por peptidoglicano y proteínas, lo que le podría conferir la alta estabilidad ambiental que presenta en comparación con las LCVs (McCaul y Williams, 1981). Más concretamente, en un estudio realizado por Amano et al. (1984), se demostró que las LCVs tenían solo un 2% de peptidoglicano mientras que las SCVs contenían un 32%, lo que podría explicar la susceptibilidad de las LCVs a la lisis por choque osmótico. Las formas SDCs son morfológicamente similares a las SCVs, pero se pueden llegar a diferenciar por su forma. Las SDCs se pueden visualizar dentro de las LCVs como endosporas, que se pueden liberar tras la lisis de las LCV o cuando se produce fisión binaria, como se puede apreciar en la Figura II.3.

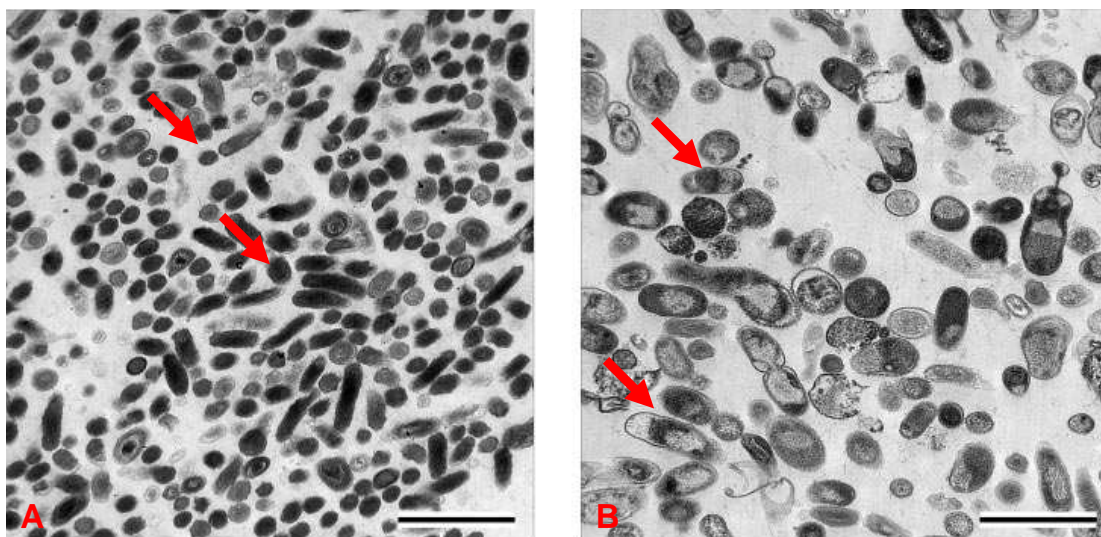


Figura II. 2. Microfotografías electrónicas de las formas A) SCVs y B) LCVs (imágenes obtenidas de Coleman et al., 2007).

La formación de un tipo u otro de variante celular se asocia a la estrategia que ha desarrollado la bacteria para poder sobrevivir tanto en el exterior como en el interior de la célula. Estas tres variantes expresan diferentes proteínas específicas que son reconocidas

por los anticuerpos que se producen durante la infección por *C. burnetii*. Estos antígenos expresados permiten a la bacteria escapar de la respuesta inmune y sobrevivir dentro del endosoma ácido. Hoy en día, se conoce bien el paso de SCV a LCV (Howe y Mallavia, 2000), pero no se han llevado a cabo estudios acerca de la causa del origen de la formación de SCV y SDC. Asimismo, también se desconoce qué variante celular de la bacteria es excretada al medio a través de la leche, heces o placenta.

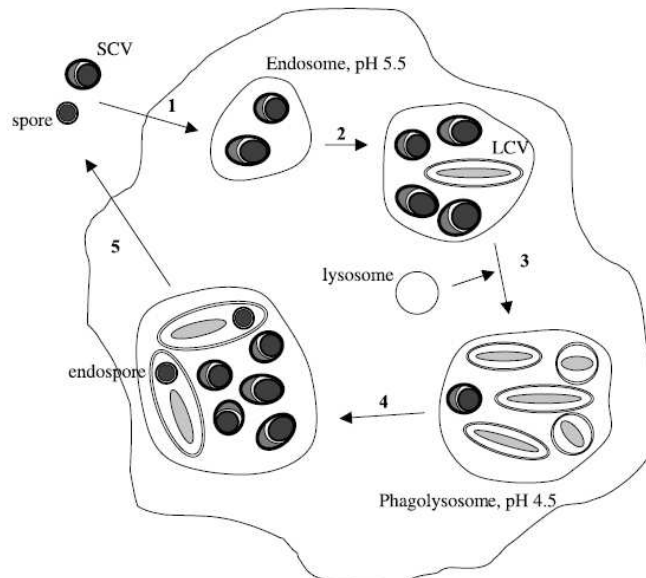


Figura II. 3. Ciclo de desarrollo de *C. burnetii* en una célula eucariota (imagen obtenida de Arricau-Bouvery y Rodolakis et al., 2005).

El ciclo de desarrollo de *C. burnetii* comienza con la entrada de las SCVs y SDCs en la célula eucariota por endocitosis (1) (Baca y Paretsky, 1983) (Figura II.3) acidificando el endosoma hasta un pH de 5.5. Posteriormente, las SCVs se multiplican por fisión binaria y comienzan a diferenciarse en LCVs (2). Transcurridas dos horas tras la internalización, el fagosoma que contiene formas LCV se fusiona con los lisosomas que acidifican el medio hasta un pH de 4.5 aproximadamente (3), pH necesario para que *C. burnetii* active su metabolismo (Heinzen et al., 1999) y las LCVs se multipliquen por fisión binaria, proceso que dura entre uno y dos días. Las formas LCV predominan durante los siguientes cuatro días, durante los cuales experimentan un aumento exponencial del crecimiento. La fase estacionaria se observa aproximadamente seis días después de la entrada de *Coxiella* en el huésped y coincide con la transformación a formas SCVs, con el desarrollo de endosporas (SDCs) en uno de los polos de las LCVs (4) y con una disminución de la actividad metabólica (Coleman et al., 2004). Por último, se produce la liberación de las esporas (SDC) y de las SCVs fuera de la célula (5).

II.3.3 Características de resistencia de *C. burnetii*

La alta resistencia medioambiental que posee esta bacteria es debida principalmente a su capacidad para diferenciarse en variantes SDC, que es estable en el medioambiente y es la forma fagocitada por los macrófagos durante las primeras fases de la infección. Esta endospora presenta una alta resistencia a diferentes agentes físicos y químicos (Babudieri, 1959). Resiste elevadas temperaturas (Ransom y Huebner, 1951), a la desecación, al choque osmótico (McCaul y Williams, 1981), a la luz ultravioleta y a diversos desinfectantes tales como el hipoclorito al 0.5%, lysol al 5% y formol al 5% durante 24 horas a 24°C, que no eliminan completamente la bacteria (Ransom y Huebner, 1951; Scott y Williams, 1990). Sin embargo, existen otros compuestos químicos como el etanol al 70% y el cloroformo al 5%, que aplicados durante media hora inactivan completamente la bacteria (Scott y Williams, 1990). Aparte de la gran resistencia de la bacteria, la eficacia de estos desinfectantes químicos se puede ver afectada por el contenido de materia orgánica presente en el medio, procedente de los tejidos, fluidos de los partos y de las heces, que podría neutralizar la acción germicida de estos productos.

Coxiella puede mantenerse viable durante 4 meses en el suelo a temperatura ambiente, en la lana 9 meses, en el agua corriente hasta 36 meses y en las heces de garrapatas puede sobrevivir hasta casi 2 años (revisado por Pascual-Velasco, 1996). Además, también es capaz de resistir bajas temperaturas, por ejemplo es capaz de resistir a -20°C más de 2 años (Babudieri, 1959). También se ha detectado *C. burnetii* en diferentes tipos de productos de origen animal como huevos, mayonesa (Tatsumi et al., 2006), productos lácteos (mantequilla, queso fresco que permanece al menos 42 días) y carne fresca donde se ha detectado la bacteria hasta al menos 1 mes a 4°C. Además *C. burnetii* también puede permanecer viable en la ropa en condiciones de alta humedad, bajas temperaturas y sin exposición directa al sol (EFSA, 2010).

Debido a la alta resistencia de *Coxiella*, a su alta infectividad y a su transmisión por medio de aerosoles, y a que le afectan muy poco los cambios ambientales extremos, esta bacteria ha sido clasificada en la categoría B de armas biológicas (Madariaga et al., 2003).

II.3.4 Tipado de cepas

Aunque solo se ha descrito un serotipo de *C. burnetii*, hay una gran variedad de cepas de las que se han descrito diferencias tanto antigénicas como genéticas.

Para diferenciar y caracterizar los aislados se han empleado diversas técnicas de genotipado tales como el análisis de la longitud de los polimorfismos mediante enzimas de restricción (PCR-RFLP) (Andoh et al., 2004; Spyridaki et al., 1998; Stein et al., 1992), utilizando los genes *icd* y *com 1* (Andoh et al., 2004; Nguyen et al., 1999). Otro método empleado es la técnica de campo pulsado (PFGE), que requiere de una buena separación de los diferentes fragmentos (Heinzen et al., 1990; Jäger et al., 1998). Por ejemplo, el aislado Heizberg fue clasificado en el grupo 1 por el grupo de Thiele et al. (1993) mientras que otro grupo (Jäger et al., 1998) lo clasificó dentro del grupo 2, revelando la dificultad de esta técnica para comparar resultados obtenidos entre diferentes investigadores. Otra técnica que se emplea para caracterizar los aislados de *C. burnetii* es la IRS-PCR (fragmentos de restricción infrecuentes-PCR) (Arricau-Bouvery et al., 2006), basado en la amplificación selectiva de secuencias de DNA con fragmentos de restricción infrecuentes, mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas que permiten incluir en el DNA de *C. burnetii* adaptadores complementarios a los cebadores que se van a emplear. Sin embargo, esta técnica es difícil de estandarizar lo que impide disponer de una base de datos que permita comparar los diferentes genotipos identificados.

Recientemente se han descrito dos nuevos métodos para tipificar *C. burnetii* sin la necesidad de cultivar la muestra previamente: la técnica MST (Multispacer Sequence Typing) y el método MLVA (Multiple Loci Variable number of tandem repeats Analysis). La técnica MST esta basada en la secuenciación de diferentes regiones intergénicas que permite separar los aislados según los diferentes tipos de secuencias que muestran en las diferentes regiones. La razón para secuenciar estas regiones es que éstas son potencialmente variables y están sujetas a una menor presión que los genes que están adyacentes. Así Glazunova et al. (2005), tras elegir las 10 regiones intergénicas que mostraron más variabilidad entre las 68 analizadas, observaron que los 173 aislados analizados mostraban 30 genotipos diferentes que se agrupaban en 3 grandes grupos. Por otra parte, el método MLVA permite la detección de los polimorfismos en las secuencias repetidas en tándem en el DNA. Se han descrito un total de 17 marcadores diferentes para las repeticiones de minisatélites y microsatélites (Arricau-Bouvery et al., 2006). Con estos marcadores se han podido diferenciar 11 genotipos diferentes en 14 aislados de *C. burnetii* mientras que con la técnica IRS-PCR solo se identificaron 6 genotipos diferentes. Esta técnica (MLVA) se usa ampliamente hoy en día como método de tipificación (Andoh et al., 2004; Arricau-Bouvery et al., 2006; Chmielewski et al., 2009; Klaassen et al., 2009; Roest et al., 2011a; Svraka et al., 2006). A pesar de que tanto la técnica MST como la MLVA tienen un alto poder discriminatorio, la técnica MLVA es superior al MST (Arricau-Bouvery et al., 2006). Además, la técnica MLVA es menos laboriosa y no es necesario secuenciar.

Además, con estas dos técnicas se puede analizar el DNA que ha sido extraído a partir de muestras recogidas de animales, como moco vaginal, leche y heces, sin la necesidad de aislar la cepa previamente. De esta manera, se puede analizar la circulación de *C. burnetii* dentro de un mismo rebaño o en diferentes rebaños, permitiendo elucidar cuales son las cepas predominantes en un área determinada. Existe un estudio (Duquesne et al., 2007, citado por Rodolakis, 2009b) en el que se observó que dos cepas diferentes pueden estar presentes en el mismo rebaño e incluso en el mismo animal, sugiriendo que un animal infectado por una cepa podría volverse a infectar por otra cepa. Sin embargo, tras la infección experimental de ratones con una cepa ovina, se observó que ésta inducía la inmunización necesaria para proteger al animal de otra infección producida por otra cepa diferente de origen bovino (Rodolakis y Cochonneau, 2011). Por lo que la única manera de encontrar 2 cepas distintas en el mismo animal, sería por la coinfección simultánea con ambas cepas.

Actualmente, se están llevando a cabo estudios en los que se ha puesto a punto la técnica de tipado conocida como SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Hermans et al., 2011; Hornstra et al., 2011; Huijsmans et al., 2011), considerada como una técnica rápida, sensible, fácil de llevar a cabo y que consiste en la detección de la variación de una sola base en una determinada secuencia de DNA. Esta técnica se ha usado para tipar directamente *C. burnetii* en muestras animales y ha sido aplicada recientemente para establecer los diferentes genotipos implicados en el brote de fiebre Q humana en Holanda (Huijsmans et al., 2011). Además, con esta técnica se ha descrito por primera vez la detección en leche de DNA procedente de la vacuna inactivada en fase I, en animales recientemente vacunados (Hermans et al., 2011).

II.3.5 Tropismo tisular

Se ha demostrado que *Coxiella burnetii* tiene una gran afinidad por los fagocitos mononucleares y por tanto durante la fase aguda de la enfermedad se puede encontrar en órganos como el bazo, hígado y médula ósea (Baca y Paretsky, 1983). Un claro ejemplo de esto se puede observar en un ensayo realizado en ratones, en el que se demostró que los bazos de los animales infectados tenían una concentración 20 veces mayor de *C. burnetii* que otros órganos (Zhang et al., 2005). Además, el número de bacterias en el bazo permaneció elevado durante 13 días una vez que la infección se había establecido mientras que en la sangre o en el pulmón los niveles de infección eran relativamente bajos (Zhang et al., 2005). Estas evidencias indican que el principal órgano de replicación de la bacteria en animales no gestantes podría ser el bazo.

Sin embargo, en animales gestantes, *C. burnetii* parece que muestra una preferencia por los tejidos del aparato reproductivo. Las células trofoblásticas de la membrana corioalantoidea de la placenta fueron las primeras en mostrar la infección en cabras gestantes infectadas experimentalmente con *Coxiella* (Sánchez et al., 2006). Además, se demostró que había una multiplicación masiva de la bacteria en los cotiledones de la placenta en la última semana de gestación, proliferación que coincidió con el periodo de abortos. Se cree que podría existir cierta correlación entre el nivel de hormonas de animales gestantes y la multiplicación de *C. burnetii* (Biberstein et al., 1974), que podría quizás ayudar a explicar el tropismo de *C. burnetii* por determinados órganos o tejidos.

II.4 Respuesta inmune frente a *C. burnetii*

Desde siempre se ha pensado que la inmunidad mediada por anticuerpos protege al organismo frente a patógenos extracelulares y que la respuesta celular es exclusiva de las infecciones causadas por patógenos intracelulares. Recientemente, se ha observado que este paradigma no es cierto y que los anticuerpos juegan un importante papel en la protección frente a un gran número de patógenos intracelulares (Casadevall y Pirofsky, 2006), entre ellos *C. burnetii*. Por lo que tanto la respuesta celular como la humoral son importantes para combatir la infección por *C. burnetii*, jugando la respuesta celular el papel principal en eliminar *C. burnetii* mientras que los anticuerpos específicos acelerarían este proceso (Zhang y Samuel, 2004).

Tras la infección por *C. burnetii* los anticuerpos se detectan a las 2 o 3 semanas (Plommet et al., 1973; Arricau-Bouvey et al., 2003b). El título de anticuerpos aumenta durante 3 ó 4 meses y después puede permanecer hasta 15 meses post-infección. En animales infectados naturalmente, es importante destacar que existen animales (Berri et al., 2002), que no seroconvierten y sin embargo eliminan la bacteria. Esto podría achacarse a un fallo en el desarrollo de la respuesta humoral contra *C. burnetii*.

La inmunidad humoral también parece importante a la hora de desarrollar una resistencia adquirida (Zhang y Samuel, 2004), ya que cuando se inoculan animales experimentales con *C. burnetii* a la par que se administran anticuerpos, estos animales no se infectan (Peacock et al., 1983). La mayoría de las vacunas que se han desarrollado hasta el momento inducen una respuesta humoral contra los antígenos de *C. burnetii* (Arricau-Bouvey et al., 2005; Behymer et al., 1976; Biberstein et al., 1977; Brooks et al., 1986), por lo que es de vital importancia conocer como actúa la inmunidad mediada por anticuerpos a la

hora de desarrollar una vacuna. Por lo que se sabe, la producción de anticuerpos específicos acelera la eliminación de la bacteria, pero, sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales los anticuerpos confieren protección (Shannon y Heinzen, 2008). Por ejemplo, se ha comprobado que la opsonización por anticuerpos no afecta directamente a la viabilidad o a la replicación intracelular de *C. burnetii* en estudios realizados in vitro (Shannon et al., 2009), ya que el mecanismo de opsonización consiste principalmente en marcar a un patógeno para que posteriormente sea destruido en los fagolisosomas, compartimento donde se replica *C. burnetii*. También, en este estudio se ha observado que el complemento no es una vía importante en la adquisición de inmunidad frente a *C. burnetii*.

La respuesta celular parece crucial en la eliminación de la bacteria. Este tipo de respuesta activa a los monocitos y macrófagos mediante el interferón- γ (IFN- γ) produciendo nitrógeno reactivo e intermediarios de oxígeno que promueven la muerte intracelular de *C. burnetii* (Waag, 2007). Además, el IFN- γ también afecta a la conversión del fagosoma que contiene *C. burnetii* en fase I, ya que en presencia de IFN- γ , el fagosoma se fusiona con los lisosomas pero no se acidifica el pH vacuolar, y por tanto, no se puede llevar a cabo la replicación de la bacteria (Ghigo et al., 2009). También se ha observado que el IFN- γ aumenta la expresión de las moléculas de adhesión celular en las células inmunes aumentando su extravasación desde las áreas vasculares a los sitios de inflamación (Andoh et al., 2007). De igual forma, las células T activadas mejoran la actividad microbicida de los macrófagos, favoreciendo la eliminación de la bacteria. En cabras gestantes experimentalmente inoculadas con *C. burnetii*, se detectó una fuerte respuesta de células T en las áreas interplacentarias, pero no en los placentomas donde solo algunos neutrófilos y macrófagos estaban asociados con las lesiones. Esta respuesta inmune observada en las áreas interplacentarias podría haber prevenido la diseminación de la bacteria a otros órganos (Sánchez et al., 2006). De esta forma, las células T y el IFN- γ representan los principales componentes del sistema inmune frente a la infección por *C. burnetii* según se desprende de experimentos realizados con ratones infectados, ya que aquellos que no presentaban la capacidad de sintetizar células T, presentaban grandes cantidades de *C. burnetii* en el bazo e infecciones persistentes durante largos periodos de tiempo, y los ratones que no sintetizaban IFN- γ presentaban una alta mortalidad y/o menor longevidad cuando eran inoculados con *C. burnetii*.

Por otra parte, las células B tienen un importante papel en la protección de los tejidos, por lo que parecen regular los fenómenos de inflamación en la infección por *C. burnetii* (Andoh et al., 2007). Las células Th1 son esenciales para la activación de los macrófagos y

por tanto para eliminar la infección. Como se ha observado, los macrófagos tienen un papel importante en el desarrollo de protección frente a *C. burnetii*. Las citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 12 (IL-12), son secretadas por los macrófagos y son capaces de modular la respuesta celular (Norlander, 2000).

El papel de la respuesta celular tras la vacunación se ha estudiado principalmente en ratón. El traspaso de esplenocitos de ratones vacunados con una vacuna en fase I a ratones sin infectar les confirió protección contra la infección con una cepa virulenta, sugiriendo que la respuesta celular juega un papel importante (Zhang et al. 2007), por lo que se requiere de respuesta inmune mediada por células para la eliminación de la infección por *C. burnetii*, y, además se requiere de la actividad del IFN- γ para controlar la replicación de la bacteria (Andoh et al., 2007). Este tipo de respuesta celular se puede valorar en los rumiantes usando la intradermoreacción o “skin test” o a través de la prueba del interferón- γ .

II.5 La fiebre Q en humana

La fiebre Q ha sido descrita en la mayoría de los países (Figura II.4). Las únicas regiones que están consideradas como libres de fiebre Q son la Antártida (Woldehiwet, 2004) y probablemente Nueva Zelanda (Greenslade et al., 2003).

Sin embargo, la fiebre Q no está incluida en la lista de enfermedades de declaración obligatoria en muchos países, por lo que no se sabe con exactitud la verdadera extensión y distribución de la enfermedad (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Fournier et al., 1998). No obstante, es considerada como un problema de salud pública en numerosos países europeos como Francia, Holanda, Reino Unido, Italia, Alemania y Grecia, además de España (EFSA, 2010). Inicialmente estaba considerada como una enfermedad ocupacional, que afectaba a personas que estaban en contacto con animales domésticos. Así, se incluía dentro del grupo de personas de riesgo a ganaderos, veterinarios, trabajadores de matadero y de industrias lácteas, y personal de laboratorios. Sin embargo, también se ha observado un aumento de casos esporádicos en áreas urbanas, en personas que habían tenido un contacto ocasional con animales de granja o que habían estado en contacto con perros o gatos infectados (Maurin y Raoult, 1999).

En América, se han detectado seroprevalencias del 17% en Canadá (Marrie y Fraser, 1985) y del 22.2% en Estados Unidos (Whitney et al., 2009); en Asia, y más concretamente en Japón, se detectaron anticuerpos en el 13.5% de la población estudiada (Abe et al.,

2001) y en la India se ha demostrado que la infección esta muy extendida en todo el país (Stephen y Achyutha, 1980). En África, el 25.0% de la población egipcia presentaba anticuerpos frente a *C. burnetii* (Botros et al., 1995), en Túnez un 26.0% (Letaief et al., 1995), mientras que en Marruecos únicamente un 1.0% era seropositivo (Meskini et al., 1995). En Europa, existen países que presentan una elevada seroprevalencia frente a *C. burnetii*, como es el caso de países como Holanda con un 83.8% (van den Brom y Vellema, 2009), Chipre con un 52.7% (Psaroulaki et al., 2006), Bosnia-Herzegovina con un 34.2% (Sukrija et al., 2006) y Francia con un 23.0% de individuos seropositivos (Maurin y Raoult, 1999). Países como Inglaterra, Polonia y Croacia han presentado tasas entre el 12.8 y el 18.0% (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; McCaughey et al., 2008; Medic et al., 2005). Por último, en Grecia e Irlanda las seroprevalencias encontradas están alrededor del 8% (Pape et al., 2009, Reid y Malone. 2004). Sin embargo, estos datos no son comparables entre sí, ya que los diferentes estudios han sido realizados con diferentes pruebas serológicas (FC, Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA) y los grupos de población analizados son tanto personas que desempeñan una ocupación de riesgo (veterinarios, granjeros, personal de laboratorio...), como donantes de sangre, personas involucradas en un brote de fiebre Q, o grupos de población sana. Además, se ha de tener en cuenta que tanto el diseño de los muestreos como los tamaños muestrales son muy diferentes.

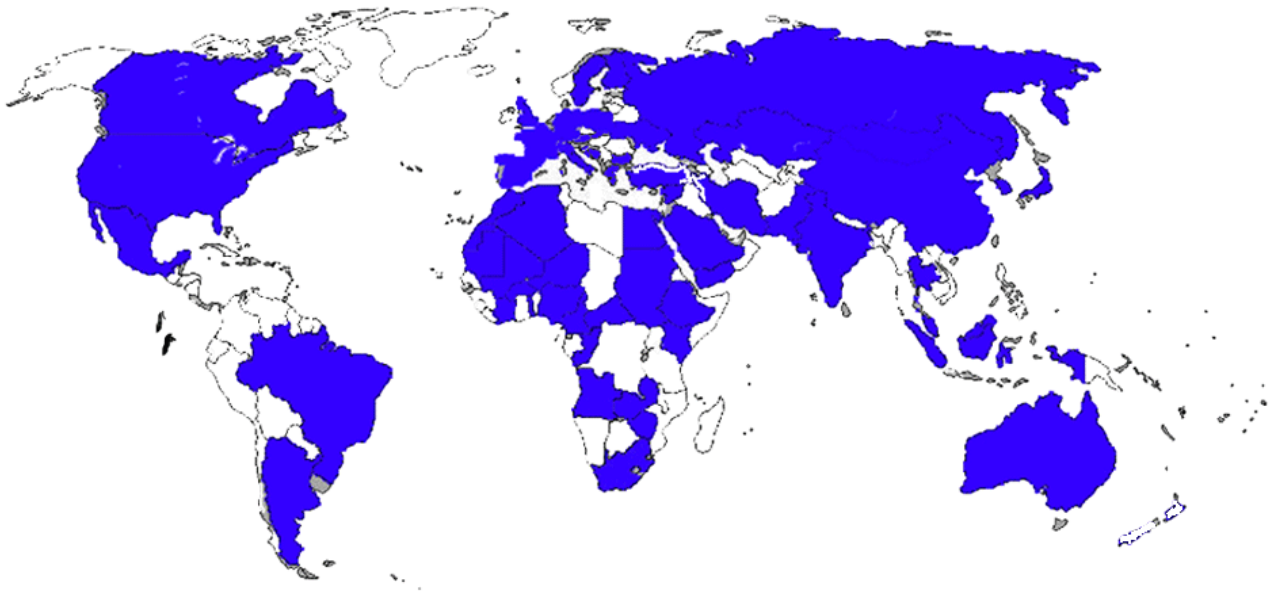


Figura II. 4. Distribución mundial de la fiebre Q (elaboración propia).

En España se han realizado varios estudios de seroprevalencia de la fiebre Q en varias comunidades autónomas (Tabla II.2). Existen estudios desde la década de los 70, donde Aparicio-Garrido et al., (1970) tras realizar una encuesta epidemiológica en la

población humana de Madrid, observó una seroprevalencia del 11.7%. En la CAPV, tras el brote de Murgia (Álava) en 1981, se comenzaron a realizar diferentes estudios de seroprevalencia. Así, un estudio realizado en la población autóctona de la zona del brote y en la población urbana, reveló la presencia de anticuerpos en el 28.5% de la población de Murgia frente a la ausencia de seropositividad en la población urbana (Ruiz-Téllez et al., 1985). Posteriormente, en un estudio realizado en 8 localidades del CAPV, se registraron tasas de seroprevalencia comprendidas entre el 0 y el 28%, siendo la tasa de seroprevalencia del 11.4% en Bilbao (Cisterna, 1983). Alayo, en 1989, encontró seroprevalencias que variaban entre el 5.7% en Bilbao al 30.2% en Encartaciones (González, 1995). En 1993, Sanzo et al., (1993) observaron que el 38.5% de la población estudiada de la CAPV presentaban anticuerpos frente a *C. burnetii*. En trabajos más recientes realizados en Gipuzkoa, entre 1984 y 2004 se diagnosticaron por serología 1261 casos (Montes et al., 2006), siendo la tasa anual de incidencia de fiebre Q elevada.

Tabla II. 2. Algunos estudios de seroprevalencia de la fiebre Q humana en España.

Comunidad Autónoma	Año estudio	Personas analizadas	% seroprevalencia humana	Técnica	Referencia
Albacete	2004/05	863	23.1	IFI	Bartolomé et al., 2007
Barcelona	2004/05	216	15.3	IFI	Cardeñosa et al.,2006
Cáceres	1988	180	59.3	FC	Cour et al., 1990
Cantabria	1998	595	48.6	IFI	Pascual-Velasco et al.,1998
Cataluña	1988	1253	13.4	FC	Ausina et al., 1988
Guadalajara	1988	36	33.3	FC	Cour et al., 1990
Huelva	1999	1654	5.08	IFI	Lepe et al., 1999
Islas Canarias	1998-2000	1358	23.9	IFI	Bolaños et al.,2003a
Lanzarote	1986	100	3.0	FC	Pascual-Velasco et al., 1991
León	1994	406	40.6	IFI	Suárez-Estrada et a., 1996
Madrid	1988	519	34.5	FC	Cour et al., 1990
País Vasco	1993	810	38.5	IFI	Sanzo et al.,1993
Salamanca	1990	400	50.2	IFI	Ruiz-Beltrán et al.,1990
Soria	1991	298	20.8	IFI	Saz et al., 1993
Soria	2001	253	54-66	IFI	Nebreda et al., 2001
Valladolid	1982	290	14.0	FC	Ortiz de Lejarazu et al., 1983
Zaragoza	1994/95	480	10.2-11.2	FC	Valencia et al.,2000

El País Vasco y Navarra son las comunidades donde se han descrito un mayor número de casos de fiebre Q en humanos, que los autores asociaron con zonas de mayor actividad ganadera (Téllez et al., 1988). Por el contrario, en la zona central y sur de España, la prevalencia de la enfermedad es menor (Téllez et al., 1988). Además, las manifestaciones

clínicas de los casos de fiebre Q en humana difieren de una región a otra, siendo la neumonía la manifestación más frecuente de la fiebre Q en la zona norte de España y la hepatitis la forma más predominante en el sur (Montejo et al., 1985; Téllez et al., 1988; Bolaños et al., 2003b). La CAPV es una zona endémica donde se ha descrito el mayor número de casos de neumonía debido a la fiebre Q (Montejo et al., 1985; Sanzo et al., 1991).

Respecto a las poblaciones con mayor riesgo de padecer la fiebre Q, en Holanda se ha comprobado que los veterinarios presentaban seroprevalencias de 84% y en Italia del 100%, mientras que la población en general presentaban tasas de 2.4% y 13.6% respectivamente (Monno et al., 2009; Richardus et al., 1987). También los ganaderos, agricultores, trabajadores de laboratorios, o de mataderos se consideran poblaciones de riesgo (MacKelvie et al., 1980; Maurin y Raoult, 1999; Perez-Trallero et al., 1995). No siempre es necesario el contacto directo con animales para adquirir la infección, ya que en ocasiones, la manipulación del material contaminado con heces, estiércol (Berri et al., 2003) e incluso la lana (Abinanti et al., 1955), puede ser fuente de infección. Asimismo, el frecuentar zonas con estanques donde se concentran animales y donde paren y/o defecan, supone una fuente de infección para las personas ya que existe una mayor contaminación ambiental (Raoult, 2010; Whitney et al., 2009). También se han descrito casos de brotes urbanos de fiebre Q atribuidos a la alta resistencia de *C. burnetii* en el medio ambiente (Aguirre et al., 1984; Armengaud et al., 1997; García-Clemente et al., 2007; Nebreda et al., 2001; Porten et al., 2006; Schimmer et al., 2008), y por consiguiente a la diseminación de la bacteria con el viento hasta el centro urbano (Tissot-Dupont et al., 1999; Tissot-Dupont et al., 2004). En la Tabla II.3 se puede observar diferentes brotes de fiebre Q con la fuente de infección identificada.

Aparte de la inhalación de aerosoles contaminados, también existe la posibilidad de transmisión por vía oral (Cerf y Condron, 2006), aunque esta vía de infección no está del todo clara. Existen estudios en los que se ha observado seroconversión frente a *C. burnetii* pero no síntomas clínicos en personas que han consumido leche sin pasteurizar (Benson et al., 1963, Fishbein y Raoult, 1992), pero también existen otros estudios en los que no se ha observado seroconversión alguna tras la ingesta de leche sin pasteurizar e infectada por *C. burnetii* (Krumbiegel y Wisniewski, 1970). Por otra parte, el riesgo de adquirir la infección a través del consumo de carne infectada con *C. burnetii* es incierto. Así, los trabajadores de la industria australiana de carne sufren aproximadamente unos 600 casos de fiebre Q al año, de los cuales 200 necesitan hospitalización y aproximadamente 3 mueren de fiebre Q

(McKelvie, 1980), pero no existe ningún estudio que haya confirmado que la ingesta de carne sea una fuente de infección para estos trabajadores.

Tabla II. 3. Resumen de algunos brotes publicados de fiebre Q humana y especie animal asociada.

País	Año estudio	Fuente de infección	Número de casos	Referencia
Alemania	1996	Ganado ovino	18	Schulze et al.,1996
Alemania	2003	Ganado ovino	299	Porten et al.,2006
Bosnia	1997	Ganado ovino	26	En Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005
Canadá	1984	Gatos	13	Kosatsky, 1984
Canadá	1986	Conejos	4	Marrie et al.,1986
Canadá	1996	Perros	3	Buhariwalla et al., 1996
Canadá	2000	Ganado caprino	62	Hatchette et al.,2001
Croacia	2004	Ganado ovino	14	Medic et al.,2005
Eslovaquia	1998	Ganado caprino	113	Kováčova et al.,1998
Eslovenia	2007	Ganado ovino	35	Grilc et a., 2007
España	1981	Ganado ovino	63	Ruiz-Tellez et al., 1985
España	1998	Ganado ovino	14	Nebreda et al., 2001
España	2004	Ovino y caprino	20	de los Ríos Martín et al., 2006
España	2008	Gato	6	García de Cruz et al., 2010
Estados Unidos	1981	Ganado ovino	81	Meiklejohn et al.,1981
Estados Unidos	1982	Ganado vacuno	25	Hall et al.,1982
Estados Unidos	1989	Gatos	15	Pinsky et al., 1991
Francia	1992	Ganado caprino	40	Fishbein y Raoult,1992
Francia	1995	Ganado ovino	289	En Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005
Francia	1996	Ganado ovino	204	Carrieri et al., 2002
Francia	2000	Palomas	4	Stein y Raoult, 1999
Holanda	2007	Ganado caprino	3523	Roest et al., 2011b
Inglaterra	1982	Ganado ovino	14	Hall et al.,1982
Italia	1988	Ganado ovino	235	En Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005
Italia	1993	Ganado ovino	58	Manfredi et al., 1996
Italia	2003	Ganado ovino	133	En Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005
Polonia	1996	Ganado vacuno	25	Tylewska-Wierzbanowska et al., 1996
Reino Unido	2006	Ganado ovino	110	Wilson et al., 2009
Suiza	1983	Ganado ovino	415	Dupuis et al., 1987

También se han descrito casos esporádicos de transmisión persona-persona tras el contacto directo en el parto de una mujer infectada. También se han detectado casos de transmisión de *C. burnetii* a través de transfusiones de sangre, inoculaciones intradérmicas, así como transmisión transplacentaria.

Diferentes autores estiman que entre 1 y 10 bacterias podrían provocar una infección en humanos (Maurin y Raoult, 1999). En los humanos *C. burnetii* causa manifestaciones clínicas muy variables, desde casos agudos hasta infecciones crónicas fatales, sin embargo, la mayoría de las infecciones (60%) cursan de forma asintomática, detectándose únicamente la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii* (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Maurin y Raoult, 1999).

La fiebre Q en su forma aguda tiene un periodo de incubación que oscila entre 2 y 3 semanas, dependiendo de la dosis infectiva del agente y de la edad del individuo. Comienza de una forma similar a una gripe con fiebre elevada, dolor de cabeza severo, pérdida de peso, mialgia y tos. En ocasiones se pueden observar sarpullidos en la piel, náuseas, artralgia, temblores, sudoración y fotofobia (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Puede desarrollarse una neumonía atípica, o hepatitis. La neumonía atípica generalmente aparece asociada con fiebre, dolor de cabeza y mialgia (Maurin y Raoult, 1999). La presencia de tos, no productiva, no siempre se observa, aun cuando exista neumonía. La mayoría de las personas afectadas presentan mínimos cambios a la auscultación, sin embargo en ocasiones pueden producirse alteraciones respiratorias severas. En la práctica clínica, este cuadro clínico es indistinguible del producido por otros agentes causantes de neumonía atípica. La hepatitis puede ser asintomática, caracterizándose por un aumento en el nivel de las transaminasas, que en ocasiones se acompaña de una fiebre prolongada de origen desconocido y/o hepatomegalia (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

Aproximadamente entre el 1% y el 5% de los casos, la enfermedad puede hacerse crónica, desembocando en una endocarditis fatal, en síndrome de fatiga crónica, o abortos repetidos en mujeres gestantes (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). La endocarditis es la manifestación más frecuente y más grave de la fiebre Q crónica, y representa entre el 1,5 y el 2% de los casos de endocarditis diagnosticados en el hombre; suele aparecer varios meses o años después de padecer la infección aguda, en general en personas que han padecido una valvulopatía previa (Raoult et al., 2005). El síndrome de fatiga crónica puede surgir también, varios meses o años después de haber sufrido la forma aguda de la enfermedad, y se caracteriza por la aparición de fatiga, mialgia, artralgia y sudoración nocturna (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Ayres et al., 1998). En las mujeres embarazadas, *C. burnetii* puede producir una placentitis que ocasiona el aborto, la muerte neonatal, el nacimiento prematuro y/o la reducción del peso al nacimiento (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Raoult et al., 2002). En España, por ejemplo, más de 700 mujeres abortan cada año debido a *C. burnetii* (Raoult et al., 2002).

II.6 El ciclo doméstico de la fiebre Q

C. burnetii es capaz de infectar numerosas especies animales incluyendo los grandes y pequeños mamíferos y las aves (Babudieri, 1959; Komiya et al., 2003; Marrie et al., 1986; Maurin y Raoult, 1999; Webster et al., 1995). Sin embargo, los rumiantes domésticos representan la fuente de infección más común de *C. burnetii* (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Berri et al., 2003; Woldehiwet, 2004). Si la infección se produce cuando los animales no están gestantes, la coxiellosis pasa desapercibida y los animales no muestran ningún síntoma. Pero si los animales están gestantes, tras un periodo de incubación variable, los síntomas clínicos son desordenes reproductivos tales como abortos al final de la gestación, endometritis, infertilidad, parto prematuro y un bajo peso de las crías al nacimiento (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). La placentitis es la lesión más característica. La placenta es más densa y puede contener grandes cantidades de exudado fluido amarillento o marronáceo. En ocasiones se han observado lesiones de neumonía en los fetos, sin embargo, las lesiones en fetos son poco específicas (Oporto et al, 2006).

Es importante destacar que en rumiantes previamente infectados la gestación parece ser un momento crítico para la reactivación de la infección, y excretan numerosas bacterias con la placenta y los fluidos amnióticos, tanto en el caso de que se produzca un aborto como durante el parto normal (Woldehiwet, 2004). *C. burnetii* también se puede eliminar al medio a través de otras vías como la leche, orina y heces (Berri et al., 2002; Guatteo et al., 2006; Rousset et al., 2009a).

En el ganado ovino el porcentaje de abortos no suele ser en general muy elevado (5-6%) pero en algunos casos, los abortos pueden afectar hasta el 50% del rebaño. Ocasionalmente, antes del aborto, los animales pueden estar aletargados e incluso su apetito puede verse reducido (Wouda y Dercksen, 2007), pero en la mayoría de los casos no existen síntomas previos al aborto (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). En el ganado caprino, hasta el 90% de los animales gestantes puede llegar a abortar debido a fiebre Q (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Hatchette et al., 2003; Palmer et al., 1983). Sin embargo, en la siguiente paridera tras el brote de abortos, los problemas reproductivos disminuyen, si bien en el caso de las cabras los abortos pueden volver a repetirse en sucesivas gestaciones (Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007). En el ganado bovino predominan los problemas de infertilidad, metritis y mamitis (To et al., 1998a), también se pueden ver síntomas de neumonía (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Muskens et al., 2007) y los terneros recién nacidos pueden sufrir de diarrea y problemas respiratorios (Wouda y Dercksen, 2007). Algunos de estos síntomas también se pueden observar en

perros, gatos, conejos y otras especies domésticas. En el ganado vacuno también se pueden observar infecciones crónicas como en los humanos. Así, en una infección experimental todos los animales desarrollaron neumonía menos una vaca que murió de fallo cardiaco mostrando en la necropsia degeneración y esclerosis del miocardio (Saegerman et al., 2011).

La importancia relativa de cada una de las especies de rumiantes domésticos en producir brotes de fiebre Q humana varía de unas zonas del mundo a otras, dependiendo de la actividad ganadera que se lleve a cabo. En Holanda, por ejemplo, actualmente el ganado caprino es la especie predominante en el país (Roest et al., 2011b), en Chipre predomina el ganado caprino y ovino (Psaroulaki et al., 2006) y en el norte de Irlanda el ganado vacuno y ovino (McCaughey et al., 2010). España y Reino Unido, por ejemplo, tienen los censos ovinos más altos de toda Europa. Sin embargo, en España los censos de las diferentes especies de rumiantes domésticos varían entre comunidades autónomas, mientras que en las Islas Canarias por ejemplo predomina el ganado caprino, en el País Vasco esta especie es minoritaria, predominando el ganado ovino y bovino (<http://www.marm.es>; <http://www.ine.es>). Además cabe destacar, que los pequeños rumiantes están considerados como la principal fuente de infección de *C. burnetii* en comparación con el ganado vacuno, sin embargo, existen áreas geográficas donde tanto el ganado ovino o el caprino están ausentes, y sin embargo la prevalencia de *C. burnetii* en el ganado vacuno es notable (Bosnjak et al., 2010).

La propagación de la infección entre los animales domésticos dependerá de varios factores entre los que cabe destacar el censo animal y el sistema de manejo, principalmente. La fiebre Q es principalmente una enfermedad de transmisión aerógena por lo que la infección se produce tras la inhalación de polvo o aerosoles contaminados por placentas, fluidos corporales o materia fecal infectados con *C. burnetii* y resultantes del parto o aborto (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). También se ha descrito la transmisión por vía oral, pero esta forma de transmisión no está muy bien documentada. En un estudio en el que los cabritos eran alimentados con leche de cabras infectadas, solo el 14.2% de los cabritos presentó seroconversión frente a *C. burnetii* (Berri et al., 2005b). Pero no solo hay que considerar la leche como única forma de transmisión oral, sino que recientemente también se ha identificado el riesgo de beber agua contaminada con heces de animales infectados (Czaplicki et al., 2011).

También se ha descrito la posibilidad de una transmisión sexual del agente (Kruszewska y Tylewska-Wierzbanska, 1993), ya que *C. burnetii* ha sido aislada del

semen de toros seropositivos (Kruszewska y Tylewska-Wierzbanowska, 1997). Tampoco habría que descartar la vía transplacentaria, debido a que se ha encontrado DNA de *C. burnetii* tanto en los oviductos como en los tejidos del tracto genital de cabras no gestantes (Alsaleh et al., 2011).

En la Figura II.5 se puede observar un esquema del ciclo biológico de *C. burnetii* donde aparecen representados el ciclo silvestre y el ciclo doméstico de la fiebre Q.

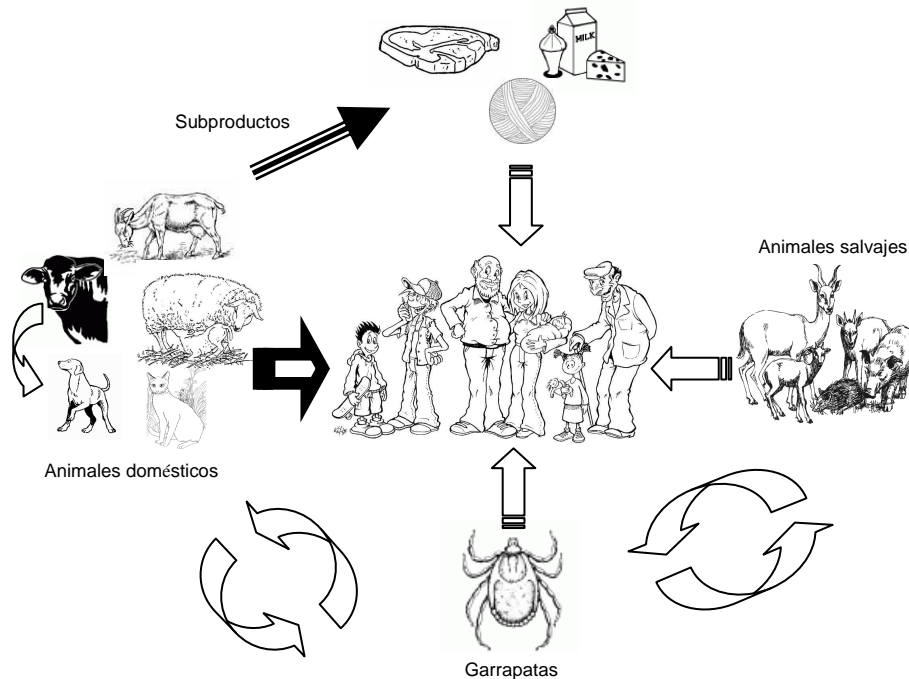


Figura II. 5. Ciclo doméstico y silvestre de *C. burnetii* (elaboración propia).

Como se ha comentado anteriormente, los principales reservorios de la fiebre Q son el ganado vacuno, ovino y caprino, hecho avalado por una gran cantidad de estudios de seroprevalencia frente a *C. burnetii* en estas especies animales, y por los seguimientos realizados durante los brotes humanos. Sin embargo, es difícil comparar los resultados entre los diferentes estudios, ya que existen grandes diferencias en los procedimientos y diseños utilizados. Así, factores como el objetivo del estudio (seguimiento de casos de abortos, de brotes humanos, programas de control, encuestas serológicas), el número de animales analizados, el tipo de muestra analizada (leche de tanque o sueros individuales) y la técnica de diagnóstico utilizada (ELISA, IFI, FC, etc.), pueden suponer un significativo efecto en la seropositividad hallada. Sin embargo, con toda la información disponible, se puede concluir que *C. burnetii* está presente a nivel mundial, pero debido a los factores mencionados, la comparación de la presencia de la infección por *Coxiella* en la población animal entre los diferentes países, está sujeta a un considerable sesgo.

II.6.1 Ganado vacuno

El ganado vacuno es una de las posibles fuentes de infección de fiebre Q para las personas (Tabla II.3). Se ha detectado la presencia de bovinos con anticuerpos frente a *C. burnetii* en los 5 continentes con rangos de seroprevalencia entre el 0.6% y el 82% (Tabla II.4).

Tabla II. 4. Resultados de diferentes estudios de seroprevalencia realizados en el ganado vacuno.

País	Referencia	Número de animales analizados	Técnica	% animales seropositivos
Chad	Schelling et al., 2003	195	ELISA	4.0
Nigeria	Adesiyun et al., 1984	306	Aglutinación	59.8
Sudan	Reinthalder et al., 1988	52	Aglutinación	40.4
Zimbawe	Rhode et al., 1993	274	IFI	41.0
Canadá	Hatchette et al., 2002	75	IFI	33.0
Colombia	Lorbacher, 1977	357	FC	25.0
México	Salinas-Melédez et al., 2002	450	ELISA	28.0
Trinidad	Adesiyun y Cazabon, 1996	256	Aglutinación	4.3
USA	Biberstein et al., 1974	1052	Aglutinación	82.0
Irán	Khalili y Sakhaee, 2009	93	ELISA	10.8
Japón	To et al., 1998a	207	IFI	60.4
Turquia	Centikaya et al., 2000	416	IFI	6.0
Albania	Cekani et al., 2008	571	ELISA	7.9
Alemania	Böttcher et al., 2011	3965	ELISA	14.8
Bulgaria	Martinov, 2007	2932	FC	10.6
Chipre	Psaraulaki et al., 2006	214	IFI	23.8
Escocia	Moffat et al., 1970	4880	FC	1.0
Holanda	Musken et al., 2007	1160	ELISA	21.0
Irlanda	McCaughey et al., 2010	5182	ELISA	6.2
Italia	Cabassi et al., 2006	600	ELISA	22.0
Australia	Banazis et al., 2010	329	ELISA	0.6

En lo que se refiere a España, en la mayoría de las comunidades autónomas donde existen estudios acerca de la seroprevalencia de *C. burnetii* en ganado bovino, se encuentran en general porcentajes de seroprevalencia bajos (Tabla II.5). Sin embargo, llama la atención la alta seroprevalencia observada en la Comunidad de Madrid (66.9%) (Palau et al., 1989) o en Cádiz (39%) (Ruiz-Fons et al., 2008), lo que postularía al ganado vacuno como una de las posibles fuentes de infección en determinadas zonas.

Desde el punto de vista epidemiológico hay varios aspectos que hay que destacar. En el ganado vacuno se ha descrito la existencia de animales crónicamente infectados, y

que eliminan la bacteria de forma prolongada a través de la leche durante varios meses y años sucesivos (Maurin y Raoult, 1999; Guatteo et al., 2006).

Tabla II. 5. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia publicados en España en rumiantes domésticos.

	Zona geográfica	Año	Técnica	% Seroprevalencia	Referencia
Ganado ovino					
	Bizkaia	1985	FC	1.75	Pascual Velasco, 1996
	Gran Canaria	2007-08	ELISA	31.7	Rodríguez et al., 2010
	Canarias	1991	IFI	8.7	Pascual Velasco, 1996
	Lanzarote	1991	FC	8.7	Pascual Velasco, 2010
	Madrid	2007-08	ELISA	31.5	Carballedo et al., 2008
	País Vasco/Navarra	1981-85	FC	2.4	Pascual Velasco, 1996
	País Vasco	2005	ELISA	8.9	García-Pérez et al., 2009
	Huesca	1990	FC	18.8	Pascual Velasco, 1996
Ganado caprino					
	Canarias	1991	IFI	32.7	Pascual Velasco, 1996
	Gomera	1997	IFI	16.0	Pascual Velasco, 2010
	Gran Canaria	2007-08	ELISA	60.4	Rodríguez et al., 2010
	Lanzarote	1991	IFI	32.7	Pascual Velasco, 2010
	La Palma	1997	IFI	21.2	Pascual Velasco, 2010
	Madrid	1985	IFI	76.6	Téllez et al., 1989
	Madrid	2007-08	ELISA	22.4	Carballedo et al., 2008
	País Vasco/Navarra	1981-85	FC	4.8	Pascual Velasco, 1996
Ganado bovino					
	Bizkaia	1985	FC	3.4	Pascual Velasco, 1996
	Cádiz	2004-05	ELISA	35.4	Ruiz-Fons et al., 2008
	Gran Canaria	2007-08	ELISA	12.2	Rodríguez et al., 2010
	Gerona	1988	FC	10.9	Pascual Velasco, 1996
	Huesca	1990	FC	1.1	Pascual Velasco, 1996
	Madrid	1985	IFI	17.7	Téllez et al., 1989
	Madrid	1989	FC	66.9	Palau et al., 1989
	Madrid	2007-08	ELISA	5.6	Carballedo et al., 2008
	País Vasco/Navarra	1981-85	FC	1.8	Pascual Velasco, 1996
	País Vasco	2009-10	ELISA	6.5	Astobiza et al., 2011
	Valladolid	1991	FC/IFI	7.9	Pascual Velasco, 1996

Sin embargo, la eliminación de *C. burnetii* a través de las heces o del mucus vaginal es esporádica (Rodolakis et al., 2007). Así, se ha comprobado que la eliminación a través de las heces puede ser de 14 días (Lang, 1990), y en la leche puede excretarse hasta durante 32 meses (Marrie, 1990). Sin embargo, cuando la explotación está sufriendo una infección activa con abortos debidos a fiebre Q, no existe una ruta de excreción predominante (Guatteo et al., 2006). Así, en una explotación bovina se puede encontrar hasta un 45% de animales excretores de la bacteria al medio (Guatteo et al., 2006). Además, se ha observado

que en algunos casos, la eliminación de la bacteria a través de la leche esta asociada a la presencia de mastitis subclínicas crónicas (Barlow et al., 2008).

Las infecciones persistentes en bovino se han detectado en alrededor de un 20% de vacas lecheras examinadas (Guatteo et al., 2007a), implicando una continua eliminación de bacterias por la leche, por lo que estos autores han denominado a este tipo de animales “heavy shedders” o súper-eliminadores, que también presentan elevados títulos de anticuerpos por lo que podrían ser identificados mediante técnicas serológicas. Ello ocasiona que en estudios epidemiológicos realizados en las poblaciones de ganado vacuno lechero de diferentes países se evidencian altas positividades en leche de tanque, tanto en los resultados de ELISA como de PCR (Muskens et al., 2011).

II.6.2 Ganado ovino

Como sucede con el ganado vacuno, la infección por *C. burnetii* en el ganado ovino también se encuentra distribuida en los 5 continentes, tal y como revelan los estudios de seroprevalencia realizados en numerosos países (Tabla II.6). Tal y como se ha comentado, es difícil comparar los resultados entre estudios debido a la diversidad de las técnicas usadas y a las diferentes estrategias de muestreo.

En España, no existen muchos estudios acerca de la seroprevalencia de *C. burnetii* en el ganado ovino (Tabla II.5). En el País Vasco, se realizó un estudio de seroprevalencia en los años 80 mediante la técnica FC, y se halló un 2.4% de ovejas seropositivas, en Canarias las cifras fueron ligeramente superiores (8.7%), así como en Huesca, donde se hallaron porcentajes de seroprevalencia más elevados (18.8%) (revisado por Pascual-Velasco, 1996). A excepción de estudios puntuales realizados recientemente (Carballedo et al., 2008; Rodríguez et al., 2010), la situación de la distribución actual de *C. burnetii* en la población ovina es poco conocida. En un estudio realizado en el año 2005 en el País Vasco, en el que se analizaron un total de 1011 ovejas, se observó una tasa de seroprevalencia del 8.9% sugiriendo un aumento de la seroprevalencia en esta comunidad (García-Pérez et al., 2009), sin embargo la técnica utilizada en este estudio (ELISA) es más sensible que la FC, por lo que es probable que en tiempo transcurrido entre ambos estudios no haya habido un aumento de la incidencia de fiebre Q en la cabaña ovina (Astobiza et al., 2007), sino que se deba a la mayor sensibilidad de la técnica.

Tabla II. 6. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencia realizados en el ganado ovino.

País	Referencia	Número de animales analizados	Técnica	% animales seropositivos
Chad	Schelling et al., 2003	142	ELISA	11.0
Egipto	Mazyad y Hafez, 2007	89	IFI	22.5
Sudan	Reinthalder et al., 1988	32	Aglutinación	62.5
Canadá	Hatchette et al., 2002	293	IFI	3.1
México	Salinas-Melédez et al., 2002	90	ELISA	40.0
Japón	Yoshiie et al., 1991	329	IFI	29.2
Turquia	Centikaya et al., 2000	411	IFI	10.5
Albania	Cekani et al., 2008;	293	ELISA	3.1
Alemania	Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005	1346	ELISA	1.3
Chipre	Psaraulaki et al., 2006;	420	IFI	18.9
Croacia	Medic et al., 2005	182	FC	11.0
Escocia	Moffat et al., 1970;	4880	FC	1.0
Eslovaquia	Dorko et al., 2010	180	ELISA	37.2
Eslovaquia	Dorko et al., 2010	89	ELISA	58.4
Holanda	van den Brom y Vellema, 2009	12363	ELISA	2.4
Irlanda	McCaughy et al., 2010	1022	ELISA	12.3
Italia	Masala et al., 2004	7194	ELISA	9.0
Australia	Banazis et al., 2010	50	ELISA	0.0

Cuando se produce un brote de fiebre Q en el ganado ovino, los abortos suelen darse en torno al 6% del efectivo, pero nunca alcanzan los niveles altos de abortos que experimenta el ganado caprino (EFSA, 2010). En el País Vasco se ha detectado *C. burnetii* en el 9% de los rebaños ovinos con problemas de abortos (Oporto et al., 2006), cifra similar al porcentaje de rebaños afectados por otros agentes bacterianos como *Salmonella abortus ovis* o *Chlamydophila abortus*.

Tras el aborto, las ovejas no suelen volver a abortar en la siguiente paridera (Berri et al., 2002), y ésta es otra diferencia importante respecto al ganado caprino. Una vez que la infección por *C. burnetii* se ha distribuido por el rebaño, la eliminación de la bacteria al medio exterior se produce tanto en animales sanos que paren normalmente como en animales que abortan, y esta eliminación se produce a través del mucus vaginal, la leche y las heces (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Rodolakis et al., 2007). Además esta eliminación puede persistir de una paridera a otra (Berri et al., 2001; Berri et al., 2002) dando lugar a infecciones persistentes. La eliminación de la bacteria a través del mucus vaginal puede llegar a durar 71 días (Berri et al., 2001) y por lo menos hasta 8 semanas en heces y leche (Rodolakis et al., 2007). Es importante destacar que no todos los animales infectados y

eliminadores de *C. burnetii* desarrollan anticuerpos sugiriendo un fallo en la respuesta humoral frente a la infección (Berri et al., 2001).

II.6.3 Ganado caprino

A excepción de Oceanía, donde no existen estudios de seroprevalencia frente a *Coxiella* en ganado caprino, en el resto de los continentes se han realizado numerosos estudios (Tabla II.7) con rangos de seroprevalencia entre 5.7% y 75.0%.

Tabla II. 7. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencia realizados en el ganado caprino.

País	Referencia	Número animales analizados	Técnica	% animales seropositivos
Chad	Schelling et al., 2003	134	ELISA	13.0
Sudan	Reinthalder et al., 1988	42	Aglutinación	53.0
Egipto	Mazyad y Hafez, 2007	71	IFI	16.8
Canadá	Hatchette et al., 2002	64	IFI	19.0
México	Salinas-Melédez et al., 2002	60	ELISA	35.0
India	Vaidya et al., 2010	53	ELISA	5.7
Japón	Htwe et al., 1992	85	IFI	23.5
Omán	Scrimgeour et al., 2003	54	IFI	56.0
Albania	Cekani et al., 2008	64	ELISA	18.7
Bulgaria	Martinov, 2007	1016	FC	21.7
Chipre	Psaraulaki et al., 2006	417	IFI	48.2
Francia	Dubuc-Forfait et al., 2009	1057	ELISA	32.0
Francia	Rousset et al., 2009a	72	ELISA	75.0
Holanda	van den Brom y Vellema, 2009	3409	ELISA	7.8
Irlanda	McCaughey et al 2010	54	IFI	9.3
Italia	Masala et al., 2004	2155	ELISA	13.0

En España, hace dos décadas el ganado caprino presentó una seroprevalencia baja en el País Vasco y Navarra con la técnica FC (4.8%), mientras que los valores de seroprevalencia en Canarias fueron elevados (32.7%) (Tabla II.5) (revisado por Pascual-Velasco, 1996). Es interesante destacar los datos recientes obtenidos mediante ELISA en la isla de Gran Canaria, que han mostrado una seroprevalencia media individual elevada, del 60.4% (Rodríguez et al., 2010). Esta mayor tasa de seroprevalencia puede ser debida a que las técnicas de diagnóstico que se usan en la actualidad (ELISA) presentan una mayor sensibilidad. Sin embargo, en Madrid, ya se encontraron tasas de seroprevalencia elevadas en ganado caprino mediante la técnica IFI (76.6%) (Téllez et al., 1989). Estos datos demuestran por un lado la gran variabilidad existente entre comunidades autónomas, y por otro las altas tasas de seroconversión que puede llegar a alcanzar el ganado caprino.

Como se ha mencionado anteriormente, la infección por *C. burnetii* puede causar hasta un 90% de los abortos en un rebaño caprino (Palmer et al., 1983). Las cabras que abortan pueden volver a abortar en la siguiente gestación (Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007) aunque el número de abortos es habitualmente menor conforme transcurren las parideras. Se piensa que los animales pueden verse infectados de forma crónica, debido a que se ha detectado la bacteria en los nódulos linfáticos mamarios y en la ubre tras el aborto, lo que podría conllevar a una prolongada eliminación de la bacteria a través de la leche (Arricau-Bouvery et al., 2003b). Además, el hallazgo de la detección de *Coxiella* en el hígado de cabras infectadas experimentalmente con la cepa CbC1 (Arricau-Bouvery et al., 2003a) podría indicar el establecimiento de una infección crónica. Asimismo, la colonización del hígado por parte de la bacteria podría ser la causante de la eliminación fecal (Arricau-Bouvery et al., 2003a; Rodolakis et al., 2007). Aparte de las heces, el ganado caprino también elimina *C. burnetii* a través del mucus vaginal y la leche siendo esta la principal vía de eliminación, durante 16 semanas (Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007; Rodolakis et al., 2007). Existe un alto porcentaje de animales eliminadores que no seroconvierte y viceversa, animales seropositivos que no eliminan la bacteria (Arricau-Bouvery, et al., 2003b; Berri et al., 2007; Rodolakis et al., 2007; Rousset et al., 2009a), destacando la importancia de utilizar métodos moleculares y serológicos a la hora de diagnosticar la fiebre Q a nivel individual.

II.6.4 Otras especies domésticas

Además de los rumiantes domésticos, también existen otras especies domésticas que han sido identificadas como causantes de brotes de fiebre Q en humana. Entre ellas cabe destacar a los perros y gatos (Buhariwalla et al., 1996; Laughlin et al., 1991; Marrie et al., 1988; Marrie et al., 1989; Pinsky et al., 1991). Los gatos pueden eliminar la bacteria a través de la orina durante al menos 2 meses y a través de los fluidos del parto con el consecuente riesgo para los humanos (Babudieri et al., 1959). Además, se ha detectado DNA de *C. burnetii* en muestras vaginales y de placenta de gatos supuestamente sanos (Cairns et al., 2007), resaltando la importancia de tomar las precauciones necesarias tras el parto normal de una gata. Entre los diferentes estudios en relación a la seroprevalencia de *C. burnetii* en gatos, cabe destacar un estudio realizado en Japón (Komiya et al., 2003), donde el 14.2% de los gatos domésticos y el 41.7% de los gatos callejeros estudiados, presentaban anticuerpos frente a *C. burnetii*. Este estudio reflejaba las diferentes tasas de seroprevalencia que se pueden encontrar en animales que vivían en diferentes tipos de ambientes, destacando a los gatos callejeros como una vía importante de infección para los humanos. En relación a los perros, algunos estudios han demostrado altas tasas de seroprevalencia (Willeberg et al., 1980). Así, al igual que en el caso de los gatos, los perros

callejeros mostraban una seroprevalencia mayor que los perros domésticos (66% vs. 48%, respectivamente) (Willeberg et al., 1980). También se han observado seroprevalencias frente a *C. burnetii* más elevadas en perros que han estado en contacto con rumiantes (32.4%) en comparación con perros que no han mantenido ningún tipo de contacto (4.0%) (Boni et al., 1998).

Por otro lado, también se ha confirmado el contacto de las aves domésticas con *C. burnetii* (To et al., 1998b) observando seroprevalencias bajas (2.1%) pero una elevada prevalencia de DNA (41.5%), variando la incidencia en función del área geográfica. A pesar de que se pueden hallar puntualmente altas prevalencias, las aves domésticas no parecen jugar un papel muy importante en el ciclo de la fiebre Q, pero sí podrían ser indicadores de focos de infección. También se ha descrito un caso atribuido a *Coxiella* sp. en 3 loros de un zoológico (Perugini et al., 2009). También se ha detectado el contacto con *C. burnetii* en aves de corral, que podrían transmitir el agente a los humanos a través de los huevos o través del contacto con sus deyecciones (Lang et al., 1990). En un estudio en el que se analizaron 25 granjas dedicadas a la actividad avícola, el 13.2% de las aves de 16 granjas presentaron anticuerpos frente a *C. burnetii* (Rarotra et al., 1978). Además, este mismo estudio demostró que hubo seroconversiones en personas que vivían cerca de las granjas positivas, apuntando a estas explotaciones como origen de la infección.

Entre otros animales domésticos, cabe destacar la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii* en el 10.5% de caballos en Canadá (George y Marrie, 1987) y en el 26% en California (Willeberg et al., 1980). También se ha descrito la presencia de DNA de *C. burnetii* en el 17.5% de fetos de búfalos de agua domésticos procedentes de 82 granjas de Italia (Perugini et al., 2009).

II.7 El ciclo silvestre de la fiebre Q

Existen pocos estudios acerca de la distribución e incidencia de *C. burnetii* en animales silvestres, y en concreto sobre las principales rutas de eliminación, por lo que no se sabe el riesgo potencial que representan en la transmisión de la infección a otros animales domésticos y a los humanos.

Al igual que en los animales domésticos, existe una gran cantidad de especies silvestres que podrían actuar como reservorios de la fiebre Q en la naturaleza. Se ha descrito una enorme variedad de aves, reptiles y mamíferos que han presentado seropositividad frente a *C. burnetii* en la mayor parte del mundo (Tabla II.8). Sin embargo,

estimar la prevalencia de la coxiellosis en los animales silvestres es difícil, ya que se necesitarían varios estudios con un número significativo de animales estudiados para poder llegar a resultados concluyentes. Hay estudios que asocian la variación de la prevalencia de la fiebre Q al área geográfica (Ruiz-Fons et al., 2008) y que sugieren la existencia de otros factores que influirían en la prevalencia, tales como el medio ambiente, los hábitos alimentarios y/o la presencia de garrapatas. Así, se han observado altos porcentajes de seroprevalencia en zorros debido probablemente a sus hábitos alimentarios (Enright et al., 1971a). En este sentido, en un estudio realizado en aves, se comprobó que las especies carroñeras y las especies que se alimentaban en el entorno de explotaciones ganaderas infectadas por fiebre Q, eran las que mostraban una mayor seroprevalencia, mientras que las especies que se alimentaban de semillas, plantas y/o insectos presentaban una seroprevalencia menor (Enright et al., 1971b; To et al., 1998b).

Otras especies silvestres podrían verse infectadas al compartir espacios naturales con especies domésticas infectadas, y a la inversa (Ejercito et al., 1993; Enright et al., 1971a). Cabe destacar la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii* en el 2.4% de los conejos silvestres de Lanzarote, y en el 60% de los analizados en Madrid (Pascual Velasco, 1996). También los roedores domésticos y silvestres han evidenciado el contacto con *Coxiella* (Barandika et al., 2007; Gardon et al., 2001; Pascual Velasco, 1996; Yadav y Sethi, 1979). Estos animales podrían adquirir la infección en explotaciones de animales domésticos y transmitirla a los animales silvestres y viceversa representando así un importante reservorio de la bacteria.

Respecto a los artrópodos en su papel de vectores y reservorios, cabe destacar las diferentes especies de moscas capturadas en bosques, zoológicos y granjas, que han sido positivas a la presencia de DNA de *C. burnetii* (Nelder et al., 2008). Entre ellas cabe destacar las especies hematófagas que o bien se alimentaban de sangre humana o animal, o de carroña, o bien las especies coprófagas que se encontraban sobre heces o entre el estiércol, indicando el posible papel que pueden desempeñar en la transmisión de la bacteria, ya que se ha descrito que éstas pueden mantener, transportar e incluso soportar el crecimiento de la bacteria en su organismo (Hucko, 1984; Mourya et al., 1983).

Los ixódidos se consideran el reservorio natural evolutivamente más antiguo de *C. burnetii*. Las garrapatas son consideradas reservorios y también posibles vectores de *C. burnetii*, aunque este último aspecto no está claramente demostrado. Son numerosos los estudios que han detectado la presencia de DNA de *C. burnetii* en garrapatas recogidas de la vegetación (garrapatas sin alimentar) y en garrapatas capturadas cuando se estaban

alimentando en los hospedadores (Barandika et al., 2008; Rehacek et al., 1994; Smetanova et al., 2006; Spitalska et al., 2003; Spyridaki et al., 2002; Toledo et al., 2009b).

Tabla II. 8. Resultados de los diferentes estudios de seroprevalencia en la fauna silvestre.

País	Referencia	Animal salvaje	% Seroprevalencia
California	Enright et al., 1971a	Conejos	53.0
California	Enright et al., 1971b	Aves	13.0
Canadá	Marrie et al., 1993	Liebres	49.0
Canadá	Marrie et al., 1993	Alces	16.5
Canadá	Marrie et al., 1993	Mapaches	7.1
Canadá	Marrie et al., 1993	Ciervos	1.5
España	Pérez-Gallardo et al., 1952	Conejos	66.7
España	Pérez-Gallardo et al., 1952	Lirones	57.1
España	Ruiz-Fons et al, 2008	Corzos	15.4
España	Ruiz-Fons et al, 2008	Ciervos	5.6
España	Castillo et al., 2010	Ciervos	3.6
Francia	Blancou, 1983	Corzos	1.7
Guayana francesa	Gardon et al., 2001	Roedores	3.4
Guayana francesa	Gardon et al., 2001	Marsupiales	11.9
Guayana francesa	Gardon et al., 2001	Aves	1.4
Idaho	Binninger et al., 1980	Osos negros	6.2
India	Yadav y Sethi, 1979	Serpientes	22.9
India	Yadav y Sethi, 1979	Tortugas	12.5
India	Yadav y Sethi, 1979	Roedores	12.6
India	Yadav y Sethi, 1979	Musaraña	14.3
Italia	Giovannini et al., 1988	Ciervos	7.0
Japón	Ejercito et al., 1993	Osos negros	77.8
Japón	Ejercito et al., 1993	Ciervos	68.9
Japón	Ejercito et al., 1993	Liebres	62.5
Japón	Ejercito et al., 1993	Monos	27.8
Japón	Ejercito et al., 1993	Coipú	12.5
Japón	To et al., 1998b	Aves	19.4
República Checa	Hubálek et al., 1993	Corzos	6.1
República Checa	Hubálek et al., 1993	Ciervos	25.0
República Checa	Hubálek et al., 1993	Gamos	50.0
República Checa	Hubálek et al., 1993	Muflón	100.0
República Checa	Hubálek et al., 1993	Jabalí	6.3
Utah	Vest et al., 1965	Ardillas	3.0
Utah	Vest et al., 1965	Roedores	4.4
Utah	Vest et al., 1965	Liebres	18.1
Utah	Vest et al., 1965	Ciervos	48.6
Utah	Vest et al., 1965	Conejos del desierto	20.0
Utah	Vest et al., 1965	Zorros	40.0

En las garrapatas se ha demostrado la transmisión transestadial (de un estadio a otro, por ejemplo, de larva a ninfa o de ninfa a adulto) y transovárica (de la hembra al huevo, y de éste a la larva). Respecto a la primera, una garrapata infectada en un estadio temprano de su desarrollo (larva) puede mantener la bacteria a través de las mudas sucesivas (a ninfa y a estado adulto) (Kováčová y Kazár, 2002), aunque no sucede en todas las especies, ni con la misma eficiencia. En la naturaleza existen más de 40 especies de garrapatas implicadas en el ciclo de *C. burnetii* (Maurin y Raoult, 1999).

C. burnetii se encuentra en las garrapatas en fase I, al igual que en los mamíferos, siendo por lo tanto altamente infectiva. La bacteria se multiplica en el interior de las células intestinales de las garrapatas, eliminando consecuentemente grandes cantidades de bacterias en sus heces, pudiendo contaminar la piel del animal hospedador mientras se está alimentando (Maurin y Raoult, 1999).

Las garrapatas no parecen tener un papel significativo en el mantenimiento del ciclo natural de la infección de *C. burnetii* en el ganado doméstico; sin embargo, sí que podrían desempeñar un papel importante en la transmisión de la *Coxiella* entre animales silvestres, especialmente en lagomorfos, roedores y aves (Marrie et al., 1986). Tampoco parece probable la transmisión de la bacteria a las personas mediante la picadura de garrapatas, aunque en Francia hay descritos casos de varios pacientes que padecieron una enfermedad transmitida por garrapatas, y al mismo tiempo, o posteriormente, se les diagnosticó la infección por *C. burnetii* (Rolain et al., 2005).

II.8 Diagnóstico de la fiebre Q

Se han descrito métodos directos e indirectos para el diagnóstico de *C. burnetii* en animales.

II.8.1 Métodos directos de identificación de *C. burnetii*

II.8.1.1 Aislamiento

El aislamiento de *C. burnetii* se puede realizar bien en huevos embrionados o en cultivos celulares siempre que haya suficiente carga de *C. burnetii* y un bajo nivel de contaminación por otras bacterias (Ho et al., 1995). El aislamiento en huevo embrionado es un método de detección que goza de una de alta sensibilidad, y que puede ser utilizado con todo tipo de muestras (hisopos, tejidos, heces). La especificidad de la técnica no es tan alta,

ya que otros agentes potencialmente presentes en la muestra de origen pueden crecer también en el huevo embrionado, de ahí que la muestra a cultivar tenga que presentar un nivel muy bajo de contaminación por otras bacterias. El aislamiento es dificultoso por lo que no se suele utilizar como técnica de diagnóstico de rutina (Klee et al., 2006; Maurin y Raoult, 1999). Además, conlleva cierto riesgo de contagio para el personal, así que se tiene que llevar a cabo en instalaciones de seguridad biológica de nivel P3. Con muestras muy contaminadas, como las placentas, descargas vaginales, heces o leche, puede ser necesaria la inoculación previa en animales de laboratorio, como ratones o cobayas, y luego realizar el cultivo a partir de muestras de bazo de estos animales infectados (Scott et al., 1987).

La técnica de aislamiento en cultivos celulares ("shell-vial assay") consiste en inocular la muestra problema sobre las células en cultivo, en tubos especiales. Estas células se disponen en una monocapa (células Vero o células de fibroblastos pulmonares de embrión humano - células HEL), que se centrifugan tras la inoculación para acelerar la adherencia y la penetración de la bacteria en la célula receptora. Transcurridos 3, 10 y 21 días, se observan los viales usando un microscopio invertido para observar el efecto citopático de *C. burnetii* (formación de vacuolas características de *C. burnetii* en las células HEL). Diez días después, se detecta el crecimiento de *C. burnetii* dentro de las células directamente dentro del tubo mediante técnicas de inmunofluorescencia directa. Entre sus ventajas destaca que es la técnica más rápida de aislamiento de *C. burnetii* (Spyridaki et al., 2002). Es un método que se ha empleado tanto con muestras de humanos (Raoult et al., 1991) como con garrapatas (Psaroulaki et al., 2006; Spyridaki et al., 2002). Al igual que con el aislamiento en huevos embrionados, esta técnica se tiene que llevar a cabo en instalaciones de seguridad de biológica de nivel P3.

C. burnetii no crece en los medios usados de rutina en los laboratorios de microbiología. Recientemente se ha descrito por primera vez un medio axénico en el que se ha hecho crecer la bacteria en condiciones microaerófilas (Omsland et al., 2008; Omsland et al., 2009).

II.8.1.2 Tinción

El estudio bacteriológico se suele realizar principalmente a partir de improntas de placentas de animales abortados. Se utilizan diferentes tinciones como Stamp, Giménez, Machiavello, Giemsa o el de Ziehl-Neelsen modificado (Giménez, 1965; Sanford et al., 1994) que permiten visualizar fácilmente al microscopio la presencia de formas compatibles con *C.*

burnetii en exudados o en áreas de inflamación de la placenta. En algunos casos es difícil de detectar la bacteria, debido a su pequeño tamaño o a su escaso número. Además, el examen de improntas tiene poca sensibilidad y especificidad y los resultados han de tomarse con cautela ya que *C. burnetii* puede confundirse en ocasiones con *Chlamydophila abortus* o *Brucella* spp, por lo que se recomienda utilizar algún otro método diagnóstico como prueba confirmatoria.

II.8.1.3 Histología e inmunohistoquímica

El estudio histológico se lleva a cabo en muestras de placenta y tejidos de fetos de animales abortados. Las lesiones más significativas se observan en placenta y consisten en placentitis necrótica supurativa, con infiltrado inflamatorio en áreas intercotiledonarias (Figura II.7) e hipertrofia de trofoblastos, en los que se pueden observar abundantes coxiellas. También se pueden observar granulomas multifocales o hepatitis necrótica en el hígado (Figura II.6), y neumonía no supurativa con acúmulos linfoides peribronquiolares. Sin embargo, en la mayoría de los casos de abortos debidos a *C. burnetii* solo se ve afectada la placenta y no se observan lesiones fetales (Oporto et al., 2006; Navarro et al., 2009; Sánchez et al., 2006).

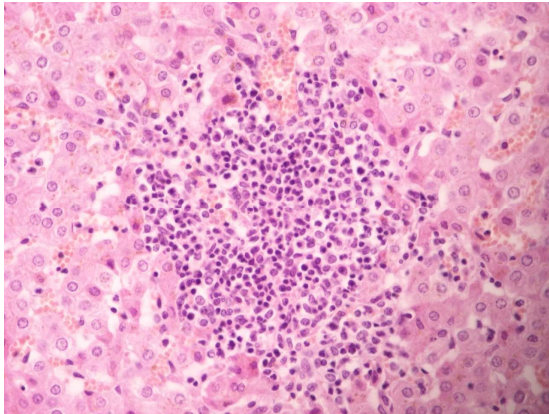


Figura II. 7. Hepatitis granulomatosa.

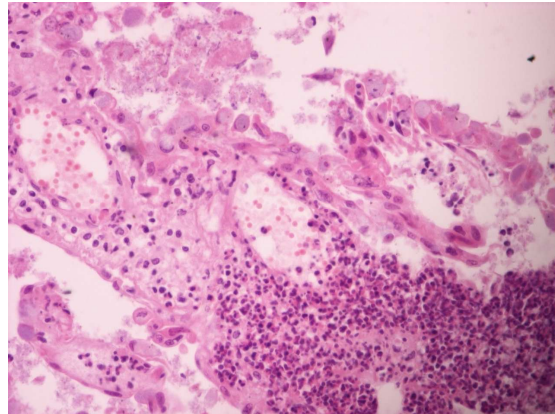


Figura II. 6. Placentitis necrótica.

La técnica de inmunohistoquímica (IHQ) se puede realizar a partir de tejidos incluidos en parafina o en frotis fijados con acetona (Raoult et al., 1994). El método consiste en la realización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta o la técnica de inmunoperoxidasa usando anticuerpos policlonales frente a *C. burnetii*, procedentes de un antisuero bien caracterizado de origen humano o de un antisuero específico producido en animales de laboratorio (conejo o cobaya). Para visualizar la bacteria, se utiliza un conjugado anti-IgG obtenido en otra especie, marcado. La IHQ permite localizar con precisión los lugares donde se produce la colonización de *C. burnetii*. El inconveniente es

que es una técnica cara, laboriosa y además no es lo suficientemente sensible como para detectar el antígeno en otros órganos distintos a la placenta (Sánchez et al., 2006).

II.8.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En los últimos años, el desarrollo de herramientas moleculares ha cambiado totalmente el diagnóstico en el campo de la medicina humana y veterinaria, permitiendo la detección e identificación de los agentes patógenos presentes en muestras clínicas y ambientales, con altos niveles de especificidad y sensibilidad.

La PCR se basa en la amplificación de fragmentos de DNA utilizando oligonucleótidos sintéticos específicos de la secuencia diana (cebadores o 'primers') con la ayuda de la enzima polimerasa y de una serie de ciclos a diferentes temperaturas que permiten generar un número exponencial de copias suficiente para poder ser detectadas con facilidad (Sambrook et al., 1989). Además de la PCR convencional también se ha utilizado la PCR-anidada o "nested-PCR" (PCR-n) que consiste en amplificar el amplicón de una amplificación previa (Parisi et al., 2006; Spyridaki et al., 2002; Zhang et al., 1998). Pero tiene la desventaja de que incrementa considerablemente la probabilidad de contaminación ya que hay que manipular el producto amplificado obtenido en la primera amplificación (Parisi et al., 2006). Otra variante es la "PCR touchdown" que se emplea cuando se desconoce la secuencia exacta de los extremos de la secuencia a amplificar, de modo que se asume que puede existir alguna base desapareada en el alineamiento cebador-secuencia. Su finalidad es reducir el fondo no específico bajando gradualmente la temperatura de hibridación a lo largo del progreso de la PCR. Esta PCR es una de las más utilizadas para la identificación de *C. burnetii* (Berri et al., 2000; Willems et al., 1994).

La PCR se ha convertido en un método eficaz para detectar la bacteria en diferentes tipos de muestras biológicas (Berri et al., 2000), pero esta eficacia se puede ver disminuida por la presencia de posibles inhibidores en la muestra inicial (Berri et al., 2000; Capuano et al., 2004; Lorenz et al., 1998), por lo que es muy importante establecer un buen protocolo para la extracción de DNA. Además, las muestras deben ser analizadas lo antes posible tras su recepción si no se conoce la carga bacteriana que poseen, para evitar el riesgo de falsos negativos (Guatteo et al., 2007b). Así, si la muestra presenta una alta concentración inicial de la bacteria, ésta continúa siendo alta 2 meses después, sin embargo, si la concentración inicial es baja, puede no ser detectada posteriormente. La bacteria se puede detectar tanto en leche, como en muestras de mucus vaginal, heces, placentas y diferentes tipos de tejidos, así como en muestras medioambientales. También se puede analizar una muestra

representativa del rebaño, como es la leche de tanque, para conocer su estatus sanitario (Guatteo et al., 2007c; Kim et al., 2005).

La técnica de PCR a tiempo real es una técnica rápida, que reduce considerablemente el riesgo de contaminación con producto amplificado y que tiene la capacidad de cuantificar la concentración de los ácidos nucleicos (de Bruin et al., 2011; Jones et al., 2011; Kim et al., 2005, Klee et al., 2006; Panning et al., 2008; Lockhart et al., 2011). Además, la elevada sensibilidad y especificidad, la obtención de resultados en tiempo real, la posibilidad de automatizar el proceso para adaptar la técnica a grandes cantidades de muestras, son las ventajas fundamentales de esta técnica molecular. La mayoría de las PCR a tiempo real que se han desarrollado están basadas en sondas específicas que utilizan una sonda unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (forward) y el inverso (reverse); cuando la sonda está intacta, presenta una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la DNA polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen. También existen en el mercado kits comerciales de PCR a tiempo real, ampliamente utilizados tanto en el diagnóstico rutinario como en trabajos de investigación.

Para la amplificación y detección de *C. burnetii* se han empleado diversas dianas, como la secuencia de inserción en multicopias IS1111 del gen de la transposasa (Berri et al., 2000; Lorenz et al., 1998; Willems et al., 1994) que es una de las más utilizadas y hace que la PCR tenga mayor sensibilidad y especificidad. También se ha trabajado con otros genes que están en una única copia como *com1*, que codifica una proteína de 27kDa de la membrana externa (Lockhart et al., 2011), el gen de la superóxido dismutasa (*sodB*) (Stein y Raoult, 1992), el operón de choque térmico que codifica dos proteínas de choque térmico, *hspA* y *hspB* (Fournier et al., 2003), el gen de la isocitrato deshidrogenasa (*icd*) (Klee et al., 2006; Nguyen et al., 1999) y la proteína potenciadora de la infectividad del macrófago (*cbmip*) (Klee et al., 2006; Zhang et al., 1998), entre otros.

Recientemente se han desarrollado técnicas moleculares avanzadas que ofrecen nuevas ventajas, como la reducción del equipamiento necesario, aumento de la sensibilidad, disminución del tiempo de obtención de resultados o la posibilidad de analizar al mismo tiempo un número elevado de secuencias genéticas. Entre ellas cabe destacar los microarrays (Beare et al., 2006; Fenollar y Raoult, 2004; Leroy y Raoult, 2010).

II.8.2 Métodos indirectos de identificación de *C. burnetii*: Técnicas serológicas

Existen diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico de la fiebre Q pero las tres más ampliamente utilizadas son: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la fijación de complemento (FC) y el ensayo de inmunoabsorbancia enzimática (ELISA) (Fournier et al., 1998). La técnica IFI es utilizada principalmente en el diagnóstico de la fiebre Q en medicina humana, y el ELISA y la FC en el diagnóstico veterinario. La técnica FC es la técnica de referencia recomendada por la Organización mundial de Sanidad Animal (OIE) para el diagnóstico de los abortos ovinos, pero la técnica ELISA es la más utilizada en estudios epidemiológicos, ya que posee una sensibilidad mayor que la FC (Astobiza et al., 2007; Field et al., 1983; Field et al., 2000; Field, et al., 2002; Kittelberger et al., 2009; Nguyen et al., 1999; Rousset et al., 2007). Además, tanto la técnica FC como la IFI son subjetivas, no están estandarizadas entre los laboratorios, no son adecuadas para hacer estudios a gran escala y no pueden ser automatizadas. Uno de los motivos por los cuales la FC tiene una sensibilidad menor en comparación con el ELISA puede ser el tipo de antígeno utilizado, ya que puede ser el responsable de que la capacidad de unión con el anticuerpo sea defectuosa. Además algunos anticuerpos no son detectados por esta técnica debido a la habilidad que tienen las diferentes inmunoglobulinas de unirse al complemento. Así, en rumiantes se sabe que los anticuerpos IgG1 se unen al complemento pero la presencia de IgG2 e IgM, puede inhibir esta unión (Schmeer, 1985). Actualmente existen varios ELISAs comerciales para detectar anticuerpos frente a *C. burnetii* en rumiantes domésticos. Se ha demostrado que esta técnica puede mostrar diferentes sensibilidades (Kittelberger et al., 2009), así, el ELISA preparado con antígeno de aislados de rumiantes tiene una mayor sensibilidad que los que se preparan con antígenos procedentes de aislados de garrapatas (Kováčová et al., 1998; Rodolakis 2006; Rodolakis et al., 2007). Los ELISAs comerciales detectan la cantidad total de IgG pero no detectan IgM, por lo que utilizando un ELISA que detecte tanto IgG como IgM, el número de animales infectados sería probablemente mayor (Kittelberger et al., 2009).

En humanos el diagnóstico serológico de la fiebre Q aguda o crónica, esta basado principalmente en la detección de anticuerpos en fase I o en fase II mediante IFI. Sin embargo, en rumiantes a pesar de que podría existir la posibilidad de adquirir los antígenos por separado, éstos no se proporcionan comercialmente por lo que no se utilizan por separado en el diagnóstico rutinario, si bien en algunas investigaciones se han aplicado estos antígenos por separado para diferenciar animales con infección aguda o crónica (Böttcher et al., 2011; Cooper et al., 2011).

Debido a lo laborioso y dificultoso que es la producción de antígenos para estas técnicas, sería de gran interés poder desarrollar un ELISA recombinante, que utilizase como antígeno proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos que mejoraran las técnicas disponibles. Así, se han identificado varios antígenos inmunodominantes (Hussein et al., 2001; Zhang et al., 1998; Zhang y Samuel, 2004), entre ellos una proteína recombinante de choque térmico (Hsp B) que ha mostrado un 97% de especificidad y es indicativa de infecciones recientes y/o reactivaciones de infecciones pasadas en sueros de cabras (Fernandes et al., 2008).

La técnica de ELISA ha sido utilizada para detectar principalmente la presencia de anticuerpos en sueros sanguíneos individuales, pero se han hecho diversos estudios en los que se ha utilizado esta técnica para detectar la presencia de anticuerpos en muestras de leche de tanque (Agger et al., 2010; Muskens et al., 2011; Paiba et al., 1999a; Ryan et al., 2011; Ruiz-Fons et al., 2011). Esta estrategia es adecuada para analizar el estatus de un rebaño.

La interpretación de los resultados de ELISA a nivel individual puede resultar difícil ya que hay animales que pueden permanecer seropositivos durante varios años tras una infección, eliminando o no la bacteria, y por otro lado algunos animales infectados nunca seroconvierten (Adesiyun et al., 1985; Arricau-Bouvery et al., 2003a; Berri et al., 2001), por lo que el método más efectivo para la detección del organismo a nivel individual es emplear las técnicas de ELISA y PCR de forma combinada (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Además, ahora que comienza a extenderse el uso de la vacuna en algunos países de Europa, no existe ningún test serológico que sea capaz de distinguir entre animales vacunados y animales naturalmente infectados, por lo que el uso de las técnicas serológicas en rebaños vacunados no es de utilidad.

En la Tabla II.9 se puede observar un resumen de los principales métodos que se utilizan para el diagnóstico de *C. burnetii* en animales domésticos.

II.8.3 Estrategias para la identificación de rebaños infectados

Para diagnosticar si la fiebre Q está presente o no en un rebaño, se han desarrollado diferentes tipos de estrategias para la toma de muestras clínicas (Sidi-Boumedine et al., 2010). Así, si se detecta una explotación bovina con problemas de abortos (2 casos de abortos o más en un mes, o 3 en un año para explotaciones de menos de 100 animales, o más de un 4% de abortos en explotaciones con más de 100 animales), se recomienda

analizar por PCR hisopos vaginales y/o cualquier tejido del feto abortado/placenta de uno o dos animales que hayan abortado recientemente. Si los abortos no son recientes o existen animales con problemas reproductivos, se recomienda extraer sangre para analizar los anticuerpos presentes en al menos 6 animales (EFSA, 2010). La detección de DNA de *C. burnetii* en fluidos vaginales de vacas problemáticas o en muestras de placenta, confirmaría el diagnóstico de fiebre Q. También el hallazgo de seroprevalencias en torno al 50%.

Tabla II. 9. Comparación de los diferentes métodos de diagnóstico de la fiebre Q en rumiantes.

Métodos directos	Detección	Sensibilidad	Especificidad
Cultivo	Bacterias viables	Cultivo< tinción	Cultivo<tinción
Tinción	Bacterias		tinción< IHQ
Histología/ Inmunohistoquímica	Lesiones + bacterias/ antígeno	tinción< IHQ	
PCR	DNA	IHQ<PCR	IHQ<PCR
Métodos indirectos			
FC	Anticuerpos	FC< ELISA	FC>ELISA
ELISA	Anticuerpos		
IFI	Anticuerpos	ELISA=IFI	ELISA=IFI

En el caso de rebaños ovinos y caprinos, la recomendación de EFSA (2010) es investigar por PCR la presencia de la bacteria en muestras de hisopos vaginales o productos procedentes del aborto de 2 a 6 animales cuando el aborto sea reciente, y cuando el aborto se haya producido hace más de dos semanas, se analizarán muestras de sangre por serología en un mínimo de 10 animales. Dependiendo de los resultados se podrá distinguir entre 3 situaciones diferentes: rebaño infectado, rebaño no infectado pero con casos aislados de fiebre Q y rebaño no infectado. Si se dispone de muestras de abortos de 2 a 6 animales, en el caso de que sean PCR positivas se confirmará que los abortos son debidos a la fiebre Q; Si solo 1 muestra es PCR positiva, se han de tomar nuevas muestras de abortos. Si son positivas se confirmará el diagnóstico de la fiebre Q pero si son negativas se investigarán la presencia de otros posibles agentes causantes de los abortos. En caso de no existir más abortos, se analizará la presencia de anticuerpos en al menos 10 animales y si más del 50% presentan anticuerpos, los abortos se atribuirán a *C. burnetii*, pero si la seroprevalencia es menor, se considerará como un caso esporádico de fiebre Q. Si solo se dispone de muestras de un único animal, se analizarán por serología un número determinado de animales. Si es PCR positivo y más del 50% de los animales presentan anticuerpos, se confirmará el diagnóstico de Fiebre Q. Si la PCR es positiva pero menos del 50% de los animales son seropositivos, se considerará como un caso aislado de aborto por fiebre Q. Si la PCR es negativa y la presencia de anticuerpos es mayor del 50%, es

recomendable llevar a cabo nuevas analíticas en nuevas muestras de animales abortados. Si, por último, la PCR es negativa y menos del 50% de los animales son seropositivos, los abortos no se atribuirán a fiebre Q (EFSA, 2010).

II.9 Control de la fiebre Q

El hecho de que la fiebre Q esté distribuida tanto en los animales domésticos como silvestres, hace que el control de la infección sea difícil. Entre las medidas de control de la fiebre Q se contempla el tratamiento con antibióticos, la vacunación y las medidas de higiene y profilaxis. El éxito de cualquier programa dependerá de diferentes factores tales como la proporción de animales susceptibles e infectados, el contacto entre individuos, así como de las características de la explotación y el tipo de manejo.

II.9.1 Tratamiento antibiótico

Si bien en medicina humana la eficacia de diferentes grupos de antibióticos está bien documentada, existe muy poca información acerca de la eficacia del tratamiento antibiótico en rumiantes para hacer frente a la fiebre Q. Hasta la fecha, los tratamientos antibióticos utilizados han estado basados en el uso de tetraciclinas. Existen dos estudios en los que se comprobó la eficacia de la clortetraciclina en el ganado vacuno naturalmente infectado (Behymer et al., 1977; Luoto et al., 1951). En ambos casos se detectó *C. burnetii* en leche indicando el fallo del tratamiento en suprimir la eliminación de la bacteria en leche. El tratamiento antibiótico con oxitetraciclina (OTC) se ha utilizado con objeto de evitar los abortos por fiebre Q en rumiantes (Behymer et al., 1977; Berri et al., 2002; Kováčová et al., 2002). Es un antibiótico de amplio espectro que posee actividad frente a bacterias aerobias y anaerobias, bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo algunas especies de micoplasmas, rickettias y clamidias. La OTC en el ganado ovino se suele aplicar en doble dosis de 20mg/kg al final de la gestación, entre los días 100 y 120, siguiendo las mismas recomendaciones que se utilizan para el control de los abortos por clamidias (Rodolakis et al., 1980). En un estudio realizado en ganado ovino (Berri et al., 2005a), en el que se administró la OTC tras un brote de fiebre Q, no se suprimió la eliminación de la bacteria ni los abortos, pero se concluyó que el tratamiento podría haber hecho efecto a largo plazo y así haber prevenido la transmisión de la enfermedad de ovejas a corderas. El mismo efecto fue obtenido en un rebaño de cabras en el que se dejó un grupo control sin tratar con OTC y otro grupo tratado con OTC. El tratamiento antibiótico no suprimió los abortos en los animales tratados (Blain, 2007, citado en EFSA, 2010), destacando la importancia de no

usar los antibióticos de una manera generalizada, para intentar prevenir el posible desarrollo de resistencia a antibióticos.

En la mayoría de los estudios relacionados con la aplicación de la tetraciclina para disminuir la excreción, ésta es habitualmente aplicada intramuscularmente, ya que si es aplicada por vía oral en dosis terapéuticas, además de tener peor absorción, puede disminuir sustancialmente la actividad de la microflora. Sin embargo, existe un estudio (Behymer et al., 1977) en el que se aplicó la tetraciclina en el agua de bebida durante varias semanas antes del parto observando una reducción de la infección en el grupo tratado. Sin embargo, no fue totalmente eficaz en eliminar la infección ya que se aisló la bacteria 28 días después de la aplicación del tratamiento. En otro estudio en ganado vacuno, la administración de OTC en combinación con una vacuna en fase II suprimió los abortos pero no la eliminación de la bacteria (Woernle et al., 1985).

El tratamiento de la fiebre Q se ha desarrollado especialmente en medicina humana, y con éxito. Así, el tratamiento recomendado para los casos de fiebre Q aguda consiste en el tratamiento con doxiciclina, 100mg dos veces al día durante 2 ó 3 semanas. Esta pauta acorta el periodo de hipertermia y acelera la recuperación en casos de neumonía. Los antibióticos basados en quinolonas han dado buenos resultados *in vitro* y se consideran como una alternativa. El cotrimoxazol se utiliza en caso de que los afectados sean niños o mujeres embarazadas (Delsing et al., 2008; Maurin y Raoult, 1999). También se ha estudiado la eficacia de otros antibióticos como la combinación trimetoprim-sulfametoxazol, rifampicina y ofloxacina, obteniendo buenos resultados. Para que un tratamiento contra la fiebre Q sea eficaz, el antibiótico tiene que entrar en la célula y ser eficaz al pH ácido, medio en el que la bacteria se multiplica. En el caso de fiebre Q crónica, se ha demostrado la eficacia del uso combinado de doxiciclina e hidroxicloroquina durante un año para tratar la endocarditis (Maurin y Raoult, 1999).

II.9.2 Vacunación

Hasta ahora, se han desarrollado diversas vacunas experimentales para prevenir la enfermedad en animales y humanos. En animales, la mayoría de las vacunas desarrolladas han estado compuestas por células enteras en fase I. Así, Ormsbee et al. (1964), observó que vacunas hechas a partir de la fase I purificada de *C. burnetii*, protegían 100-300 veces más que vacunas compuestas por células en fase II. Se observó también que tras la aplicación de vacunas compuestas por células inactivadas de la fase I de *C. burnetii*, la eliminación de la bacteria a través de la placenta y leche se reducía, tanto en infecciones

experimentales como en infecciones naturales en ovejas y vacas (Behymer et al., 1976; Brooks et al., 1986; Sadecky et al., 1975). Además, estas vacunas también presentaron buenos resultados protegiendo a los animales frente a los abortos, mejorando así la fertilidad del rebaño (Behymer et al., 1976; Biberstein et al., 1977; Brooks et al., 1986; Schmeer et al., 1987). Sin embargo, alguno de estos estudios, también destacaron la falta de eficacia de la vacuna en fase I en suprimir totalmente la eliminación de la bacteria a través de la leche en vacas naturalmente infectadas (Behymer et al., 1976; Biberstein et al., 1977; Luoto et al., 1951; Schmeer et al., 1987).

Estos estudios también demostraron la importancia de proteger a los animales susceptibles no infectados, ya que la vacuna inducía una respuesta inmune tanto celular como humoral, pero no eliminaba el microorganismo una vez que la infección estaba previamente establecida. Por ello la eficacia de una vacuna dependerá de si se aplica de una manera preventiva, cuando se inmuniza a los animales antes de que se infecten, o bien si la vacuna se aplica tras la aparición de un brote de fiebre Q, momento en el cual una alta proporción de animales de la explotación está infectada. Por otra parte, las vacunas en fase II no han mostrado ningún efecto en proteger a los animales contra la infección. Hay un estudio en el que se comparaban dos vacunas comerciales aplicadas en cabras, que posteriormente fueron experimentalmente infectadas con *C. burnetii* con una dosis que inducía el 100% de abortos. Una de estas vacunas era una vacuna inactivada en fase I, y la otra una vacuna inactivada divalente para *Coxiella* en fase II y *Chlamydophila abortus* (Soriau et al., 2003). La vacuna en fase I indujo una significativa protección contra *C. burnetii* reduciendo las tasas de abortos y la excreción de la bacteria a través de los fluidos vaginales y heces, y suprimiéndola en la leche. Sin embargo, la vacuna divalente no mostró ninguna diferencia cuando se compararon los resultados con los del grupo control sin vacunar. Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Fishbein et al. (1992) en el que se vacunaron cabras con esta vacuna en fase II y en vez de suprimir la excreción de la bacteria, produjo sorprendentemente el efecto contrario.

También se han desarrollado vacunas del tipo CMRV (Chloroform-metanol residue vaccine) compuestas por el residuo que queda cuando se trata a la bacteria con cloroformo-metanol. Este residuo se caracteriza por tener una alta inmunogenicidad y una baja capacidad de provocar reacciones adversas. Se comprobó que este residuo era bastante eficaz siempre que se administrara la primera dosis a corderos y cabritos no infectados en el momento del nacimiento, la segunda dosis en el destete y la última dosis de recuerdo antes de la primera gestación (Williams et al., 1992).

La vacuna inactivada en fase I (Coxevac, CEVA Salud Animal) es la que se aplica actualmente en Europa y en España. Esta vacuna esta compuesta por células inactivadas de la fase I de la cepa Nine Mile. Su administración proporcionó buenos resultados a nivel experimental en el ganado caprino (Arricau-Bouvery et al., 2005). En infecciones naturales, la vacuna parece que no tuvo ningún efecto sobre cabras previamente infectadas, ni tampoco previno la infección en los cabritos, pero sí que fue efectiva en reducir la carga bacteriana eliminada a través de los fluidos vaginales y de la leche de los animales jóvenes (Rousset et al., 2009b; Hogerwerf et al., 2011). Resultados similares se encontraron en un estudio llevado a cabo en 3 rebaños caprinos con un total de 1701 animales (David y Cremoux, 2009, citado en EFSA, 2010). Antes de vacunar, más del 73% de los animales adultos eliminaban la bacteria a través de los fluidos vaginales, mientras que el 67.7% de los animales jóvenes no. Tras aplicar la vacuna inactivada en fase I, la eliminación de *C. burnetii* a través de los fluidos vaginales disminuyó significativamente en los animales jóvenes no infectados antes de la vacunación. La eficacia de la vacuna también ha sido estudiada en rebaños comerciales de vacas naturalmente infectadas (Guatteo et al., 2008). Tras un año de vacunación, se vio que si un animal no infectado era vacunado sin estar gestante, tenía una probabilidad 5 veces menor de convertirse en eliminador que un animal que no había recibido ningún tipo de tratamiento y/o que había sido vacunado estando gestante, resaltando una mayor eficacia de la vacuna siempre y cuando se administrase en animales susceptibles no infectados y no gestantes. En los animales gestantes la vacuna no fue eficaz, ya que parece que la gestación tiene un efecto adverso en la respuesta inmune, y se producen una serie de cambios hormonales responsables de que el sistema inmune se inmunodeprima (Tissot-Dupont et al., 2007). La respuesta Th1 se ve afectada, y como consecuencia de ello la producción de IFN- γ disminuye, siendo ésta una molécula esencial para limitar la multiplicación de *C. burnetii*. Sin embargo, aunque no se recomienda vacunar animales gestantes, en caso de aplicarse, la vacuna no parece inducir ninguna reacción ni local ni general en los animales (Guatteo et al., 2008).

En el caso de las vacunas inactivadas se recomienda dar dosis anuales de recuerdo. En un estudio realizado en el ganado bovino se concluyó que las dosis de recuerdo no eran necesarias para todos los animales, ya que el 84% de los animales presentaban bien respuesta humoral y/o respuesta celular tras la vacunación (Rodolakis et al., 2009a). Sin embargo, las dosis de recuerdo sí eran importantes en los animales jóvenes, en especial para los que se encontraban en rebaños no infectados (Rodolakis et al., 2009a). Por todo ello se recomienda vacunar tan pronto como sea posible (3-4 meses de edad) y dar dosis de recuerdo anuales antes de la inseminación artificial para obtener un máximo efecto de la vacuna (Guatteo et al., 2008). Además, en otro estudio realizado en ganado bovino, se vio

que eran necesarios al menos 4 años de vacunación para reducir al máximo la eliminación de la bacteria en la explotación (Camuset y Remmy, 2008). En lo que concierne al ganado ovino, al comienzo de esta tesis no existían estudios que mostrasen los efectos de la vacuna a corto y medio plazo en rebaños ovinos con fiebre Q.

Hoy en día las vacunas en subunidades o vacunas de DNA están en fase de desarrollo y/o experimentación. La principal ventaja de estas vacunas es que no es necesario el cultivo de *C. burnetii* ya que se trabaja con el material genético de la bacteria. Se están llevando a cabo diferentes estudios para identificar diferentes tipos de proteínas inmunógenas a la vez que se están estudiando las propiedades del LPS. Vodkin et al. (1988) observaron que la proteína de 62-kDa de choque térmico B (HspB) era inmunógena en ratones, indicando que podría conferir protección contra *C. burnetii*. Posteriormente se comprobó que la proteína de 29-kDa (P1) protegía frente a la infección cuando se infectaban ratones con dosis elevadas de *C. burnetii*, ya que la bacteria no colonizaba el bazo (Williams et al., 1990). Además se identificaron 4 posibles proteínas candidatas a ser utilizadas como antígenos (Com1, P1, Cb-Mip y IP28) y se probaron en un modelo murino con ratones BALB/c, que se infectaron con *C. burnetii*. La protección conferida por estas proteínas se evaluó según el grado de desarrollo de esplenomegalia (Zhang y Samuel, 2004). Sin embargo, los resultados de este estudio indicaron que estas proteínas recombinantes aplicadas individualmente no mostraban una protección significativa contra la infección. También se ha descrito la capacidad de inducir protección mediante la fusión de una proteína recombinante utilizando el antígeno P1 con HspB (Li et al., 2005). A pesar de que estas proteínas individualmente mostraban cierta capacidad inmunógena, cuando se recombinaban los animales presentaban una respuesta humoral y celular mayor. Además, tras la infección, el bazo de los animales inmunizados con esta proteína recombinante era más ligero e incluso el número de bacterias en el bazo era también significativamente menor. Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio en el que se han descrito un total de 9 nuevas proteínas que podrían ser candidatas a ser usadas como vacunas en subunidades (Deringer et al., 2011).

También es interesante analizar la contribución de los diferentes adyuvantes en la respuesta inmune, ya que la función de éstos es mejorar la inmunogenicidad de los antígenos, acelerar una respuesta inmune fuerte y duradera, generando anticuerpos con una mayor capacidad de neutralización, entre otras funciones. Se han probado diferentes tipos de adyuvantes con diferentes proteínas recombinantes, y se ha observado que los oligonucleótidos CpG mejoraban la respuesta humoral. La combinación del adyuvante incompleto de Freud con CpG confería la mejor protección (Zhang y Samuel, 2004). Estos

resultados sugieren que las proteínas recombinantes junto con el adyuvante adecuado podrían generar la protección adecuada.

Todos estos estudios se han realizado en animales de experimentación (ratón, cobayos) por lo que el siguiente paso sería probar estas proteínas candidatas en especies domésticas, para evaluar su potencial y compararlo con el efecto producido por la vacuna en fase I que actualmente se utiliza. En cualquier caso, para que una vacuna sea efectiva, ésta debería inducir una prolongada respuesta tanto humoral como celular que active rápidamente la producción de IFN- γ tras la exposición con *C. burnetii*, para la eliminación de la bacteria.

En cuanto a la vacuna existente para uso en humanos, existe una vacuna preparada con *C. burnetii* en fase I inactivada con formol (Q-Vax) que utiliza la cepa Henzerling. Se utiliza en Australia aproximadamente desde hace unos 25 años para prevenir la aparición de la enfermedad en trabajadores de mataderos y en otras profesiones de riesgo. Esta vacuna ha mostrado buenos resultados en lo que se refiere a la protección que ocasiona frente a la infección por *C. burnetii*. Sin embargo, su aplicación tiene que estar precedida de pruebas serológicas y de un test cutáneo para descartar la exposición previa del individuo a la bacteria. En caso de vacunar sin realizar previamente estas pruebas, la vacuna puede ocasionar efectos secundarios locales tales como abscesos cutáneos, y otros síntomas inespecíficos como fiebre, cefalea, y mialgias de cierta severidad (Waag et al., 2007).

II.9.3 Otras medidas de control y profilaxis

Existen otras medidas preventivas y/o de control para intentar reducir o prevenir la exposición de los animales susceptibles y de los humanos a los aerosoles contaminados con *C. burnetii*. Entre estas medidas se puede destacar la retirada de los materiales de riesgo, tales como las placentas y fetos, que posteriormente deberían de ser propiamente destruidos ya que pueden contener un número elevado de bacterias (10^9 - 10^{12}). Otra medida a tomar en explotaciones infectadas para evitar contagios en personas es evitar el acceso de personal ajeno a la explotación, sobre todo en el momento de la paridera que es cuando mayor riesgo de contagio existe para el personal que accede a la cuadra. En caso de acceder a las instalaciones, sería conveniente llevar ropa adecuada, calzas desechables, y guantes para manipular los productos de los abortos, en el caso de que se produzcan (EFSA, 2010).

También se debería evitar que se produzcan partos fuera de la cuadra, especialmente si se están dando casos de abortos en el rebaño. Igualmente sería conveniente la separación de los animales abortados del resto del grupo de hembras gestantes susceptibles.

Otro factor a tener en cuenta es la descontaminación del estiércol del ganado ovino y caprino con cianamida cálcica al 0.6% (Berri et al., 2003), sin embargo no se ha descrito si este tratamiento es eficaz para purín de procedencia bovina. Otra posible solución sería el compostaje, que consiste en un proceso de fermentación que mata a la bacteria a medida que la temperatura aumenta, pero no se conoce aún con exactitud el número de bacterias que hay en el estiércol ni la eficacia de este tratamiento frente a *C. burnetii* (EFSA, 2010). Lo que se debería evitar es la distribución del estiércol de una explotación positiva como abono, especialmente cuando el tiempo sea seco y con ráfagas de viento (Berri et al., 2003; Tissot-Dupont et al., 1999), por el riesgo de propagación aérea de la bacteria. Otras medidas en torno al control de la infección a través del estiércol se basan en su almacenaje dentro de la explotación durante varias semanas, y si se traslada transcurrido este tiempo se ha de hacer en un medio de transporte que asegure que el estiércol esté cubierto totalmente (Roest et al., 2011b).

Otro tipo de medidas drásticas que han tomado en los brotes de fiebre Q humana (Roest et al., 2011b) han consistido en el sacrificio de animales gestantes y de animales eliminadores (EFSA 2010), al mismo tiempo que se prohibía temporalmente la cubrición/inseminación en los rebaños para evitar partos y/o abortos, suprimiendo así de forma radical la eliminación de la bacteria.

También se recomienda la pasteurización de la leche o derivados lácteos de los rebaños infectados (Enright et al., 1957), aunque la transmisión oral no sea la principal vía de contagio para las personas (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Sin embargo, la efectividad de la pasteurización podría verse afectada por ciertas variables tales como el contenido total de grasa o el contenido de sólidos totales en la leche (EFSA, 2010).

Como se ha comentado anteriormente, las garrapatas son consideradas una fuente de infección por lo que es conveniente aplicar tratamientos acaricidas, siempre y cuando éstas representen un problema.

Finalmente, es importante mantener el estatus de negatividad en aquellas explotaciones que no han estado en contacto con *C. burnetii*. Así bastaría con realizar

controles periódicos para comprobar la seronegatividad de la explotación. Por ejemplo, en las explotaciones lecheras la realización de serologías periódicas a partir de muestras de leche de tanque, es una estrategia económica que permitirá vigilar la sanidad del rebaño. También es necesario asegurar la negatividad a *C. burnetii* de los animales de nueva introducción durante el periodo de cuarentena, antes de introducirlos con el resto de animales de la explotación (EFSA, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Selección de las poblaciones de estudio y toma de muestras

Estudio 1: Estudio seroepidemiológico de la fiebre Q en los rumiantes domésticos de la CAPV en manejo semi-extensivo

Para la realización del muestreo serológico se tuvieron en cuenta los censos ganaderos de las diferentes especies de ganado bovino de carne, ovino y caprino de la CAPV y se calculó el tamaño de muestra a tomar en cada comarca geográfica según un muestreo de tipo probabilístico por conglomerados en 2 etapas, seleccionando rebaños por afijación proporcional y animales por muestreo aleatorio simple, estableciendo un máximo de 100 explotaciones y un total de 2000 animales a estudiar. Se tomaron muestras de sangre a 626 vacas de carne, 1379 ovejas y 115 cabras, de 42, 46 y 11 explotaciones respectivamente de diferentes zonas de la CAPV (Figura III.1), muestreadas entre los meses de octubre de 2007 y abril de 2008. En los animales seleccionados en cada explotación (un máximo de 15 vacas, 30 ovejas y 10 cabras) estaban representados los diferentes grupos de edad, animales entre 6 meses y 1 año, entre 1 y 2 años y mayores de 2 años. La toma de sueros iba acompañada de la realización de una breve encuesta donde se registraba si la explotación tenía problemas de abortos y/o fallo reproductivo.

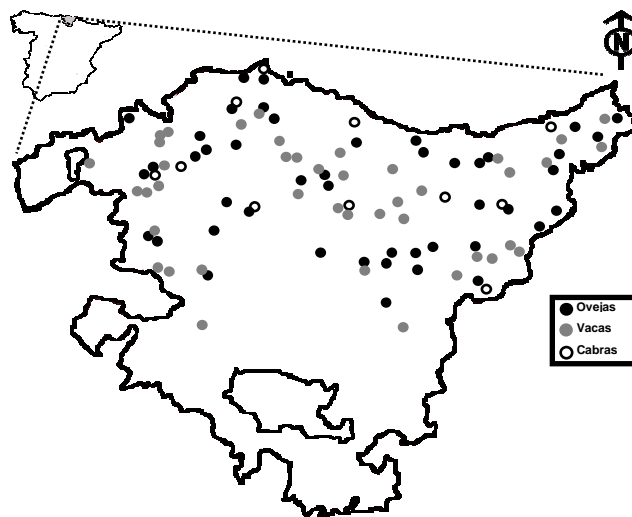


Figura III. 1. Localización de las diferentes explotaciones muestreadas.

Estudio 2: Investigación molecular de la presencia de *C. burnetii* en animales silvestres y en las garrapatas que les parasitan

La CAPV consta de una amplia y abundante fauna silvestre compuesta principalmente por ungulados (ciervo ibérico, *Cervus elaphus hispanicus*; corzo *Capreolus*

capreolus; y jabalí europeo, *Sus scrofa*), carnívoros silvestres (principalmente tejón, *Meles meles* y zorro, *Vulpes vulpes*), diferentes especies de micromamíferos y una gran variedad de aves tanto residentes como migratorias. La presencia de lagomorfos es escasa (conejo europeo, *Oryctolagus cuniculus*; y liebre europea *Lepus europaeus*), restringidos a zonas de influencia continental (Palomo y Gisbert, 2002).

Las muestras se recogieron en 243 localizaciones diferentes de la CAPV y algunos ejemplares en comunidades autónomas colindantes (Figura III.2). Las muestras se recogieron desde enero del 2001 hasta abril de 2006 dentro de un estudio llevado a cabo para analizar el estado sanitario de la fauna silvestre en el País Vasco. Las especies cinegéticas se muestrearon en periodos de caza: ciervos y jabalíes desde Octubre a Febrero, y corzos en primavera y verano. La mayoría de los zorros se cazaron en invierno. El resto de especies se recogieron a lo largo de todo el año, y en general fueron ejemplares hallados muertos, mayoritariamente debido a atropellos. Una vez en el laboratorio, se llevó a cabo la necropsia con la excepción de los ciervos, corzos y jabalíes, que fueron examinados y muestreados en el momento de la cacería. Las muestras de tejidos (bazo y/o pulmón) fueron almacenadas a -20°C antes de ser procesadas por PCR. Se apuntaron las coordenadas geográficas de los lugares de recogida o captura de los ejemplares. Se estudiaron un total de 601 muestras de tejidos que correspondían a 206 carnívoros, 28 lagomorfos, 199 ungulados y 168 aves silvestres (Tabla III.1).

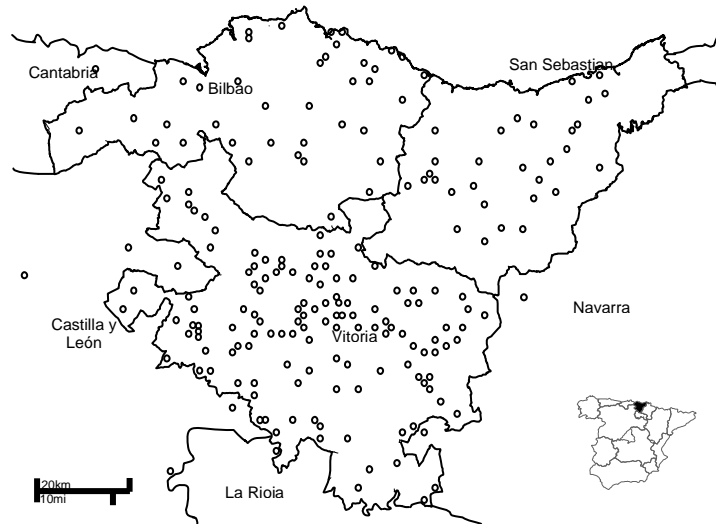


Figura III. 2. Localización de los puntos de muestreo.

Siempre que era posible, se examinaba con detalle a los animales externamente para recoger las garrapatas que tuvieran enganchadas. Cuando los animales presentaban garrapatas, éstas eran retiradas, se contaban y se identificaban según unas claves

taxonómicas específicas (Manila, 1998). En el caso de los animales cazados, no fue posible recoger garrapatas de todos ellos, y en los que fue posible, la inspección y recogida de garrapatas se realizó en un trozo de piel. Tras la identificación, las garrapatas eran congeladas a -20°C hasta su posterior procesado. Se recogieron un total de 1303 garrapatas entre adultos, ninfas y larvas de las cuales 897 correspondían a cérvidos, 379 a carnívoros, 17 de jabalíes, 7 de lagomorfos y 3 de aves silvestres. Se analizaron un total de 340 adultos por PCR.

Tabla III. 1. Relación de animales silvestres estudiados por PCR.

Hospedador	Familia	Animales estudiados
AVES	Anatidae	3
	Ardeidae	12
	Ciconiidae	5
	Procellariidae	3
	Alcidae	3
	Burhinidae	1
	Charadriidae	5
	Charadriiformes	11
	Laridae	1
	Accipitridae	47
	Falconidae	15
	Phasianidae	5
	Rallidae	3
	Corvidae	5
	Ploceidae	1
	Sturnidaae	4
	Sylviidae	1
	Turdidae	1
	Phalacrocoracidae	2
	Sulidae	1
	Picidae	1
Podicipedidae	1	
Strigidae	14	
Tytonidae	23	
	Total	168
UNGULADOS	Cervidae	106
	Suidae	93
	Total	199
CARNIVOROS	Canidae	63
	Felidae	6
	Mustelidae	125
	Viverridae	12
	Total	206
LAGOMORFOS	Leporidae	28
	Total	28
	TOTAL	601

Estudios 3, 4, 5 y 6: Selección de rebaños ovinos de raza Latxa

Los rebaños seleccionados para los estudios 3, 4, 5 y 6 son de raza Latxa, la raza ovina autóctona del País Vasco, que representa el 90% de los rebaños ovinos del País Vasco. El 88% de los rebaños tiene menos de 100 ovejas, mientras que el restante 12% tienen entre 100-600 ovejas. La mayoría de los rebaños tiene un sistema de manejo semi-extensivo, permaneciendo en estabulación en el momento del parto y a lo largo del periodo de ordeño, durante los meses de invierno y primavera. En verano los rebaños suben a zonas de monte con objeto de aprovechar los recursos naturales. El periodo de cubrición tiene lugar durante los meses de mayo-julio en la zona costera, y entre septiembre y octubre en las zonas de interior. Las ovejas latxas tienen un parto al año, y la paridera transcurre desde el mes de noviembre hasta febrero/marzo en el caso de las ovejas adultas, y desde marzo a abril, en el caso de las primaras (ovejas de primer parto).

La oveja latxa se caracteriza por su aptitud lechera. Tras un periodo de amamantamiento de 20-30 días, se retira el cordero para su venta, con 12-13 kg de peso, y a continuación las ovejas se destinan a ordeño, a excepción de las ovejas que crían la reposición, durante unos tres meses. El ordeño se realiza dos veces al día y la duración de la lactación suele ser aproximadamente de unos 140 días (lactación tipo de 120 días).

La selección de estos 4 rebaños se debió a la sospecha y confirmación de abortos por fiebre Q en la gestación de la campaña 2006/07 (rebaño de los estudios 3 y 6), o en la gestación de la campaña 2007/08 (rebaños del estudio 4). El rebaño del estudio 5 se seleccionó por haberse detectado DNA de *C. burnetii* en leche de tanque en 2005 y una elevada seropositividad frente a *C. burnetii*, así como antecedentes previos de abortos.

Estudio 3: Cinética de excreción de *C. burnetii* en un rebaño ovino lechero tras el tratamiento con oxitetraciclina

En el año 2007 se seleccionó 1 rebaño infectado por *Coxiella*, ya que dio positivo en los análisis moleculares de la leche de tanque y que tenía historial reciente de abortos por fiebre Q. En el momento en que el ganadero acusó el comienzo de los abortos, el rebaño fue tratado con tratamiento antibiótico que consistió en una doble inyección de 20mg/Kg. de OTC (Tenalina LA, CEVA Salud Animal) en los días 100 y 120 de gestación aproximadamente. Se solicitó el censo total del rebaño con sus fechas correspondientes de nacimiento a la Asociación de Raza Latxa y una vez obtenido, se ordenaron las ovejas en orden ascendente de acuerdo a su fecha de nacimiento. Posteriormente, una de cada cuatro

ovejas fue seleccionada para el grupo control quedando los restantes animales para el grupo tratado. De esta manera, se trató al 75% de las ovejas y el restante 25% se dejó como grupo control para posteriormente comparar la posible eficacia del tratamiento. El ganadero registró los crotales de las ovejas abortadas tras el primer tratamiento, y se tomaron muestras de fluidos vaginales y sueros a ovejas abortadas. También se solicitó al ganadero que guardara los fetos y placentas para verificar que los abortos eran debidos a fiebre Q. Cuando empezó la paridera se recogieron muestras de fluidos vaginales, heces y leche de animales tratados y no tratados para valorar la eficacia del tratamiento con oxitetraciclina (Figura III.3). Mensualmente a lo largo del periodo de lactación se tomaron este tipo de muestras para comprobar la duración de los periodos de excreción de *C. burnetii* a través de cada tipo de muestra y comprobar así el efecto del tratamiento. El procesado de estas muestras se describirá en el punto III.3.



Figura III. 3. Toma de muestras de leche, heces y fluidos vaginales.

Estudio 4: Estudio del efecto de la vacunación sobre la excreción de *C. burnetii* y la contaminación medioambiental tras el parto en dos rebaños ovinos altamente infectados

Tal y como se acaba de comentar, en la gestación de la campaña 2007/08 se identificaron 2 rebaños con abortos causados por *C. burnetii* (F1 y F2). El rebaño F1 presentó una tasa de abortos del 6.3%. Se recogieron fetos y placentas de ovejas abortadas y se confirmó el aborto por *C. burnetii* tras la observación de lesiones específicas en placenta y la detección de DNA de *C. burnetii*. También se tomaron hisopos vaginales de otros animales que habían abortado y de animales que habían parido normalmente y se detectó *C. burnetii* en un 62.5% de las muestras analizadas (10/16). Se sangró el rebaño completo y se obtuvo una seroprevalencia frente a *C. burnetii* del 35.7%.

El rebaño F2 presentó una tasa de abortos del 5.2%. Se confirmó el aborto por fiebre Q a través de analíticas laboratoriales en fetos y placentas de hembras abortadas. Igualmente se tomaron otras muestras, al igual que en el caso anterior, y el 95% de las ovejas muestreadas (19/20) fueron positivas a *C. burnetii* al detectarse DNA en muestras de

fluidos vaginales tras el aborto. Se sangró el rebaño en su totalidad y se obtuvo una seroprevalencia del 43.8%.

Tras confirmar la infección por *C. burnetii* en ambos rebaños, los ganaderos estuvieron de acuerdo en vacunar con la vacuna inactivada en fase I de CEVA, Salud Animal. Se obtuvieron los permisos oportunos de la Agencia Española del Medicamento (AEM) para la importación de la vacuna, que en aquel momento no estaba disponible en España, y de la Diputación Foral que es el organismo competente en temas de Experimentación y Bienestar animal. En primer lugar se solicitó el censo total de los rebaños con sus fechas correspondientes de nacimiento a la Asociación de Criadores de Raza Latxa y una vez obtenidos, se ordenaron las ovejas en orden ascendente de acuerdo a su fecha de nacimiento. Posteriormente, una de cada cuatro ovejas adultas fue seleccionada para el grupo control sin vacunar quedando los restantes animales en el grupo vacunado. Así pues, se vacunó y revacunó el 75% de las ovejas adultas, 6 y 3 semanas antes de la fecha de cubrición respectivamente. En el caso de las corderas de reposición se vacunó y revacunó el 50%. El objetivo de dejar un lote control sin vacunar fue el comparar los resultados de la eficacia de la vacuna. El seguimiento de la eficacia de la vacuna se realizó de diversas formas. En primer lugar se hizo un seguimiento de la aparición de abortos, siendo el propio pastor el que realizó anotaciones sobre ovejas abortadas y su identificación, y el encargado de avisar para la toma de muestras de animales abortados. Una vez comenzada la paridera se tomaron muestras de moco vaginal en ovejas recién paridas (vacunadas y no vacunadas). Estas muestras se analizaron mediante PCR y las que eran positivas se cuantificaba la carga bacteriana mediante una PCR a tiempo real. Para confirmar la existencia de infección activa en los rebaños se estudió el porcentaje de seroconversión en los animales no vacunados de primer parto, a los que se tomó 2 muestras de sangre: antes de la vacunación y en el momento del parto.

Desde el comienzo hasta el fin de la lactación se tomaron muestras de aire en el interior y en el exterior de la explotación con el objeto de detectar la presencia de *C. burnetii* en los aerosoles generados en la paridera. Se utilizó un muestreador de aire (Air Sampler, MD8 airscan, Sartorius Goettingen, Germany) a una velocidad de 100 litros/min durante 10 minutos (Figura III.4). Este muestreador de aire funciona según los principios de la filtración, succionando un volumen definido de aire a través del filtro de gelatina, donde quedan retenidos los microorganismos que contiene el aire. Posteriormente se procedió a la extracción de DNA a partir de los filtros de gelatina, y a su procesado mediante PCR.



Figura III. 4. Muestreador de aire (Air Sampler, MD8 airscan, Sartorius).

Estudio 5: Evaluación de la reducción de la eliminación de *C. burnetii* en un rebaño ovino naturalmente infectado tras 4 años de vacunación con vacuna en fase I.

El rebaño que formó parte en este estudio fue vacunado durante 4 años según el protocolo de vacunación con la vacuna COXEVAC (CEVA, Salud Animal). Este rebaño presentaba un historial de problemas reproductivos, por lo que se decidió tomar una muestra de leche de tanque para analizar la presencia de DNA de *C. burnetii*. Ésta fue positiva en abril de 2005 y tras sangrar algunos de los animales, el 66.7% (20/30) presentaban anticuerpos a *C. burnetii*. Este rebaño fue vendido y el nuevo propietario estuvo interesado en saber si la fiebre Q permanecía en el rebaño, por lo que se tomó una nueva muestra de leche de tanque en la primavera de 2007, que fue positiva por PCR. Posteriormente se sangró a todo el rebaño y se observó una seroprevalencia del 56.6%. Por lo que el ganadero decidió vacunar. Al igual que se ha comentado en el punto anterior, se obtuvieron los permisos oportunos de la AEM y la Diputación Foral. Se trataron los datos del censo de la misma forma que se ha detallado en el punto anterior, y el primer año (2007/08) se vacunó al 75% de las ovejas y un 25% del rebaño se quedó como lote control. Se registraron los abortos que se iban produciendo, y se tomaron muestras de moco vaginal, leche y heces de animales vacunados y no vacunados en el primer mes tras la paridera para evaluar si la vacuna tenía un posible efecto en la reducción del número de animales eliminadores de *C. burnetii* o si la carga bacteriana eliminada a través de las distintas rutas era diferente. En el segundo año (2008/09), se vacuno el 100% de las ovejas y el 50% de las corderas. Se tomaron hisopos vaginales, leche y heces de animales vacunados y no vacunados tras la paridera y además se recogieron muestras de aerosoles desde el inicio de la paridera hasta el final de la lactación para comprobar la presencia en los posibles aerosoles generados dentro y fuera de la cuadra. Además, se sangró a la reposición antes de vacunar y tras el

parto para comprobar posibles seroconversiones en los animales no vacunados y comprobar si la infección seguía activa, tras el segundo año de vacunación. En el tercer y cuarto año de vacunación, el rebaño fue vacunado al 100% y al comienzo de la paridera se recogieron hisopos vaginales, leche de tanque y muestras de aerosoles. Además de las muestras mencionadas, el último año de vacunación se recogieron muestras medioambientales, consistentes en hisopos tomados de diversas superficies de las instalaciones del rebaño (Figura III.5). Se recogía el polvo depositado en las diferentes superficies sólidas como las repisas de las ventanas, superficies de paredes, puertas, máquina de ordeño, tractores etc. de la explotación así como muestras de suelo para detectar si la bacteria permanecía en el medio ambiente. Todas estas muestras se sometieron a extracción de DNA y PCR.



Figura III. 5. Toma de muestras de medioambientales de las diferentes superficies de la explotación.

Estudio 6: Experiencia de campo de un programa control contra la fiebre Q basado en el tratamiento con oxitetraciclina seguido de vacunación en las sucesivas estaciones reproductivas en un rebaño ovino altamente infectado.

En este trabajo se ha contado con el rebaño descrito en el estudio 3. El primer año de estudio, en la gestación de la temporada 2007/08 se aplicó un doble tratamiento con OTC en el momento en que comenzaron los abortos, tal y como se ha detallado anteriormente. En la cubrición de la temporada 2008/09, el rebaño fue vacunado con la vacuna inactivada de fase I de *C. burnetii* de CEVA (Salud Animal). Se vacunó y revacunó el

75% de las ovejas adultas y el 50% de las primas 6 y 3 semanas previas de la inseminación artificial, dejando así un lote control en ambos grupos de edad para comparar los resultados de la eficacia de la vacuna. Tanto el grupo de los animales vacunados como el de no vacunados estaban homogéneamente compuestos por animales tratados con antibióticos y no tratados el año anterior. El objetivo fue evaluar la combinación del efecto del tratamiento antibiótico en el momento de los abortos y posterior vacunación antes de la siguiente temporada de cubriciones, en la reducción de la infección en el rebaño. Se recogieron muestras de moco vaginal, leches y heces individuales tras el parto para evaluar la eficacia de la vacunación, valorando, además, el posible efecto de haber recibido un tratamiento previo con oxitetraciclina la temporada anterior. Además, también se extrajo sangre antes de vacunar y tras el parto al grupo de las corderas de reposición (primas) no vacunadas para comprobar si existía o no seroconversión frente a *C. burnetii*. Las muestras que resultaron ser positivas por PCR convencional, fueron cuantificadas para ver si la carga bacteriana eliminada por los animales se veía influida por las medidas de control realizadas.

En las temporadas 2009/10 y 2010/11 se vacunó la totalidad del rebaño. Se tomaron muestras de fluidos vaginales tras las parideras respectivas a un grupo de ovejas para valorar el nivel de excreción de *C. burnetii* a lo largo 4 años de control de la fiebre Q.

III.2 Técnicas serológicas

Para detectar la presencia de anticuerpos anti-*C. burnetii* en suero, se utilizó un ELISA comercial (ELISA Cox kit, LSI-Laboratoire Service International, France) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit usa un antígeno aislado de rumiantes, y más específicamente, de una cepa causante de abortos en ganado ovino (cepaCbO1). Este kit comercial fue validado por el INRA (A. Rodolakis) utilizando muestras procedentes de una infección experimental realizada con 41 vacas, 17 cabras y 31 ovejas. Se comprobó que el ELISA que utilizaba antígeno de rumiantes ofrecía una mayor sensibilidad y especificidad que el ELISA que usaba antígeno obtenido a partir de la cepa Nine Mile aislada de garrapata (Kováčová et al., 1998; Rodolakis 2006; Rodolakis et al., 2007) según datos facilitados por el fabricante, la sensibilidad del kit con antígeno procedente de rumiantes era del 100% mientras que la especificidad del 99.5%.

Para determinar la negatividad o positividad de una muestra se calculó el ratio S/P mediante la siguiente fórmula:

$$S/P = (OD \text{ muestra} - OD \text{ NC}) / (OD \text{ PC} - OD \text{ NC})$$

Donde, OD muestra = densidad óptica de la muestra problema

OD NC = densidad óptica del control negativo

OD PC = densidad óptica del control positivo

Los resultados se expresaron con el índice S/P x 100. Si el índice S/P del suero analizado era ≤ 40 , la muestra era considerada negativa, mientras que índices S/P > 40 indicaban que el suero era positivo.

En el estudio 1, los sueros que fueron positivos con la técnica ELISA, se volvieron a analizar mediante FC según el procedimiento estándar descritos por la OIE (2008). El antígeno de *C. burnetii* fue proporcionado por Dade Behring (Marburg, Germany) usando las cepas Nine Mile y Henzerling producidas en huevos embrionados. Según los estándares de la OIE, las muestras que presentaban títulos menores de 1/5, se consideraban negativas, las que presentaban títulos entre 1/10 y 1/40 indicaban infecciones latentes mientras que títulos superiores a 1/80 indicaban una fase evolutiva de la infección.

III.3 Técnicas moleculares

III.3.1 Extracción DNA

La obtención del DNA de *C. burnetii* a partir de las muestras recogidas en los diferentes estudios se realizó con un kit de extracción comercial, DNA/RNA BioSprint 96 de QIAGEN (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante pero con algunas modificaciones dependiendo del tipo de muestra. La extracción con este kit estaba asociada al uso de un robot de extracción de DNA/RNA (Figura III.6) que utiliza un sistema de partículas magnéticas que permite obtener gran cantidad de DNA y de elevada pureza y con el cual se pueden extraer hasta 96 muestras de forma simultánea.



Figura III. 6. Robot de extracción.

Los procedimientos de extracción, incluyendo el tratamiento previo, han variado en función del tipo de muestra a analizar. A continuación se describen los pasos dados en la extracción de DNA según el tipo de muestra.

Garrapatas: Para la extracción del DNA de las garrapatas, se colocaba individualmente cada garrapata adulta en un tubo de 2 ml junto con 240 μ l de buffer PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7,2) y se le añadían aproximadamente de 5 a 6 bolitas de acero inoxidable. Se introducían los tubos en el homogeneizador (Precess 48 Bio-Rad) durante el tiempo mínimo necesario para lograr su disgregación. Del homogeneizado obtenido, 100 μ l eran destinados para la extracción de DNA y el resto del homogeneizado era almacenado a -20°C . A los 100 μ l del homogeneizado se le agregaban 20 μ l de Proteinasa K (8 mg/ml) y 140 μ l del tampón ATL. Tras mezclar bien la muestra con vórtex, se procedía a su incubación a 56°C durante 2 horas, agitando ocasionalmente. Tras las 2 horas de incubación, se añadían 140 μ l del tampón AL a la muestra y se incubaba nuevamente a 70°C durante 10 minutos. Finalizadas las incubaciones, se añadía toda la mezcla a una placa del kit donde se añadía a la muestra 200 μ l de isopropanol y se mezclaba bien. Después se añadían 30 μ l de una suspensión magnética y tras mezclar bien, se ponía la placa en el robot para que llevara a cabo la extracción.

Tejidos: En cuanto a la extracción de los tejidos de los animales silvestres, principalmente bazo y/o pulmón, se cortaba 20 mg de tejido y se añadía 180 μ l del tampón ATL y 20 μ l de Proteinasa K (8 mg/ml). Tras mezclar bien la muestra con vórtex, se procedía a su incubación a 56°C durante 3 horas, agitando ocasionalmente. Posteriormente, se volvía a incubar la muestra a 70°C durante 10 minutos tras añadir 200 μ l del tampón AL. Una vez realizadas las incubaciones se procedía a realizar la extracción tal y como se indica en el apartado de las garrapatas. Las muestras de placenta también se vieron sometidas al mismo tipo de procesado.

Leche: Para la extracción de leche, se añadía 180 μ l del tampón ATL, 200 μ l de leche y 20 μ l de Proteinasa K (8 mg/ml). Tras mezclar bien la muestra con vórtex, se procedía a su incubación a 70°C durante 30 minutos, mezclando ocasionalmente. Posteriormente, se volvía a incubar la muestra a 70°C durante 10 minutos tras añadir 200 μ l del tampón AL. Una vez realizadas las incubaciones se procedía a realizar la extracción tal y como se ha indicado previamente.

Hisopos: Los hisopos vaginales y los hisopos de muestras medioambientales eran cortados a la mitad reservando una parte por si fuera necesario repetir el proceso de

extracción. A esta mitad se le añadía 300 µl de buffer TE (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), 180 µl del tampón ATL y 20 µl de Proteinasa K (8 mg/ml) y se incubaba a 56°C durante 1 hora. Después, se añadía 200 µl del tampón AL y se incubaba a 70°C durante 10 minutos y se procedía a la extracción de DNA.

Heces: En cuanto a las heces (también las muestras de suelo), se pesaba 1 gr. y se mezclaba con 4 ml de buffer TE y se hacía vortex para homogenizar la muestra. Una vez homogenizada, se centrifugaba durante 2 minutos a 3000 g y se recogían 200 µl de sobrenadante que se mezclaba con 180 µl del tampón ATL y 20 µl de Proteinasa K (8 g/ml) que se incubaba durante 30 minutos a 70°C. A continuación, se le añadía 200 µl del tampón AL, se mezclaba y se incubaba a 70°C durante 10 minutos. Tras la incubación, se procedía a la extracción de DNA con el robot.

Filtros de gelatina con aerosoles: En relación a los filtros de gelatina procedentes del muestreador de aire, éstos se colocaban individualmente en una placa de petri añadiendo 2 ml de tampón ATL homogenizando bien. Se pasaba esta mezcla a un tubo de 15 ml y se agitaba con vórtex y se centrifugaba a 2000g 1 minuto. Se tomaban 1000 µl de esta mezcla y se le añadían 500 µl del tampón ATL y 50 µl de Proteinasa K (8 mg/ml) y se incubaba durante 1 hora a 56°C, mezclando ocasionalmente. A continuación, se le añadía 500 µl del tampón AL, se mezclaba y se incubaba a 70°C durante 10 minutos. Finalizadas las incubaciones, se añadía a la muestra 500 µl de etanol absoluto y se mezclaba bien. Al ser el volumen de la muestra grande, la extracción del DNA se realizó con un kit comercial, QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Tras mezclar bien se pasaba todo el contenido a las columnas de extracción y se centrifugaba a 8.000 rpm durante un minuto. Como no entraba todo el volumen de la muestra en la primera centrifugación, se repetía este paso hasta acabar con todo el volumen. Seguidamente, se añadía el tampón AW1 y se centrifugaba a 8.000 rpm durante un minuto, se añadía el tampón AW2 y se centrifugaba dos veces a 13.000 rpm durante 3 minutos. Para finalizar la extracción el ADN se eluía en un volumen de 60 µl del tampón de elución.

Como medida de seguridad, en cada lote de extracción de 10 muestras se incluía un control negativo de extracción con el fin de detectar posibles contaminaciones en el proceso de extracción. Todo el proceso de preparación de la muestra que se realizaba antes de la primera incubación era realizado en cabina de alta seguridad con las medidas de seguridad adecuadas (doble guante, mascarilla...).

La concentración y la pureza del DNA extraído de cada muestra fue determinada en el espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, DE, EEUU).

III.3.2 PCR convencional

El DNA procedente tanto de las garrapatas, de los tejidos de los animales silvestres, de los hisopos vaginales, de las leches, heces, de los filtros de los aerosoles, hisopos de muestras medioambientales, suelo, y otras muestras, se sometía a PCR para la detección de DNA de *C. burnetii* amplificando la secuencia de inserción que codifica para el gen de la transposasa IS1111 descrita por Willems et al. (1994).

Para disponer de controles positivos para la reacción de PCR, se clonó el amplicón de la región génica diana de la PCR. Para ello, se procedió inicialmente a la extracción y purificación de los fragmentos de DNA obtenidos en geles de agarosa con el GFX-PCR kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). El producto purificado se clonó mediante la ligación con el vector pCR®4-TOPO®, y posteriormente el vector recombinante se insertó en células *E. coli*, químicamente competentes, de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante (TOPO TA Cloning® kit for Sequencing, Invitrogen, CA, EEUU). Los productos obtenidos fueron posteriormente secuenciados.

Los cebadores empleados fueron sintetizados por la empresa MWG Biotech AG (Alemania). La secuencia de los cebadores, el gen diana para cada uno de ellos y el tamaño del producto amplificado se muestran en la Tabla III.2.

Tabla III. 2. Cebadores empleados en la PCR.

Agente	Cebador	Secuencia (5' – 3')	Amplicón	Gen	Referencia
<i>C. burnetii</i>	Trans 1	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	687 pb	IS1111	Willems et al., 1994
	Trans 2	CCCAACAACACCTCCTTATTC			

La concentración y el volumen de los reactivos empleados en PCR se detallan en la Tabla III.3.

El volumen final de la reacción era de 25 µl y la cantidad de DNA de la muestra oscilaba entre 75 y 100 ng. En cada reacción de PCR se incluía un control negativo, el cual contenía todos los reactivos excepto el DNA, que era sustituido por el mismo volumen de agua libre de DNAsas y ARNAsas (Sigma-Aldrich Química S.A., España). Este control

permitía comprobar que ninguno de los reactivos de PCR estaba contaminado. También se incluía un control positivo para asegurar que la PCR funcionaba adecuadamente.

Tabla III. 3. Componentes en la reacción de PCR.

Reactivo (Concentración)	Concentración final	Volumen (por tubo PCR)
Cebador Trans 1 (10 µM)	0.4 µM	1
Cebador Trans 2 (10µM)	0.4 µM	1
Buffer 10x	1x	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	3 mM	1.5
dNTP mix (2 mM)	200 µM cada	2.5
Taq Polymerase (5u/µl)	1U	0.2
Agua estéril calidad 1		c.s.p. vol final (µl)

c.s.p. cantidad suficiente para completar el volumen requerido

Una vez realizada la premezcla y añadida la muestra se utilizaba el programa señalado en la Tabla III.4 donde se indican las temperaturas, tiempos y número de ciclos empleados.

Tabla III. 4. Temperaturas, tiempos y número de ciclos empleados en la reacción de PCR.

	Temperatura	Tiempo	Nº ciclos
Desnaturalización	94°C	30 seg	
Unión de cebadores	69°C (↓ 2°C cada ciclo)	1 min	5
Extensión	72°C	1 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg	
Unión de cebadores	61C	30 seg	40
Extensión	72°C	1 min	
Fase de enfriado	4°C	hold	

Una vez acabada la amplificación, se realizaba la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% para posteriormente visualizar mediante UV las bandas obtenidas (687pb). En el gel se incluía un marcador de peso molecular para asegurar que el correcto tamaño del amplicón obtenido.

III.3.3 PCR a tiempo real

Con el objetivo de evaluar la eficacia de los métodos de control empleados (tratamiento antibiótico y vacunación) y de estimar la carga bacteriana excretada por los animales o presente en las muestras medioambientales, las muestras positivas por PCR convencional se analizaron mediante qPCR a tiempo real. Se utilizó un kit comercial de LSI (Taq-Vet *Coxiella burnetii*, Laboratoire Service International, Lissieu, France) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Esta qPCR es duplex ya que incluye una sonda que amplifica para la región repetitiva de la transposasa de *C. burnetii* y una sonda que detecta un gen codificado por el huésped (GAPDH) que se utilizó como control interno de amplificación (CI). El volumen final de la qPCR fue de 25 µl y el proceso de amplificación y detección se llevó a cabo en un termociclador ABIPRISM 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems), utilizando un programa que incluía una primera fase a 50°C durante 2 minutos, seguida de una fase a 95°C 10 minutos y una última fase de amplificación a 95°C 15 segundos y 60°C 1 minuto de 40 ciclos de duración. En cada reacción de qPCR se incluía también un control negativo de qPCR para comprobar que ninguno de los reactivos estaba contaminado.

Se consideró que una muestra era positiva cuando el valor del Ct del gen diana era inferior a 40 y existía amplificación en el CI que se incluía para evitar falsos negativos a causa de la presencia de posibles inhibidores en la muestra. Las muestras eran cuantificadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores de Ct obtenidos para el gen diana eran transformados en valores estimados de *C. burnetii* usando diluciones seriadas de concentraciones de un control positivo externo que se incluye en el kit.

III.4 Análisis estadísticos generales

Para realizar los diferentes análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Tal y como se detalla en los diferentes artículos, se utilizaron diferentes procedimientos, principalmente la comparación de medias mediante el procedimiento GLM, y la comparación de proporciones mediante Chi cuadrado o el test de Fisher.

IV. ARTÍCULOS / ESTUDIOS

Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems

Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R.A., García-Pérez, A.L.

BMC Veterinary Research 2010; 6, 3.

ABSTRACT

Background

Q fever, a worldwide zoonotic disease caused by *Coxiella burnetii*, is endemic in northern Spain where it has been reported as responsible for large series of human pneumonia cases and domestic ruminants' reproductive disorders. To investigate pathogen exposure among domestic ruminants in semi-extensive grazing systems in northern Spain, a serosurvey was carried out in 1,379 sheep (42 flocks), 626 beef cattle (46 herds) and 115 goats (11 herds). Serum antibodies were analysed by ELISA and positive samples were retested by Complement Fixation test (CFT) to detect recent infections.

Results

ELISA anti-*C. burnetii* antibody prevalence was slightly higher in sheep ($11.8 \pm 2.0\%$) than in goats ($8.7 \pm 5.9\%$) and beef cattle ($6.7 \pm 2.0\%$). Herd prevalence was 74% for ovine, 45% for goat and 43% for bovine. Twenty-one percent of sheep flocks, 27% of goat and 14% of cattle herds had a *C. burnetii* seroprevalence $\geq 20\%$. Only 15 out of 214 ELISA-positive animals reacted positive by CFT. Age-associated seroprevalence differed between ruminant species with a general increasing pattern with age. No evidence of correlation between abortion history and seroprevalence rates was observed despite the known abortifacient nature of *C. burnetii* in domestic ruminants.

Conclusions

Results reported herein showed that sheep had the highest contact rate with *C. burnetii* in the region but also that cattle and goats should not be neglected as part of the domestic cycle of *C. burnetii*. This work reports basic epidemiologic patterns of *C. burnetii* in semi-extensive grazed domestic ruminants which, together with the relevant role of *C. burnetii* as a zoonotic and abortifacient agent, makes these results to concern both Public and Animal Health Authorities.

INTRODUCTION

Q fever is a worldwide distributed zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, a ubiquitous Gram-negative bacterium that is able to infect humans and a wide range of animals, both aquatic and terrestrial (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Maurin and Raoult, 1999). Q fever is a polymorphic disease in humans with subclinic, acute and chronic forms (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Maurin and Raoult, 1999). Several groups in Spain have studied the clinical aspects and the distribution of the disease in different regions (Bolaños et al., 2003b; Cardeñosa et al., 2006; Pascual-Velasco, 1996). The disease seems to be more prevalent in northern Spain than in the central and southern regions of the country, and it is especially high

in the Basque Country (northern Spain) where large series of human pneumonia cases due to *C. burnetii* have been reported (Maurin and Raoult, 1999; Sobradillo et al., 1989). It is proposed that *C. burnetii* is maintained in nature following two different cycles, the wild cycle in which ticks and wild animals are involved, and the domestic cycle, where ruminant and other animal species such as dogs and cats are the main reservoirs (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Maurin and Raoult, 1999). Nonetheless, the link between both proposed cycles is currently weakly known, especially because the domestic cycle has been considered the main source for human infection (Lang, 1990) and has therefore been the focus of most studies.

Clinical outcome of *C. burnetii* infection in domestic ruminants consists of abortion and stillbirths in sheep and goats while it causes infertility and mastitis in cattle (Woldehiwet, 2004). No clinical signs are evidenced in non-pregnant animals. When abortion occurs, or even when ewes lamb normally, animals shed a high number of *C. burnetii* through placenta, vaginal fluids, faeces and milk (Astobiza et al., 2010; Maurin and Raoult, 1999; Rodolakis et al., 2007). Infectious abortion in domestic ruminants is a multi-etiological process that causes important losses in the livestock industry. Furthermore, the zoonotic nature of most of the abortifacient pathogens is a cause for concern from the perspective of Public Health. While attention has been paid to most of these pathogens, such as *Brucella*, *Chlamydochila* or *Toxoplasma* in sheep, others like *C. burnetii* have not been routinely investigated in cases of abortion. The recent application of molecular techniques to study fetal tissues and placenta indicates that *C. burnetii* could be more prevalent than previously thought (Oporto et al., 2006; Perugini et al., 2009).

Serological surveys have been carried out in many countries to evaluate the distribution of *C. burnetii* in domestic ruminants. In some areas bovine seems to be the main reservoir (Cabassi et al., 2006; Kim et al., 2006; To et al., 1998a) whereas in others, goats (Hatchette et al., 2001; Loukaides et al., 2006) or sheep (Hellenbrand et al., 2001; Kennerman et al., 2010; Tissot-Dupont et al., 2004) are the main domestic reservoir. However in other studies, serological surveys indicate that the different domestic ruminant species can play together a relevant role in the domestic cycle of *C. burnetii* (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Cekani et al., 2008; Hatchette et al., 2002; Psaroulaki et al., 2006). In addition, different management systems showed different degree of exposure to infection (Capuano et al., 2001). Regarding Spain, few serological evidences have been reported both in domestic and wild ruminants (Pascual-Velasco, 1996; Ruiz-Fons et al., 2008).

Under the current panorama of Q fever re-emergence and the lack of information on the current status of *C. burnetii* infection in domestic ruminants in one of the most traditional

livestock producing regions in Spain, we aimed to determine the epidemiological situation of this pathogen in the framework of a larger project on coxiellosis in livestock and wildlife. This study updates the status of this zoonotic pathogen in the ruminants population of the Basque Country and highlights the main risks for human infection in a hyperendemic Q fever region. We also evaluated if the age of the animals might account for differences in exposure to *C. burnetii*. Moreover, relationships between *C. burnetii* contact rate and abortion history at the herd level were also investigated.

MATERIAL AND METHODS

Study area

The Basque Country (7,234 km²) is a region located in northern Spain (Figure IV.1). Livestock production is one of the pillars of the rural economy of the region, with a total amount of 344,288 sheep, 160,000 cattle (dairy and beef) and 28,500 goats (Eustat: Basque Statistics Institute). Livestock production is widely scattered throughout the region and the number of herds is high, with approximately 5,300 sheep, 6,915 cattle (dairy and beef) and 2,000 goat herds. Semi-extensive production is predominant for sheep, beef cattle and goats, and it is characterized by housing in winter months until early spring, when parturition occurs, and extensive grazing the rest of the year.

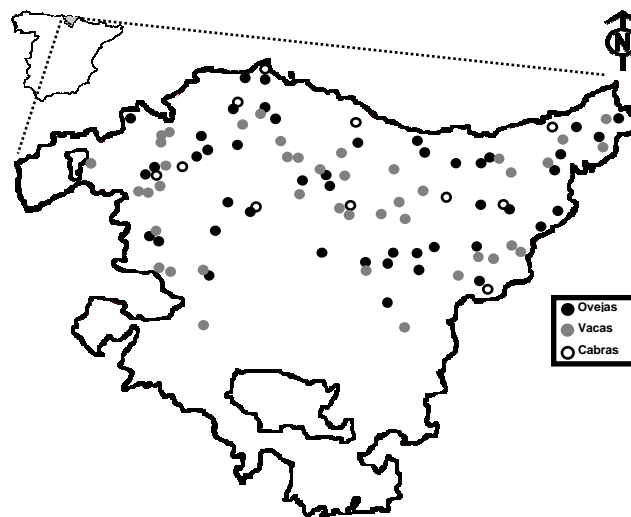


Figure IV. 1. Geographic distribution of the sampled herds in the study area.

Sampling approach

The survey was carried out from October 2007 to April 2008. Overall regional census was compiled for each ruminant species (data from the Basque Statistics Institute) and sample size was proportionally calculated according to the number of herds per county with a maximum

number of 2,000 animals from 100 herds. Individuals (females) older than one year were randomly selected within herds to a maximum of 30 sheep, 15 beef cattle and 10 goats per herd. Finally, 1,379 sheep, 626 beef cattle and 115 goats from 46, 42 and 11 herds, respectively, were surveyed (Figure IV.1). Whole blood extractions were carried out by the veterinary practitioner groups in charge of the Official Sanitary Campaigns in the Basque Country, directed and supervised by the local Animal Health and Welfare Authorities (Diputaciones Forales).

After individual collection of blood into tubes without anticoagulant, sera were obtained by centrifugation and stored at -20°C until serological analyses were performed. History of recent abortion (i.e., occurrence of abortions during the two previous breeding seasons) was obtained from a number of the surveyed herds by interviewing the farmers during sample collection.

Serological analyses

Sera were tested for the presence of anti-*C. burnetii* antibodies by means of an ELISA test (ELISA Cox kit, LSI-Laboratoire Service International, Lyon, France) according to manufacturer's instructions. Sensitivity of this ELISA test reaches 100% whereas specificity was determined to be of 95% (manufacturer's data). ELISA positive sera were retested for anti-*C. burnetii* antibodies by means of the Complement Fixation test (CFT) following standard procedures (OIE). *C. burnetii* antigen was provided by Dade Behring (Marburg, Germany) using Nine Mile and Henzerling strains produced on embryonated eggs. According to the standards of the OIE, samples with CFT titres $\leq 1/5$ were considered negative. Titres between 1/10 and 1/40 were representative for latent infection while titres $\geq 1/80$ revealed an evolutive phase of the infection (OIE).

Statistical analyses

For statistical analysis purposes, two age categories were established for each animal species (Table IV.1) in relation to the age at first parturition. Sheep and goats were classified in two groups, yearlings (1-2 years old) and adults (>2 years old), while beef cattle was classified as heifer (1-3 years old) or adult (>3 years old). Several animals younger than 1 year-old (73 sheep, 8 cattle and 6 goats) were sampled but were not considered for age-associated seroprevalence pattern analyses because of the smaller sample size.

ELISA anti-*C. burnetii* antibody prevalence was calculated at individual and at herd level for each ruminant species. Rogan-Gladen correction (RGC) according to the sensitivity and specificity of the ELISA test was used for population seroprevalence calculation (Rogan and

Gladen, 1978). A herd was considered positive when at least one animal showed antibodies by ELISA. Thus, differences on antibody prevalence (continuous) between ruminant species, age classes (categorical) and abortion history (categorical, reported/non-reported) were statistically assessed by means of Chi-square tests. Statistical uncertainty was assessed by calculating the 95% confidence interval for each of the proportions according to the expression $S.E._{95\%C.I.} = 1.96 [p(1 - p)/n]^{1/2}$ (Martin et al., 1987).

RESULTS

ELISA test showed an average *C. burnetii* seroprevalence of $11.8 \pm 2.0\%$ (RGC: $7.1 \pm 1.4\%$) in sheep, $8.7 \pm 5.9\%$ (RGC: $3.9 \pm 3.5\%$) in goats and $6.7 \pm 2.0\%$ (RGC: $1.8 \pm 1.0\%$) in beef cattle. Statistically significant differences were found between cattle and sheep seroprevalences ($X^2 = 11.7$, $p < 0.001$). The percentage of seropositive herds was 74% (34/46) for sheep, 43% (18/42) for cattle and 45% (5/11) for goats. Within-herd seroprevalence values ranged 0-80% for sheep, 0-53% for cattle and 0-30% for goats, with 21%, 14% and 27% of the herds, respectively, showing a *C. burnetii* seroprevalence $\geq 20\%$.

Eight out of 162 ($4.9 \pm 3.3\%$), 6 out of 42 ($14.3 \pm 10.6\%$) and 1 out of 10 ($10.0 \pm 18.6\%$) ELISA-positive sheep, cattle and goats, respectively, also reacted positive in the CFT giving titres $\geq 1/10$. CFT positive ewes belonged to 5 herds (5/46, 8.7%) and antibody titres did not exceed 1/20. In cattle, CFT positive animals belonged to 3 herds (3/42, 7.1%) and antibody titres did not exceed 1/40. Finally, only one goat reacting positive in ELISA also reacted in the CFT showing a titre of 1/10.

ELISA seroprevalence-age associated patterns differed between ruminant species (Table IV.1). While *C. burnetii* seroprevalence tended to increase from yearlings to adults in sheep and goats, seroprevalence values remained similar for heifer and adult cattle. Nonetheless, no statistically significant differences between age class seroprevalence values were found. In addition, anti-*C. burnetii* antibody prevalence did not differ statistically in relation to herd abortion history, neither in sheep ($9.1 \pm 3.9\%$ for flocks reporting abortion and $9.0 \pm 2.0\%$ for non-reporting flocks) nor in cattle ($10.7 \pm 7.8\%$ and $9.4 \pm 3.9\%$, respectively). Seven of the 23 interviewed sheep flock owners reported recent problems of abortion. Five of these flocks were positive for ELISA anti-*C. burnetii* antibodies, with seroprevalences ranging between 3.3% and 36.7%. Interestingly, CFT titres $\geq 1/10$ were detected in only one of those flocks. Meanwhile, 5 of 18 cattle herds reported abortion problems and showed seroprevalences between 0% and 20%, but none of the ELISA positive animals from those herds reporting abortion had significant CFT titres. Conversely, 6 of 13 cattle herds reporting no reproductive problems showed seroprevalences between 6.6% and 53.3% by ELISA, and in 2 of these herds

several animals showed titres $\geq 1/10$ against *Coxiella* by CFT. Recent abortion history could only be obtained from a small number of goat herds (n = 4) and consequently we did not consider them in the analysis.

Table IV. 1. Mean anti-*C. burnetii* antibody prevalence (Serop.) and its associated standard error (SE) throughout ruminant species-by-age class in the study region. The number of animals analyzed older than 1 yr. (N) and the number of positive animals (Pos) is shown.

	Age class	N	Pos	Serop. (%)	SE
Sheep	1-2 yr.	225	21	9.3	0.02
	Adult	1073	139	13	0.01
<i>Subtotal sheep</i>		<i>1298</i>	<i>160</i>	<i>12.3</i>	<i>0.01</i>
Beef cattle	1-2 yr.	97	6	6.2	0.02
	Adult	521	35	6.7	0.01
<i>Subtotal cattle</i>		<i>618</i>	<i>41</i>	<i>6.6</i>	<i>0.01</i>
Goats	1-2 yr.	40	1	2.5	0.03
	Adult	69	8	11.6	0.04
<i>Subtotal goats</i>		<i>109</i>	<i>9</i>	<i>8.3</i>	<i>0.03</i>

DISCUSSION

Q fever is considered a strongly endemic disease in humans in the Basque Country (Montes et al., 2006; Sanzo et al., 1991). Contact with domestic ruminants was considered one of the most relevant risk factors for *C. burnetii* infection. Moreover, *C. burnetii* was found to be widespread in sheep flocks (García-Pérez et al., 2009) and is known to be a relevant agent for ovine abortion (Oporto et al., 2006) that causes important economic losses to livestock producers. Nevertheless, very scarce information on the current status of this pathogen in other ruminant species, such as cattle or goats, was available for this region. As a first approach to improve knowledge on the current status of *C. burnetii* among livestock in the Basque Country, we studied the seroprevalence in beef cattle, sheep and goats, which are reared in semi-extensive conditions, while intensively managed species (dairy cattle) will be the subject of a future study.

Comparison of herein reported ELISA results with other epidemiological surveys has to be carefully considered due to the different serological techniques employed. While recent studies tend to use the indirect fluorescence assay (IFA) or ELISA, those carried out some decades ago used mainly CFT. Whereas IFA and ELISA tests on ruminant sera showed similar results, low agreement was observed between ELISA and CFT (Kováčová et al 1998; Rousset et al., 2007), which agrees with our observations in sheep (unpublished data). CFT has a good specificity but a low sensitivity (OIE); in fact, only 15 out of 214 ELISA positive animals gave CFT titres $\geq 1/10$. The highest sensitivity associated to the ELISA test together with the high

duration of detectable levels of circulating anti-*C. burnetii* antibodies were the reasons for using this technique for epidemiological purposes in the current study. Although ELISA test can fail to detect *C. burnetii* contact at an individual level (Rousset et al., 2007), it becomes very useful for studies at the population level like the one presented herein. On the other hand, molecular methods are highly sensitive tools for detecting *C. burnetii* infected animals. Nonetheless, the high variability of *C. burnetii* excretion by animals throughout the year limits the reliability of molecular methods for epidemiological purposes, especially if sampling takes place outside of the reproductive season.

The seroprevalence found in sheep was comparable to that reported in other Spanish regions where seroprevalence ranged between 1.7% and 18.8% (Pascual-Velasco, 1996) or in some Mediterranean regions, with values between 9% and 25% (Cetinkaya et al., 2000; Kennerman et al., 2010; Loukaides et al., 2006; Masala et al., 2004; Psaroulaki et al., 2006). These data highlight the risk of *C. burnetii* zoonosis associated to sheep in all the Mediterranean countries. Nevertheless, seroprevalence of cattle and goats in some of these countries suggest that these species would also represent a potential risk. In fact, cattle seropositivity ranged between 5.8% and 25% (Cetinkaya et al., 2000; Psaroulaki et al., 2006), and in goats between 13% and 51% (Loukaides et al., 2006; Masala et al., 2004; Psaroulaki et al., 2006). In Spain, the highest prevalences found in these species were 66.9% for cattle and 32.7% for goats in different production systems from central and southern Spain, respectively (Pascual-Velasco, 1996), and more recently, 35% of southern Spanish cattle in extensive production have been found to have contact with *C. burnetii* (Ruiz-Fons et al., 2008).

The lower seroprevalence observed in the present study in cattle and goats could be explained by the semi-extensive management conditions in which animals are moving during part of the year in large land surfaces thus reducing the contact between animals. Therefore, the different prevalences of *C. burnetii* in livestock suggest that local productive system and management factors might influence the life cycle of *C. burnetii*. Moreover, wildlife could play a relevant role as reservoir for livestock (Ruiz-Fons et al., 2008), especially where extensive productive systems are predominant, which increases the risk of wildlife/livestock contact. The significantly higher seroprevalence observed in sheep with regard to beef cattle could not be explained by differences in the sampling dates in relation to the lambing/calving season. Both beef cattle and sheep were surveyed coinciding with the end of the gestation period, when the excretion of *C. burnetii* by infected animals is higher because of parturition (Woldehiwet et al., 2004). Interestingly, when CFT was analysed in ELISA positive animals, beef cattle had a higher percentage of reactors (14.3%) compared to sheep (4.9%) indicating a higher number of latent infections in cattle than in sheep. Nevertheless, the small size of the sample and the

concentration of CFT-positive animals in a reduced number of herds make it difficult to reach a definitive explanation. Other management factors, like closer contact among ewes during milking, which implies overnight housing, could be the reason for a higher overall ELISA seroprevalence in sheep than in cattle.

Age-related *C. burnetii* serological patterns have been seldom reported in the scientific literature in regard to domestic ruminants (García-Pérez et al., 2009; Psaroulaki et al., 2006). Pathogen contact rate tends to increase with age simply as a consequence of a higher probability of contact with life span, a feature that herein was observed for sheep and goats.

Long-time contact with *C. burnetii* in the surveyed herds together with the random selection of sampled animals could explain the lack of association found between herd seroprevalence and abortion reports. Different results have been reported in this regard, with significant associations between seroprevalence and abortion reported for cattle and sheep in several studies (Cabassi et al., 2006; Cetinkaya et al., 2000), whereas in other reports infection with *C. burnetii* in cattle did not result in abortion, suggesting that infection sometimes can pass unnoticed (Paiba et al., 1999b). In the current study, in 6 cattle herds without reproductive problems within-herd seroprevalence by ELISA ranged between 6.6 and 53% and in 2 of these herds several animals had CFT titers $\geq 1/10$ indicating a recent contact with *C. burnetii*. Although several farmers did not report abortion or reproductive problems, high seroprevalences can be associated with the presence of *C. burnetii* in the herd. Similarly, Astobiza et al. (2010) found a high within-flock seroprevalence (54%) and a high percentage of *C. burnetii* shedders at lambing (55-79%) in a sheep flock with a low rate of abortion (3.4%). These observations indicate that there are several epidemiological and clinical aspects of *C. burnetii* infection that need to be elucidated and require further investigation.

CONCLUSIONS

The results reported herein showed that sheep had the highest contact rate with *C. burnetii* in the region, but also that cattle and goats should not be neglected as part of the domestic cycle of *C. burnetii*. Based on our observations, we can conclude that measures are to be implemented for the control of *C. burnetii* and Q fever in the study region along the line of those currently in operation in other European countries. Moreover, further epidemiological research on herd, local and regional factors influencing *C. burnetii* life cycle is needed in order to establish more efficient control measures that prevent spread of the infection and its associated effects on livestock and humans. At present, a control programme based on vaccination using a Phase I vaccine is in progress and its efficacy will be assessed in the near future.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the collaboration of farmers from the different Breed Farmers Associations. This work was supported by funding from INIA (FAU2006-00002-C04-01), FEDER, and the Department of Agriculture, Fisheries and Food of the Basque Government. F. Ruiz-Fons is supported by a research contract from the 'Instituto de Salud Carlos III' of the Spanish Ministry for Health.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

FR was responsible for data collection and statistical analysis, and wrote the manuscript; JFB, JA and RA helped in the samplings and performed the serological tests; AH assisted with the interpretation and discussion of results and correcting the manuscript; RAJ advised on statistical analysis and critically revised the manuscript. ALG is head of the project and had primary responsibility for the investigations reported here. All authors revised the manuscript and approved it in its final version.

Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area

Astobiza, I., Barral, M., Ruiz-Fons, F., Barandika, J.F., Gerrikagoitia, X., Hurtado, A.,
García-Pérez, A.L.,
Veterinary Microbiology 2011; 147: 190-194.

ABSTRACT

At present few studies have been carried out on the distribution and incidence of *Coxiella burnetii* infection in wildlife. Therefore, the aim of this study was to investigate the distribution of *C. burnetii* in the main wild species in the Basque Country (Northern Spain), such as carnivores, cervids, wild boar, lagomorphs and several species of birds. Tissues from a total of 601 animals and 340 adult ticks collected from them were analyzed by PCR. DNA of *C. burnetii* was detected in 5.1% of roe deer (*Capreolus capreolus*), 4.3% of wild boar (*Sus scrofa*), 9.1% of European hare (*Lepus europaeus*), and among wild birds, in 11% of vultures (*Gyps fulvus*) and 14% of black kites (*Milvus migrans*). These results showed that *C. burnetii* circulates in wildlife in Spain participating in the cycle of Q fever in nature. All of the adult ticks analyzed were negative for *C. burnetii*, suggesting that ticks do not play an important role in the transmission of *C. burnetii* in this area.

Keywords: *Coxiella burnetii*, wildlife, ticks, PCR

INTRODUCTION

Q fever is a ubiquitous zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular organism widely distributed in nature. Domestic ruminants represent the most frequent source of human *C. burnetii* infection but reservoir species can also be found among wildlife and arthropods like ticks (Ejercito et al., 1993; Maurin and Raoult, 1999; Ruiz-Fons et al., 2008; Spitalska and Kocianova, 2003; To et al., 1998b).

At present very few studies have been carried out on the distribution and incidence of *C. burnetii* infection in wildlife, so the threat that infected wild animals pose to humans and domestic animals is uncertain. In our area (Northern Spain) recent studies showed a high seroprevalence of *Coxiella* in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems (Ruiz-Fons et al., 2010) in agreement with the high prevalence of human Q fever cases reported in this region (Maurin and Raoult, 1999; Montes et al., 2006). However, studies on local wildlife are limited to a recent survey that demonstrated the presence of *C. burnetii* DNA in wild and domestic small mammals (Barandika et al., 2007). On the other hand, *C. burnetii* DNA was only sporadically detected in ticks collected from vegetation (Barandika et al., 2008). Therefore, the aims of this study were to investigate by means of polymerase chain reaction (PCR) the presence of *C. burnetii* in the main wild species in Northern Spain and to study and analyze the main tick species parasitizing wildlife with the purpose of assessing the importance of wildlife and ticks in maintaining the cycle of Q fever in nature.

MATERIAL AND METHODS

Study site

Samples were collected from 243 sites located in the Basque Country or neighbouring regions (9 sites). The region has a wide and abundant wildlife fauna mainly composed by ungulates (Iberian red deer *Cervus elaphus hispanicus*, roe deer *Capreolus capreolus* and European wild boar *Sus scrofa*), wild carnivores (mainly badger *Meles meles* and red fox *Vulpes vulpes*), different small mammal species and a wide variety of birds both resident and migrant. Lagomorphs (European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* and European brown hare *Lepus europaeus*) are scarcely present and they mainly restrict their home range to areas of continental influence in the region (Palomo and Gisbert, 2002). Climate and host abundance do also allow for high burdens of ticks in the environment (Barandika et al., 2008).

Wildlife sampling

Sample collection was conducted from January 2001 to April 2006 in the frame of a larger study on the sanitary status of wild fauna in the Basque Country. Game species were sampled during the hunting season: red deer and wild boar from October to February, and roe deer in spring and summer. Foxes were hunted mostly in winter (65%). The remaining wild species were collected throughout the year after being found dead (Table IV.2). The different groups of Families sampled were homogeneously represented along the years. A complete necropsy was performed in the laboratory except in the case of red deer and wild boar, which were examined and sampled outdoors. Tissue samples (spleen and/or lung) were stored at -20°C before being processed for PCR analysis. Geographic coordinates of sampling sites were recorded in order to localize possible foci of *C. burnetii* infection. A detailed description of the number of animals surveyed and analyzed in each group of Families is provided in Table IV.2. A total of 23 Families of wild birds were investigated, with 1 to 47 individuals analyzed within each Family (Table IV.2).

Tick survey

Whenever possible, animals were subjected to a detailed external examination for tick collection. However, due to field constraints, not all the hunted animals sampled could be examined for ticks (e.g. red deer and wild boar). Ticks attached were removed, counted and identified using specific taxonomic keys (Manila, 1998). After identification ticks were stored at -20° prior to DNA extraction. The number of animals examined for ticks in each animal species is shown in Table IV.3.

Table IV. 2. Number of animals investigated, including the number of animals hunted vs. those found dead, and *C. burnetii* PCR results with a detailed description of the positive species.

Linage	Family	No. Analyzed animals (No. hunted / No. found dead)	No. PCR positive(%)	Positive species (%, Positive/ Analyzed)
Carnivora	Canidae	63 (38/25)	0	
	Felidae	6 (0/6)	0	
	Mustelidae	125 (0/125)	0	
	Viverridae	12 (0/12)	0	
	Total	206 (38/168)	0 (0.0)	
Lagomorpha	Leporidae	28 (0/28)	2 (7.1)	<i>Lepus europaeus</i> (9.1%, 2/22)
	Total	28 (0/28)	2 (7.1)	
Ungulata	Cervidae	106 (49/57)	4 (3.8)	<i>Capreolus capreolus</i> (5.1%, 4/78)
	Suidae	93 (87/6)	4 (4.3)	<i>Sus scrofa</i> (4.3%, 4/93)
	Total	199 (136/63)	8 (4.0)	
Birds	Accipitridae	47 (0/47)	2 (4.3)	<i>Milvus migrans</i> (14.3%, 1/7) <i>Gyps fulvus</i> (11.0%, 1/9)
	Other Families(22) ^a	121 (1/120)	0	
	Total	168 (1/167)	2 (1.2)	
TOTAL		601 (175/426)	12 (2.0)	

^a Alcidae (n=3), Anatidae (n=3), Ardeidae (n=12), Burhinidae (n=1), Charadriidae (n=5), Charadriiformes (n=11), Ciconiidae (n=5), Corvidae (n=6), Falconidae (n=15), Laridae (n=1), Phalacrocoracidae (n=2), Phasianidae (n=5), Ploceidae (n=1), Podicipedidae (n=1), Procellariidae (n=3), Rallidae (n=3), Strigidae (n=14), Sturnidae (n=4), Sulidae (n=1), Sylviidae (n=1), Turdidae (n=1) and Tytonidae (n=23).

DNA extraction and IS1111 PCR

DNA extraction was individually performed from spleen and/or lung tissues of animals and from adult ticks using BioSprint 96 DNA kit (Qiagen) with a previous treatment with proteinase K for 3h. Negative extraction controls were included every 10 samples. PCR was performed according to previously published protocols (Berri et al., 2000) using primers targeting a transposon-like repetitive region of *C. burnetii*.

Data analysis

Statistical uncertainty was assessed by calculating the 95% confidence interval for each of the proportions (p) according to the expression $S.E._{95\%C.I.} = 1.96[p(1 - p) / n]^{1/2}$.

RESULTS

C. burnetii DNA in wildlife tissues

A total of 601 animals were analyzed by PCR (Table IV.2). *C. burnetii* DNA was detected in roe deer ($5.1 \pm 4.9\%$), wild boar ($4.3 \pm 4.1\%$), European hares ($9.1 \pm 12.0\%$) and birds ($1.2 \pm 1.6\%$). Although a representative number of wild birds were studied, each family was represented by a limited number of specimens (Table IV.2), and the two positive

specimens belonged to the Family Accipitridae [*i.e.* a vulture (*Gyps fulvus*, 11 ± 20.4%) and a black kite (*Milvus migrans*, 14.3 ± 25.9%)].

All the analyzed red deer were PCR negative, but this is an uncommon species in the study region and therefore the number of animals analyzed was low (n=22). All the carnivores examined were also negative despite the representative number of badgers (n=74), red foxes (n=61) and stone martens (n=25) analyzed. Other carnivore species analysed (5 weasel, 6 wild cat, 12 genet, 2 wolf, 12 pine martens, 1 otter, 5 polecat and 3 American mink) were also negative.

Most of the positive animals were hunted or found dead in the same year and in nearby locations. Positive wild boars were female and hunted in neighbouring areas after the mating season (November 2001). One of the positive hares was found 21 km away from where wild boars were hunted and it was also captured in the same month (November 2001) after being run over. The second positive hare was found dead and necropsy evidenced pneumonia by *Mannheimia haemolytica*. In addition, the positive vulture was found dead 25 km away from the same area (August 2001), being caquetic and with lesions indicative of bacterial pneumonia. The positive black kite was found dead (April 2001) 39 km away in the same province and presented cranial traumatism. Regarding positive roe deer (all males), one specimen was hunted in February 2003, and three were found dead or moribund between May and August 2004. Two of these positive roe deer were located 13 and 36 km far away from where the positive wild boars appeared 3 years before. Necropsies revealed that animals were run over (2 roe deer), or attacked by predators (1 roe deer). No compatible lesions with infectious disease were observed.

Ticks and *C. burnetii*

A total of 1,303 ticks (adults, nymphs and larvae) were removed. Of these, 897 were collected from cervids, 379 from carnivores, 17 from wild boar, 7 from lagomorphs and 3 ticks from wild birds (Table IV.3). Foxes (49%), badgers (47%), red deer (36%) and roe deer (35%) were the most parasitized species, the exception being American mink (*Mustela vison*) and a song thrush (*Turdus philomelos*). However, only one specimen from each of these two species was examined for ticks (Table IV.3). Considering together all tick stages (larval, nymphal and adults) *Ixodes ricinus* was the most prevalent species in cervids (86.5%, 776/897) and in lagomorphs (85.7%, 6/7), *Dermacentor marginatus* (35.3%, 6/17) and *Dermacentor reticulatus* (29.4%, 5/17) in wild boar, and *Ixodes hexagonus* in carnivores

Table IV. 3. Animals parasitized by ticks, number of ticks collected in each animal species, and adult ticks identified and analyzed by PCR.

Host species	No. animals parasitized/ total examined (%)	Total no. ticks ^a	No. adult ticks ^b	No. adult ticks analyzed
Carnivora				
Stone marten	5/25 (20)	42	3 I.h.	3
Wild cat	1/6 (17)	3	--	0
Genet	3/12 (25)	20	1 I.h.	1
Weasel	1/5 (20)	2	1 I.h.	1
Pine marten	1/12 (8)	1	1 I.r.	0
Badger	35/74 (47)	127	19 I.r.; 23 I.h.; 18 I.c.; 3 D.r.; 14 R.p	50
American mink	3/3 (100)	26	3 I.h.	3
Fox	30/61 (49)	158	18 I.r.; 7 I.h.; 6 I.c.; 2 H.p.; 28 D.r.; 2 H.c.	49
Lagomorpha				
European rabbit	1/6 (17)	2	--	0
European hare	3/22 (14)	5	1 I.r.	0
Ungulata				
Red deer	8/22 (36)	147	40 I.r.; 1 H.p.; 24 H.i.; 7 D.r.; 2 D.m.	68
Roe deer	22/63 (35)	750	404 I.r.; 6 H.p.; 4 H.i.; 1 R. s.	155
Wild boar	7/39 (18)	17	5 D.r.; 6 D.m.; 2R.b.	10
Birds				
Carrion crow	1/4 (25)	1	--	0
Song thrush	1/1 (100)	2	2 I.f.	0

^a Include larvae, nymphs and adults

^b I.r.= *I. ricinus*; I.h.= *I. hexagonus*; I.c.= *I. canisuga*; I.f.= *I. frontalis*; H.p.= *H. punctata*; H.i.= *H. inermis*; D.r.= *D. reticulatus*; D.m.= *D. marginatus*; R.b.= *R. bursa*; R.s.= *R. sanguineus*; R.p.=*R. pusillus*; H.c.=*H. concinna*

(43.8%, 165/377). Wild bird species had a low number ticks, only one *Haemaphysalis punctata* nymph and 2 *Ixodes frontalis* females were found. None of the 340 adult ticks analyzed harboured DNA of *C. burnetii*. No ticks were found in the *C. burnetii* DNA positive animals.

DISCUSSION

Several studies have reported serological evidence of contact with *C. burnetii* in wild species and suggested their involvement in the wild cycle of *C. burnetii* in nature around the world (Ejercito et al., 1993; Enright et al., 1971a; Gardon et al., 2001; Giovannini et al., 1988) and in Spain (Pascual-Velasco, 1996). More recently, with the incorporation of PCR techniques, wild small mammals (Barandika et al., 2007) and red deer (Ruiz-Fons et al., 2008) had been identified as potential reservoirs of Q fever in this part of Europe. Although serological testing would have perhaps revealed immunological traces of infection because of the expected long persistence of detectable circulating antibodies, appropriate reagents and sera positive controls from such a diversity of species as that included in this study are not easily available. Hence, PCR came as the most suitable technique for this survey and allowed us to identify hares, several wild birds, roe deer and wild boar as additional potential infection sources of *C. burnetii* in Northern Spain.

The positive wild boars were females from neighbouring areas and hunted after the mating season. Infection between animals could be favoured by the gregarious habits of wild boar, which live in close small groups. Among cervids, only roe deer harboured DNA of *C. burnetii* and all the positive animals were males sampled between May and August, around the farrowing season (May-June). In this case, placentas from infected females could have been the source of infection. In fact, placenta is the tissue with the highest bacterial burden (Maurin and Raoult, 1999). However, bacterial excretion routes have only been studied in domestic livestock (Rodolakis et al., 2007) and little is known about infection transmission in wild animals.

On the other hand, none of the carnivores analyzed harboured DNA of *C. burnetii*. In California, seroprevalence in foxes was high (55%) (Enright et al., 1971a) and this finding was related to the exposure of these animals to *C. burnetii* while eating infected sheep or other wild animals. In the present study, since 65% of the foxes were collected in winter months, when parturition occurs and livestock is indoors, contact between foxes and domestic ruminants was unlikely. In winter months badgers decrease their activity and spend most of the time in their setts with minimal interaction with other animals. This could explain the negative findings in the badgers sampled in winter. However, some positive results would

have been expected among the badgers sampled during livestock pasture grazing season. According to the findings reported herein carnivores do not seem to play an important role in the cycle of *C. burnetii* in this area.

In the current study, prevalence of positive European hares was high (9.1%). Lagomorphs feed on grass in the fields in summer, when semi-extensive livestock have access to communal mountain pastures. Pastures contaminated with faeces of *C. burnetii* positive livestock could become a source for the infection of hares (Ejercito et al., 1993). This hypothesis is supported by the high seroprevalence found in domestic ruminants in the Basque Country (Ruiz-Fons et al., 2010). Furthermore, associations between feeding on livestock pastures and high levels of antibodies against *C. burnetii* have been observed in several species such as deer, coyote, gray fox, rabbit and skunk (Enright et al., 1971a).

Among birds, high prevalences of *C. burnetii* were reported in species living or feeding in close proximity to infected livestock (Enright et al., 1971b). Thus, carrion species that are often pecking and scraping animal waste or decaying flesh of animal carcasses seem much more likely to be exposed to *C. burnetii* than most other species, in agreement with the positivity observed in this study in vultures and black kites and in other countries (Enright et al., 1971b; To et al., 1998b). Whereas black kite is a migratory bird, vulture can also cover hundreds of kilometres, so both species have the potential of becoming infected and transporting the organism over wide areas. These species could act as sentinel for the presence of infection foci in an area. Surprisingly, most of the *C. burnetii* DNA positive animals were hunted or found dead within close distances (13-36 km), suggesting that Q fever could appear focalized affecting different animal species.

Ticks have been considered a reservoir and vector of *C. burnetii*, but none of the analyzed ticks harboured DNA of *C. burnetii*, which is in agreement with the low infection rate observed in questing ticks collected from vegetation in the region (Barandika et al., 2008). In contrast, some studies carried out in Central Spain identified *C. burnetii* in 3.4% of ticks collected from animals and in 7.7% of questing ticks (Toledo et al., 2009a) belonging to species which are scarce or absent in the Basque Country (Barandika et al., 2008). Hence, our findings suggest that ticks do not seem to play an important role in the transmission cycle of *C. burnetii* in this area. On the other hand, this study adds new information on the tick species parasitizing the most common wildlife species from Northern Spain, including several endophilic ticks not previously reported in this area.

In conclusion, this study identified several wildlife species (roe deer, wild boar, hares and some carrion birds) as potential sources for *C. burnetii* infection in Northern Spain. These species are abundant in the area and may represent a risk for domestic livestock that share mountain areas and for hunters that manipulate their preys. Continuous surveillance programs in wild and domestic animals are necessary to identify risk areas, and to monitor risk of zoonotic infection for humans. Moreover, further studies are needed to characterize the genotypes of the strains found in wildlife and to assess the routes of *C. burnetii* shedding in wild animals to better categorize potential transmission risks, as it has been done in domestic animals.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no competing interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funding from INIA, FAU2006-00002-C04-01, MEC AG/2001-3947-C02-02, and FEDER. Ianire Astobiza is the recipient of a predoctoral fellowship of the Department of Agriculture, Fisheries and Food of the Basque Government. Francisco Ruiz-Fons is supported by the 'Instituto de Salud Carlos III' of the Spanish Ministry of Health. We thank Inés Povedano for laboratory assistance.

Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline

Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L.,

The Veterinary Journal 2010; 184, 2: 172–175.

ABSTRACT

The kinetics of *Coxiella burnetii* excretion were studied in dairy sheep using a flock that had a with previous history of abortion and a positive polymerase chain reaction (PCR) test for *C. burnetii* in milk from the bulk tank. An ELISA used to test sera antibodies revealed a high within-flock seroprevalence (54%). Fifty individual milk samples analysed by PCR showed a high number of milk shedders in the flock (38%). In the following breeding cycle, 75% of the animals in the flock were double treated with oxytetracycline (OTC) at days +100 and +120 of gestation, while the remaining 25% of the animals were kept as untreated controls. The percentage of shedders at lambing was similar between groups. Of the treated ewes, 82% shed the bacteria in their vaginal fluids vs. 72% of the untreated ewes. Shedding was also high in faeces (61% of treated vs. 77% of untreated ewes) and milk (57% of treated vs. 50% of untreated ewes). At 2 and 6 weeks later, treated animals continued shedding the bacteria, and there were no significant differences in the number of shedders between treated and control groups. Moreover, the bacteria were excreted in faeces for 5 months after parturition, for 3 months in vaginal discharges and for 4 months in milk, which suggested that OTC treatment neither prevented the shedding of bacteria, nor limited the duration of bacterial excretion.

INTRODUCTION

Q fever is a ubiquitous zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, an obligate intracellular bacterium that affects pets, birds, domestic and wild animals, arthropods and humans (Maurin and Raoult, 1999). Q fever provokes abortion and stillbirths in sheep and goats, whereas in cattle metritis and infertility are more frequent (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; To et al., 1998a). In humans, infection can be asymptomatic but in acute disease it may also present with fever, pneumonia or hepatitis. If the infection persists, it can become a chronic disease with more severe clinical signs (Maurin and Raoult, 1999).

The source of *C. burnetii* infection is often unknown, although cattle, sheep and goats are the most common reservoirs. The main route of infection is inhalation of contaminated aerosols or dust containing *C. burnetii* shed by infected animals, mainly at parturition when infected females shed great numbers of bacteria through birth products. Moreover, after lambing these animals shed *C. burnetii* in urine, faeces and milk during several months (Arricau-Bouvery et al., 2003b; Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a; Guatteo et al., 2006; Guatteo et al., 2007a; Rodolakis et al., 2007), and aerosols generated from contaminated environments could explain some outbreaks of human Q fever (Berri et al., 2003; Tissot-Dupont et al., 1999;). To identify animal shedders, biological samples, such as vaginal

swabs, faeces and milk can be tested by polymerase chain reaction (PCR) (Berri et al., 2000).

C. burnetii can survive in the environment for long periods (Maurin and Raoult, 1999), and so control of this zoonosis is a challenge for veterinary and public health authorities. The best option to prevent the disease is vaccination, which reduces shedding of *C. burnetii* (Arricau-Bouvery et al., 2005), thereby decreasing environmental contamination and, consequently, the risk of human infection. Unfortunately, no vaccines are commercially available in Spain, and antibiotics are used to treat coxiellosis. Oxytetracycline (OTC) has been used in sheep (Berri et al., 2002; Berri et al., 2005a), although efficacy is uncertain. The aim of the current study was to assess the effects of a double treatment of OTC on shedding of *C. burnetii* in vaginal fluids, milk and faeces of infected dairy sheep from parturition until the end of the milking period.

MATERIALS AND METHODS

Study flock

The flock used in this study was of Latxa breed, a dairy sheep breed that represents 90% of the flocks in the Basque region of Northern Spain. Latxa sheep lamb once a year with two periods of lambing: November - February for ewes at their second lambing and older, and March-April for first lactation replacement ewe-lambs. Many Latxa flocks use communal mountain pastures in summer and remain housed for the rest of the year, coinciding with the parturition and lactation period, which lasts 4-5 months.

The study flock ($n = 494$) grazed in communal pastures between July and November. Flocks grazing in the same mountain area had previous history of abortions and Border disease, and enzootic abortion and Q fever had been diagnosed in the past. In the lambing season of 2006 this flock had seropositive ewes (7/30, 23.3%) and further confirmation of *C. burnetii* excretion was obtained in 2007 by PCR analysis of a bulk-tank milk (BTM) sample. Individual milk samples were taken from 50 lactating ewes shortly afterwards (Table IV.4), and 38% (19/50) were positive by PCR. In addition, the whole flock was sampled and analysed for the presence of antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test (ELISA Cox kit, LSI) according to the manufacturer's instructions. A high seroprevalence (54%) was observed, particularly among replacement ewes (≥ 6 months, 97% seropositive animals), indicating a recent contact with *C. burnetii*. The seroprevalence of Border disease was also investigated, and 87.8% of animals were seropositive though persistently infected animals were not detected by antigen ELISA test.

Study design and sampling approach

After confirmation of *C. burnetii* infection in the flock, a treatment with OTC was planned and commenced once animal welfare approval for the study was obtained from local authorities. Initially, the total census of the flock and corresponding birth dates were obtained from the Latxa Breed Association and the ewes were listed in ascending order according to birth date. Then, every fourth ewe was selected for the untreated group, with the remaining animals assigned to the treated group. A double treatment with with 20 mg/kg of OTC (Tenalina LA, CEVA Santé Animale) was then administered to the 75% of the ewes ($n=289$) in the treated group at the end of the gestational period, while the untreated group ($n=96$) did not receive any antibiotic. The first dose was given in September 2007, at around day 100 of gestation, and the second dose was given two weeks later (Table IV.4). The entire flock was grazing on mountain pastures during the antibiotic treatment and was then housed in lowland facilities a week before lambing. The farmer had reported a total of 13 aborted ewes by the time of the first dose with antibiotic and annotated the ear tags of aborted ewes after the treatments.

Once lambing started, vaginal swabs, milk and faecal samples were periodically taken from lactating ewes to evaluate bacterial shedding (Table IV.4). Fifty ewes were sampled during the first visit, and 60 during the second. Animals sampled during these first two visits accounted for 86 different ewes (26 control and 60 treated) which were marked with a green colour on their back to facilitate identification in further visits. From the third visit onwards, 50-52 ewes were chosen at random among this marked group. Sampled ewes therefore varied from one sampling to another, but most of them (66/86, 77%) were sampled between 3 and 6 times; seven ewes were sampled once and three twice. The proportion of treated (70-75%) and untreated (25-30%) ewes sampled was maintained throughout the study.

All the replacement ewe-lambs ($n = 109$) were double treated with OTC at the convenient periods (see above), but these animals were not monitored for bacterial shedding.

DNA extraction and PCR

Vaginal swabs, milk and faecal samples were treated for DNA extraction as previously described (Guatteo et al. 2007a; Rodolakis et al. 2007). Briefly, vaginal swabs were treated with TE buffer (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), mixed with ATL (QIAmp DNA blood kit, Qiagen) and digested with proteinase K (8 mg/mL) for 30 min at 70 °C. Each sample of milk (200 µL) was mixed directly with ATL and proteinase K and incubated for 3 h

at 56 °C. Faecal samples (1 g) were mixed with 4 mL of TE, vortexed for 30 s, centrifuged at 3,000 g for 2 min, and then 200 µL of the supernatant were treated with proteinase K and ATL buffer for 30 min at 70 °C. Extraction process was continued using QIAmp DNA blood kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Negative controls were included every 10 samples to check for possible DNA contamination.

PCR amplification was performed using primers targeting a transposon-like repetitive region of *C. burnetii*, as described elsewhere (Berri et al., 2000; Willems et al., 1994).

Table IV. 4. Chronogram of treatments and samplings done in the study flock.

Date	Task
03 May 2007	PCR analysis of bulk-tank milk: positive
24 May 2007	Analysis of individual milk samples by PCR (50ewes)
30 May 2007	Serology (ELISA, whole flock)
14 June 2007	Artificial Insemination (AI)
27 September 2007	1st oxytetracycline injection (day 100 gestation)
16 October 2007	2nd oxytetracycline injection (day 120 gestation)
November 2007	Lambing
19 November 2007	50 ewes sampled: vaginal swabs, milk, faeces
04 December 2007	60 ewes sampled: vaginal swabs, milk, faeces
20 December 2007	52 ewes sampled: vaginal swabs, milk, faeces
28 January 2008	50 ewes sampled: vaginal swabs, milk, faeces
28 February 2008	50 ewes sampled: milk, faeces
08 April 2008	50 ewes sampled: milk, faeces

Statistical analysis

In order to study the kinetics of *C. burnetii* shedding, lambing dates were compiled to calculate the data every 2 weeks between lambing and sampling and PCR results were grouped according to these time-intervals. Percentages of *C. burnetii* shedders in each treatment group were compared to evaluate effects of the antibiotic treatment. Chi-squared test was used and *P* values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Shedding of *C. burnetii* after treatment

A total of 308 milk, 308 faecal samples and 210 vaginal swabs from 86 ewes (60 treated and 26 controls) were investigated. Higher PCR positivity was found in vaginal swabs (126/210, 60.0%) and faeces (164/308, 53.2%) than in milk (67/308, 21.8%). Statistical

analysis did not show significant differences in the percentage of shedders between treated and control groups for any of the three routes of excretion. In the treated group, 63.8% of vaginal swabs (95/149), 52.6% of faeces (111/211) and 22.8% of milk samples (48/211) were PCR positive. Similar results were obtained in the control group, which showed 50.8% of vaginal swabs (31/61), 54.6% of faeces (53/97) and 19.6% of milk samples (19/97) to be PCR positive. In the first month after lambing, *C. burnetii* was shed by the three routes, but virtually disappeared from milk soon afterwards (Figure IV.2). All animals were positive in at least one sampling and at least in 1/3 shedding routes.

After the first dose of OTC, the farmer expressed an opinion that the number of abortions had reduced. After the second dose, four 1-year old treated ewes aborted, but, unfortunately, *C. burnetii* could only be investigated in one ewe which was PCR positive. Over the whole season a total of 17 ewes aborted (four abortions after the second dose compared to 13 before treatment), representing a rate of abortion of 3.4% (17/494).

Excretion of *C. burnetii* in vaginal discharges

The kinetics of *C. burnetii* DNA detection in vaginal swabs was monitored from lambing until day +90 of lactation (Figure IV.2a). In general, the treated group had a higher percentage of shedders during the study period, with the exception of day 60 of lactation, when the control group had a slight increase compared to the treated group (Figure IV.2a). No significant differences were found between groups in each time interval. PCR results on a selection of eight treated and five control ewes, which were sampled on at least four occasions, showed persistent *C. burnetii* excretion by vaginal route in three ewes, whereas in the remaining 10 excretion was intermittent (Table IV.5).

Excretion of *C. burnetii* in milk

The percentage of milk shedders after parturition was 57.1% in treated ewes and 50.0% in the control group. From day 30 onwards, the number of animals excreting *C. burnetii* decreased, and by day 90 most of the animals examined were negative (Figure IV.2b). The longest period of *C. burnetii* shedding in milk was 109 days in the treated group and 79 days in the control group. Comparing individual PCR results (Table IV.5), 10 ewes were PCR-positive in milk 15 or 30 days after lambing, and all but two remained negative afterwards. One was only positive on day 90 and two ewes (one treated and another untreated) were always negative in milk.

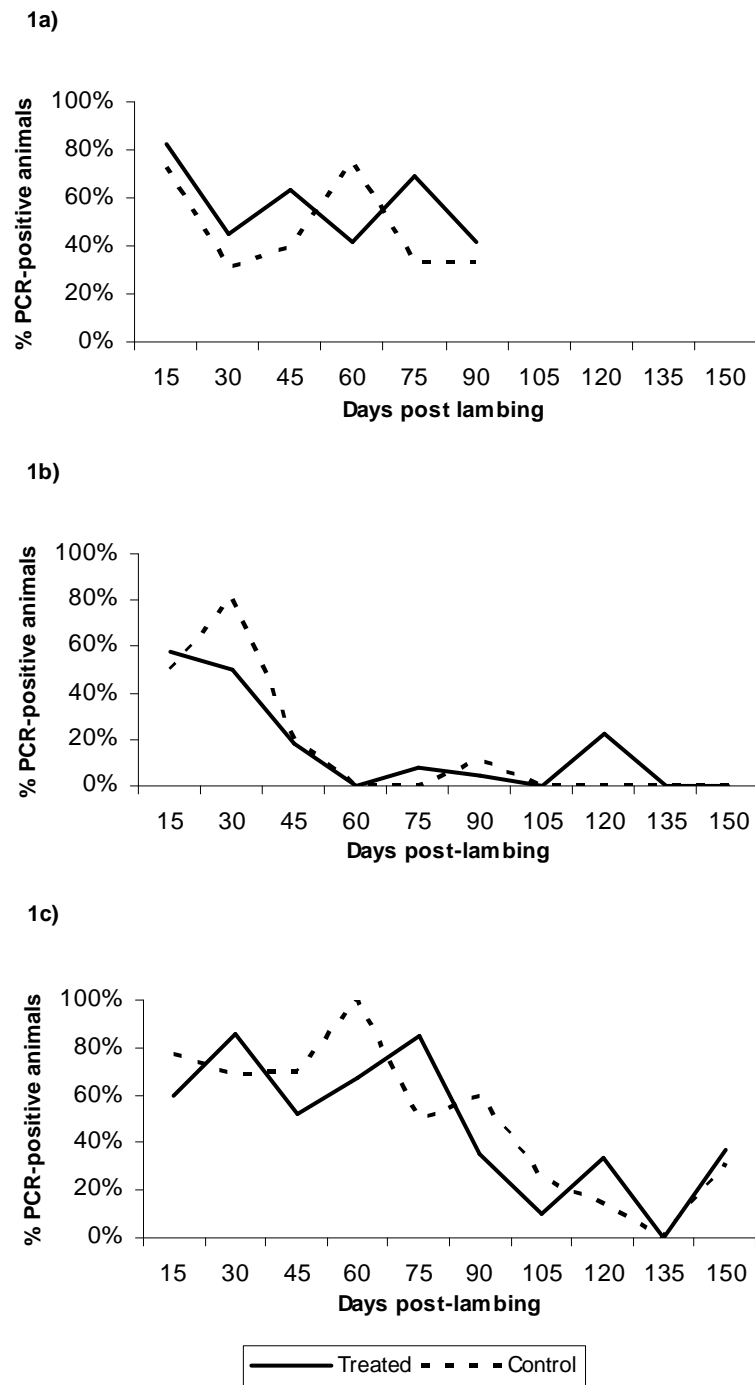


Figure IV. 2. Kinetics of the shedding of *C. burnetii* after parturition by different routes: (1a) vaginal swabs, (1b) milk, (1c) faeces.

Excretion of *C. burnetii* in faeces

After lambing, the percentage of ewes shedding *C. burnetii* in faeces was high, with PCR positive results in 60.7% and 77.3% of the treated and control animals, respectively (Figure IV.2c). Shedding of *C. burnetii* was still high in both groups at day 90 after parturition, but a marked decrease in bacteria shedding was observed at day 105. However, 4 months after lambing (day 120), 33% of treated animals and 14% of control animals still showed

PCR positive results (Figure IV.2c), which corresponded to the maximum duration of bacterial excretion in treated and control animals (148 and 149 days, respectively). The kinetics of *C. burnetii* excretion in faeces in individual animals was more constant than in milk samples (Table IV.5), with two or more sampling intervals positive in most of the ewes (Table IV.5).

DISCUSSION

The present study assessed the efficacy of a double treatment with OTC to control *C. burnetii* infection in a naturally infected dairy sheep flock. Vaccines against Q fever are not currently commercially available in Spain and antibiotic treatment was the only option to try to reduce the number of abortions due to *C. burnetii* and control bacterial shedding at parturition. Although a recent study in a small group of 34 ewes reported low efficacy of OTC in preventing abortion and reducing *C. burnetii* shedding (Berri et al., 2005a), the authors suggested a possible long term effect of OTC in preventing further spread of the infection.

In the current study, treatment and dosage followed recommendations for control of chlamydial abortion (Rodolakis et al., 1980). To our knowledge, this is the first report in which the efficacy of OTC in reducing the duration of *C. burnetii* shedding has been evaluated by PCR analysis of vaginal swabs, milk samples and faeces in a substantial number of ewes over a prolonged period of time following lambing (150 days). The results showed that OTC did not either prevent the shedding of bacteria or limit the duration of bacterial excretion. However, the farmer considered that the number of abortions decreased after the first dose of antibiotic (four abortions compared to 13 before treatment), despite the fact that *C. burnetii* could be detected by PCR after the second treatment in vaginal swabs from a 1-year old aborted ewe. Placentae or fetuses from other aborted ewes could not be analysed to exclude other abortifacient agents so *C. burnetii* could not be confirmed as the cause of the abortions.

Two years prior to this study, 23% of the animals in the flock were seropositive and this had risen to 54% just before treatment suggesting that infection had spread over time. However, most of the ewes in the flock lambed normally, including the 86 ewes examined by PCR. All the ewes were PCR positive at least once, mainly in vaginal discharges and faeces and, to a lesser extent, in milk. This suggested that after a Q fever outbreak, ewes can be persistently infected with *C. burnetii* and this can reactivate during the following gestational period, as has been found in goats (Berri et al., 2007), but without significant abortion problems. This would also mean that the impact of *C. burnetii* infection would be high in terms of abortions and the associated economical losses when firstly entering the flock, but

lower in the following lambing seasons, although the risk for human infection would remain for longer in an infected flock.

Shedding of *C. burnetii* in milk was sporadic, and concentrated in the first month after parturition, whereas excretion in vaginal discharges and faeces continued for longer. Similar results were reported by Rodolakis et al. (2007), although in the current study the shedding period was longer and for up to 150 days after parturition in faecal samples and up to 90 days in vaginal discharges. Since the detection methodology used in both studies was similar, the longer periods of excretion observed in the current study was due to other factors. For example, concurrent disease, such as the presence of Border disease virus when the study started (despite the absence of persistently infected animals) could have had an immunosuppressant effect that enhanced *C. burnetii* excretion.

In view of these results, control measures to prevent transmission of *C. burnetii* should focus on contaminated faeces and birth products. The high resistance of *C. burnetii* to desiccation enhances survival in the environment for long periods (Maurin and Raoult, 1999) and favours the spread of contaminated aerosols (Tissot-Dupont et al., 1999; Tissot-Dupont et al., 2004). The consumption of raw milk from infected flocks should also be avoided, although this is probably a less common route for human infection (Benson et al., 1963; Hatchette et al., 2001).

Control of *C. burnetii* in an infected flock based on OTC treatment is not effective, as has been shown in this study; however, further studies are needed to evaluate the efficacy of the treatment in diminishing the burden of bacteria, using quantitative methods such as quantitative real-time PCR (Kim et al., 2005; Guatteo et al., 2008), or in reducing infectivity. At present, our results do not support the use of OTC to control *C. burnetii*. Furthermore, the increase in antibiotic resistance (Maurin and Raoult, 1999) is a concern that advises for a restricted use of antibiotics in livestock. Vaccines may be useful, with Phase I vaccines though to be more effective than Phase II vaccines in reducing bacteria excretion, but studies are still scarce and mainly obtained from experimentally infected animals (Arricau-Bouvery et al., 2005). The only report on the performance of Phase I vaccine (Coxevac, CEVA, Santé Animal) in commercial flocks was carried out in dairy cattle and showed a protective effect on animals vaccinated before infection, but little effect when animals were already infected (Guatteo et al. 2008).

Table IV. 5. Individual kinetics of *C. burnetii* through vaginal swabs, milk and faeces from 13 selected ewes from day +15 to day +150 after lambing. ND, not done.

ID ewe	Group	Vaginal discharges (interval post-lambing)					Milk (interval post-lambing)							Faeces (interval post-lambing)								
		15	30	45	75	90	15	30	45	75	90	105	120	150	15	30	45	75	90	105	120	150
16128	Treated	+	+	+	ND	+	+	-	+	ND	-	ND	ND	ND	+	+	+	ND	+	ND	ND	ND
16148	Treated	+	+	-	ND	-	-	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	+	-	ND	-	ND	-	ND
22298	Treated	+	-	+	+	ND	+	+	-	-	ND	ND	ND	-	+	+	-	+	ND	ND	ND	+
39334	Treated	+	+	-	ND	-	+	-	-	ND	-	ND	-	-	+	+	-	ND	+	ND	-	-
43767	Treated	+	+	+	ND	-	+	-	-	ND	-	ND	-	-	+	+	-	ND	+	ND	-	-
43794	Treated	-	+	-	ND	+	-	-	-	ND	+	ND	-	-	-	+	+	ND	-	ND	-	-
43806	Treated	+	+	+	+	ND	-	+	-	-	ND	-	ND	-	+	+	-	+	ND	-	ND	+
43813	Treated	+	-	+	ND	-	+	-	-	ND	-	ND	ND	ND	-	+	+	ND	-	ND	ND	ND
17267	Control	+	+	+	-	ND	+	-	-	-	ND	-	ND	-	-	+	-	-	ND	+	ND	-
39311	Control	+	+	+	+	ND	-	+	-	-	ND	ND	ND	ND	+	+	-	+	ND	ND	ND	ND
43718	Control	+	+	-	+	ND	-	-	-	-	ND	-	ND	-	-	+	-	-	ND	-	ND	+
43804	Control	+	-	+	ND	-	+	-	-	ND	-	ND	-	-	+	+	+	ND	+	+	-	+
43822	Control	+	-	+	ND	-	+	-	-	ND	+	ND	ND	-	+	+	+	ND	+	ND	ND	-

CONCLUSIONS

Several epidemiological aspects of *C. burnetii* infection in sheep require further investigation. Similarly, control measures based on antibiotic administration or and vaccination have to be fully evaluated. Q fever is a zoonosis with a substantial impact in human health in several countries and sheep are an important reservoir for *C. burnetii* as they can maintain the infection and shed the bacteria for long periods.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funding from INIA, FAU2006-00002-C04-01 and FEDER. Ianire Astobiza is the recipient of a predoctoral fellowship of the Department of Agriculture, Fisheries and Food of the Basque Government. We thank Inés Povedano for laboratory assistance. We acknowledge the collaboration of the veterinarian and the farmer from the Sheep Association (ELE, Gipuzkoa).

***Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination**

Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L.

Research in Veterinary Science 2011; 91, 3: e58-63.

ABSTRACT

Abortion due to *Coxiella burnetii* was confirmed in the 2007/08 season in two naturally-infected dairy sheep flocks. Proportion of *C. burnetii* shedders and bacterial loads in vaginal mucus were high among aborted or lambing ewes, as was within-flock seroprevalence. Before the next reproductive season (2008/09) 75% of ewes and 50% of replacement lambs were vaccinated (Coxevac, CEVA Santé Animale) keeping the remaining as untreated controls. Compared with the previous year results when abortion outbreak started, a great reduction in the percentage of abortions, in the number of shedders and in the bacterial burden excreted by the ewes was found in both flocks. However, seroconversion in non-vaccinated yearlings from both flocks and the presence of *C. burnetii* DNA in bioaerosols taken at sheep premises at lambing indicated that infection was still active. No differences were observed between vaccinated and control groups in terms of proportion of *C. burnetii* shedders. These results suggest that optimal results of vaccination in heavily infected flocks may not be obtained in a short-term period.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Q fever, ovine, aerosols, vaccination

INTRODUCTION

Emerging infectious diseases are nowadays of great concern for human and animal health authorities worldwide (Chomel et al., 2007; Dong et al., 2008). Q fever, a disease caused by the Gram-negative intracellular bacterium *Coxiella burnetii*, is currently one of the most relevant re-emergent diseases in Europe (Schimmer et al., 2008; van der Hoek et al., 2010). Infections with *C. burnetii* in humans are mostly asymptomatic, but in acute clinical outcomes, fever, pneumonia or hepatitis are characteristic. Acute infections may become chronic and cause severe clinical signs in patients with cardiac valvulopathy (Maurin and Raoult, 1999). In addition to human concerns, Q fever may trigger reproductive problems in animal herds thus causing important economic losses to livestock producers. *C. burnetii* is responsible for abortion and stillbirths in small domestic ruminants whereas infected cattle may suffer from metritis and infertility (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; To et al., 1998a). Livestock (cattle, sheep and goats) are also widely recognized as the main source for human infections (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Berri et al., 2003; Tissot-Dupont et al., 1999; van den Brom and Vellema, 2009; Woldehiwet, 2004). Infected animal females shed large quantities of *C. burnetii* to the environment after abortion or at normal delivery through birth products, such as fetal membranes or placentas, but also via different body secretions such as urine, milk and feces (Arricau-Bouvery et al., 2003b; Astobiza et al., 2010; Berri et al., 2001; Berri et al., 2005b; Guatteo et al., 2006). *C. burnetii* can survive in the environment for long periods and human infection is mainly acquired by inhalation of

aerosols containing infected dust particles from infection sources (Maurin and Raoult, 1999). Decreasing *C. burnetii* shedding and survival in the environment may diminish the risk of infection for humans. However, there is scarce knowledge on the relationship between infection dynamics of *C. burnetii* in naturally infected animal herds, the level of bacteria in aerosols and the effect of vaccination in decreasing the risk of aerosol-associated transmission of *C. burnetii* (Delay et al., 1950; Schulz et al., 2005; Welsh et al., 1958). Molecular techniques can help to identify shedders of *C. burnetii* (Astobiza et al., 2010; Rodolakis et al., 2007) and quantify excretion rates thereby providing valuable information for the investigation of the infection dynamics of *C. burnetii* within animal herds as well as for testing the efficiency of any candidate control tool.

Animal vaccination has been proposed as one of the main tools to control *C. burnetii* infection (van den Brom and Vellema, 2009). However, the real effects of vaccination in naturally-infected herds, where the infection status of *C. burnetii* may alter vaccination outcome in terms of the expected protection level or reduction of pathogen shedding, are difficult to infer (Behymer et al., 1976; Sadecky et al., 1975). *C. burnetii* vaccine efficacy is highly dependent on its composition (Ormsbee et al., 1964), with vaccines prepared from phase I *C. burnetii* providing higher protection against infection than those prepared with phase II (Arricau-Bouvery et al., 2005). Currently, few scientific reports are available on the performance of a phase I vaccine in commercial dairy cattle herds (Biberstein et al., 1977; Guatteo et al., 2008; Sadecky et al., 1975). This vaccine showed a significant protective effect on non-infected susceptible animals, and it is the vaccine currently used to control *C. burnetii* infection in goat herds in The Netherlands (van den Brom and Vellema, 2009). It is hence of great relevance for the control of the infection to improve knowledge on the real effects of vaccination in naturally infected herds as well as overcoming obstacles to the efficiency of vaccination in control programmes.

This study was aimed at evaluating the efficacy of a commercial phase I vaccine in terms of reduction of *C. burnetii* shedding in naturally highly-infected sheep flocks. Our hypothesis, according to the information available, was that vaccination of animals in infected sheep flocks would reduce the level of excretion and/or the percentage of shedding animals within the herd. Thus, our approach consisted of the evaluation of the percentage of *C. burnetii* shedders, the estimation of the bacterial excretion burden, the rate of seroconversion and the level of bacteria in aerosols inside and outside sheep premises. Epidemiological information of Q fever in these sheep flocks was also gathered.

MATERIAL AND METHODS

Study flocks: *C. burnetii* infection status and flock management schemes

In January 2008, fetuses and placentae from aborted sheep from two different flocks in the Basque Country (Northern Spain) were referred to our laboratories for the diagnostic of the cause of abortion. Fetuses and placentae were examined for different abortifacient pathogens as previously reported (Hurtado et al., 2001). Histopathological examination of placentae revealed lesions compatible with Q fever. Additionally, microscopic examination of Stamp-stained placental smears revealed the presence of organisms with morphology compatible with *C. burnetii*. Sera from aborted ewes were analysed by the complement fixation test and found to have titres $\geq 1/64$.

In the first flock (F1) 20 ewes aborted in the 2007/08 reproductive season, representing 6.3% of the flock. Three of the aborted ewes and 13 ewes that lambed normally were surveyed and vaginal swabs collected. *C. burnetii* DNA was detected by PCR (Berri et al., 2000; Willems et al., 1994) in the vaginal mucus of 2 aborted and 8 lambed ewes (10/16; 62.5%). After the lambing period, blood samples from the whole flock were collected and analysed for the presence of anti-*C. burnetii* antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Cox kit, LSI, Lyon, France) and seroprevalence was set at 35.7% (95/266).

The second flock (F2) also had problems of abortion during the 2007/08 lambing season. Nineteen animals (5 adult and 14 yearlings) aborted in F2, representing an abortion rate of 5.2%. Twenty ewes (3 aborted and 17 normally lambed) were surveyed and vaginal swabs collected. *C. burnetii* DNA was detected in all but one of the samples (19/20; 95.0%). After lambing, blood from the whole flock was collected and sera analysed for the presence of antibodies by ELISA, as abovementioned. Detectable circulating levels of antibodies against *C. burnetii* were found in 43.8% (117/269) of the animals in the flock.

Management and animal premises characteristics from each of the study flocks are described in table IV.6. Briefly, F1 follows traditional management with a short housing period inside the premises and long grazing periods in mountain pastures. First lambing occurs when animals are 23-25 months old. Sheep premises have not been recently renovated, and straw is used for bedding for sheep and lambs which are reared together. Conversely, sheep facilities from F2 were built in 2007, with slatted floors and automatic manure handling. New-born lambs are artificially fed once they have had colostrum from their dams, and reared in separate straw-bedded pens. Management is more intensive, with longer housing periods, and yearlings have their first lambing when 14-15 months old.

Table IV. 6. Characteristics of management and animal premises in each flock.

		Flock 1	Flock 2
Adults	Housing permanently	No	4 months
	Indoors at night	5 months	2 months
	Raised on pasture	7 months	6 months
	Communal pastures	Yes	No
	Lambing season	November - March	January - April
Lambs	Colostrum	Dams	Dams (bottle)
	Maternal milk	Yes	No
	Age at weaning	60 days	50 days
	Housing permanently	4 months	5 months
	Indoor at night	2 months	7 months
	Raised on pasture	6 months	No
	Synchronizing oestrus	No	Yes
	Lambing season	February - March	February - May
	Communal pastures	Yes	No
Premises	Year of construction	1990	2007
	Floor area/sheep (m ²)	1.2	1.5
	Shed volume/sheep (m ³)	5.7	18
	Ventilation	Doors and windows	Ridge vent
	Floor type	Straw bedding	Slatted floor
	Manure remove	3 months	Daily

Experimental vaccination design

After confirmation of *C. burnetii* infection in the flocks, a vaccination experiment with an inactivated phase I vaccine (Coxevac, CEVA, Santé Animal, France) was planned for the next reproductive season after farmers agreement. As “Coxevac” is not commercially available in Spain, import permissions were obtained from the Spanish Drug Agency. In addition, approval for the experimental work was obtained from the local Animal Health and Welfare Authorities (Diputación Foral de Gipuzkoa).

The total census of the study flocks and animal birth dates were obtained from the Latxa Breed Association and the animals were listed in ascending order according to birth date. Then, one every four ewes were included in the unvaccinated control group, placing the remaining animals in the vaccinated group. This method guaranteed ewes’ systematic selection for an age-matched arrangement of control and experimental groups. Thus, 75% of the ewes (n = 189 in F1 and n = 178 in F2) were vaccinated with the commercial vaccine 6 weeks before artificial insemination. Animals were revaccinated with a booster dose 3 weeks later according to the recommendations of the manufacturers. The remaining 25% of the ewes were left as untreated control (n = 75 in F1 and n = 58 in F2). The experiment started in May and June 2008 for F1 and F2, respectively. Animals born in 2007/08 and kept as replacement ewes (hereafter “yearlings”) were randomly allocated to each one of the control and vaccinated groups as commented above. Half of the yearlings (n = 25 in F1 and n = 50 in F2) were vaccinated with the same dose used for adult ewes before mating and the

remaining half were left as unvaccinated control group (n = 26 in F1 and n = 46 in F2). Vaccination of yearlings was also performed 6 and 3 weeks before mating.

Sampling approach and monitoring

Farmers were asked to register the number of aborted ewes throughout the 2008/09 reproductive season and their identification (ear tags). Once lambing started, *C. burnetii* shedding was monitored in each of the study flocks. Vaginal swab samples were collected within 30 days after lambing from 90 (F1; 62 vaccinated and 28 control ewes) and 95 (F2; 68 vaccinated and 27 control ewes) randomly selected ewes from each experimental group and age category (2-9 years old) in order to avoid any confounding effect of age on bacterial excretion. Similarly, control and vaccinated yearlings were surveyed with vaginal swabs within 30 days after lambing. All 8 animals lambing in F1 (5 vaccinated and 3 control animals) and 73 lambing in F2 (34 vaccinated and 39 control animals) were sampled. Yearlings were bled by jugular venipuncture before the vaccination experiment started and again after the lambing period (10 months later) in order to assess for seroconversion against *C. burnetii*.

The presence of *C. burnetii* in aerosols was monitored in each of the study flocks. Air samples were collected from inside and outside flock premises monthly from the start of the lambing season (November 2008 for F1; December 2008 for F2) until the end of lactation. Air was sampled using a Sartorius air sampler (Air Sampler, MD8 airscan, Goettingen, Germany) at a flow rate of 100 l/min for 10 min.

Molecular analyses

Vaginal swabs and gelatine filters were treated for DNA extraction using BioSprint 96 DNA Blood Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Briefly, vaginal swabs were treated with 300 µl of TE buffer (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), mixed with 180 µl of ATL (Qiagen) and digested with 20 µl of proteinase K (8 mg/ml) for 30 min at 70°C. Gelatine filters used in the air sampler device were treated with 2 ml of ATL buffer until gelatine was dissolved. This solution was mixed with 500 µl of buffer ATL and vortexed, centrifuged and heated at 56°C. Then, 2 aliquots of 1 ml each were taken and 50 µl of proteinase K (8 mg/ml) were added to each one and incubated for 1h at 56°C. The extraction process was continued following the indications of the kit. Negative controls were included every ten samples to rule out DNA contamination. PCR amplification was performed using primers targeting a transposon-like repetitive region of *C. burnetii* as described elsewhere (Berri et al., 2000; Willems et al., 1994).

Additionally, in order to quantify the number of bacteria shed by the animals and present in the environmental aerosols, a selection of samples was analysed by quantitative real time PCR (qPCR) using a commercial kit (LSI Taq-Vet *C. burnetii*, Laboratoire Service International, Lissieu, France), according to the manufacturer's instructions. This is a duplex qPCR assay that includes a probe targeting the repetitive transposon-like region of *C. burnetii*, and a probe that detects a host-encoded gene (GAPDH) used as internal amplification control (IAC). Selected samples included all aerosol gelatine filters and a selection of *C. burnetii* DNA positive vaginal swabs from vaccinated (n = 23 from F1 and n = 8 from F2) and non-vaccinated (n = 11 from F1 and n = 5 from F2) recently lambed ewes (2008/09 season). In addition, to compare the evolution between reproductive seasons in terms of bacterial shedding at lambing, qPCR was retrospectively performed on positive vaginal swabs obtained at the time of abortions (2007/08 season). PCR assays were performed using an ABIPRISM 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems). A sample was considered positive if the cycle threshold (Ct) value of the target gene was below 40 and amplification of the IAC was required to rule out false negatives caused by PCR inhibition. Loads (in log scale) of *C. burnetii* were quantified following the recommendations given by the kit manufacturer. The Ct values of the target gene were converted into estimated quantities of *C. burnetii* using serial dilutions of known concentration of the external positive control. Results were expressed as the logarithmic transformation of the number of *C. burnetii* per vaginal swab or air filter.

Serological analyses

The presence of anti-*C. burnetii* antibodies in sera was analysed by the ELISA Cox kit (LSI- Laboratoire Service International, Lyon, France) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

In order to evaluate the effects of vaccination, the percentages of *C. burnetii* shedders in the vaccinated and control groups were compared with Chi-square test. Proportions of shedders were also compared with regard to pre-vaccination serological status (seropositive/seronegative). Additionally, log-transformed mean bacterial shedding values in vaccinated and control groups were compared with the Student's t-test. All the statistical analyses were carried out with the SAS statistical package (SAS Institute 9.1, Cary, NC, USA). P values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Rate of abortions during the 2008/09 season

Abortion rates in the 2008/09 season were greatly reduced in both flocks compared to the previous season. Abortions accounted to 1.9% (6/315) and 1.8% (6/332) of the whole flock in F1 and F2, respectively. Abortions occurred both in control and vaccinated groups when animals were grazing mountain pastures, hence hampering the collection of adequate samples for the identification of the cause of abortion. Nonetheless, vaginal swabs from the 2 aborted ewes that could be sampled in F1 did not reveal the presence of *C. burnetii* DNA by PCR.

C. burnetii vaginal shedding

In F1, 64.4% of ewes and 0.0% of yearlings were positive to *C. burnetii* DNA in vaginal secretions. Statistically marginally significant differences ($\chi^2 = 3.14$, $P = 0.07$) were observed between the percentages of *C. burnetii* shedder ewes in vaccinated (59.7%; 37/62) and control (75.0%; 21/28) groups. No statistically significant differences in the percentage of shedder animals (both adult and yearlings) between vaccinated (57.1%; 20/35) and control (73.7%; 14/19) groups were found when only considering animals that reacted negative in pre-vaccination serological testing (ELISA). No statistically significant differences were evidenced in the proportion of shedders in vaccinated (63.0%; 17/27) and control (77.7%; 7/9) groups among ewes that tested seropositive before vaccination.

In F2, 9.4% of ewes and 26.0% of yearlings were positive to *C. burnetii* DNA in vaginal secretions. A slightly higher proportion of shedder ewes was evidenced in the vaccinated group (10.3%; 7/68) when compared to the control one (7.4%; 2/27), though differences were not statistically significant. As in F1, no statistically significant difference in the percentage of shedder animals was found between vaccinated (12.5%; 4/32) and control (13.3%; 2/15) groups when only considering animals (both adult and yearlings) seronegative at the beginning of the experiment. None of the seropositive ewes in the control group ($n = 12$) shed *C. burnetii* whereas 3 out of 36 (8.3%) vaccinated ewes were positive to the presence of *C. burnetii* DNA in vaginal secretions, but these differences were not statistically significant. The proportion of shedder yearlings in the vaccinated group (23.5%; 8/34) did not statistically differ from that in the control group (28.2%; 11/39).

Finally, statistically significant differences ($\chi^2 = 72.5$, $P < 0.001$) in the percentage of shedder ewes were found between F1 (64.4%) and F2 (9.4%) in the 2008/09 reproductive season. The percentage of shedder yearlings did not statistically differ in F1 (0.0%) when compared to F2 (26.0%) in 2008/09.

Bacterial load in vaginal secretions

In F1, the mean bacterial load in vaginal secretions was found to be lower in 2008/09 (3.4 Log *C. burnetii*/swab) compared to that in 2007/08 (6.5 Log *C. burnetii*/swab) when abortion episodes happened (Table IV.7); these differences were statistically significant ($P < 0.05$). Mean Ct measured by qPCR in 2007/08 was 24, whereas the following year it was 33 ($P < 0.0001$). No differences were observed in the level of *C. burnetii* shed from vaccinated and control ewes in this flock. Both vaccinated and control animals (adult + yearlings) reacting seronegative before vaccination shed similar amounts of *C. burnetii* (Table IV.7).

Ewes from F2 also shed a statistically-significant ($P < 0.05$) lower bacterial load in vaginal secretions in 2008/09 (2.9 Log *C. burnetii*/swab) when compared to retrospective bacterial shedding the year before (7.32 Log *C. burnetii*/swab) (Table IV.7). Mean Ct detected in qPCR in 2007/08 season was 20, whereas the following year the Ct was 34 ($P < 0.0001$). No differences were observed in the number of *C. burnetii* shed by vaccinated and control ewes. Vaccinated animals (adult + yearlings) seronegative at the time of vaccination shed similar bacterial loads than control ones (Table IV.7).

Comparing mean bacterial loads between seasons, a reduction of 66.4% and 62.5% in non-vaccinated and vaccinated ewes, respectively, was observed in F1. In F2 the reduction was slightly higher (72.2% and 77.4% for non-vaccinated and vaccinated ewes, respectively).

Rates of seroconversion in yearlings

Nine percent (2/25) of the unvaccinated yearlings in F1 seroconverted between mating to the end of the lambing period. This percentage increased in the group of vaccinated yearlings (63.6%; 14/22). In parallel, 17.8% (8/45) of unvaccinated yearlings in F2 and 57.9% (22/38) of the vaccinated ones seroconverted as antibodies were detected by ELISA. The increased seroprevalence observed in vaccinated animals could be attributed to the persistence of vaccinal antibodies.

***C. burnetii* in aerosols**

The aerosol samples collected in F1 were positive indoors and outdoors just recently after lambing. One month later, *C. burnetii* was absent outdoors but it still remained present in aerosols indoors (Table IV.8). Interestingly, the bacterial load decreased progressively with time from lambing and became negative in the third month after lambing started. In F2 all the air samples collected both indoors and outdoors remained negative at lambing and during the lactation period (Table IV.8).

Table IV. 7. Bacterium load (in log of *Coxiella*/swab) shed through vaginal mucus in the sampled ewes at the 2007/08 season when abortion happened, and by groups of age. Bacterium load in the next season (2008/09) considering if animals were vaccinated or not, and their immune status at time of vaccine was given.

Season 2007/08		Flock 1				Flock 2			
		N	<i>Coxiella</i>	SD	<i>P</i>	N	<i>Coxiella</i>	SD	<i>P</i>
Abortion/ Normal lambing	Aborted ewes	2	4.00	1.41	0.54	3	8.00	3.61	0.52
	Lambled ewes	8	5.75	2.55		15	6.40	2.69	
Age	Yearlings	3	3.67	0.58	0.21	8	7.13	2.70	0.85
	>2 years old	7	6.14	2.54		10	6.30	2.98	

Season 2008/09		Flock 1				Flock 2			
Immune status before vaccination		N	<i>Coxiella</i>	SD	<i>P</i>	N	<i>Coxiella</i>	SD	<i>P</i>
Non vaccinated	Seronegative	8	1.50	3.50	0.45	5	2.00	1.22	NA
	Seropositive	3	2.00	4.00		0	--	--	
	Total	11	1.64	0.92		5	2.00	1.22	
Vaccinated	Seronegative	10	1.50	3.70	0.13	6	1.67	1.37	0.89
	Seropositive	12	2.17	5.08		2	1.50	0.71	
	Total	23	1.83	1.03		8	1.63	1.19	

NA= non-applicable

Table IV. 8. Environmental contamination during the lambing season: bacterium load (log of *Coxiella*/filter) in aerosols throughout the season inside and outside sheep premises, and percentage of *C. burnetii* DNA shedders by vaginal mucus in each group of age.

Flock	Date of visit	Number of lambings ^a	<i>Coxiella</i> load in aerosols		No. shedders / analysed (%)
			Outdoors	Indoors	
Flock 1	28/11/2008	92	1.69	3.47	
	11/12/2008	32	Neg	1.72	
	22/12/2008	60	Neg	2.51	Ewes: 61/91 (67%)
	29/01/2009	29	Neg	2.56	Yearlings: 0/8 (0%)
	02/03/2009	3	Neg	Neg	
	02/04/2009	2	Neg	Neg	
Flock 2	12/01/2009	113	Neg	Neg	
	12/02/2009	127	Neg	Neg	
	12/03/2009	10	Neg	Neg	Ewes: 9/96 (9%)
	21/04/2009	8	Neg	Neg	Yearlings: 19/73 (26%)
	22/05/2009		Neg	Neg	

^a Number of lambings at the beginning of the season (1st visit) and between two consecutive visits.

DISCUSSION

The occurrence of abortions associated to *C. burnetii* in two commercial sheep flocks gave us the opportunity to investigate some aspects of the epidemiology of Q fever during two consecutive breeding seasons (2007/08 and 2008/09), as well as to evaluate, under field conditions, the efficacy of a commercial phase I vaccine in terms of reduction of the percentage of shedders and bacterial load.

This vaccine had been previously evaluated in goats vaccinated prior to experimental infection with *C. burnetii*, demonstrating protection by significantly decreasing *C. burnetii* shedding in milk, vaginal secretions and faeces (Arricau-Bouvery et al., 2005). In commercial dairy cattle herds, the same vaccine showed good results in prevention of shedding in susceptible non-infected animals (Guatteo et al., 2008). To our knowledge, our field experiment represents the first study of vaccination against *C. burnetii* in naturally highly-infected commercial sheep flocks, which resulted in little effect in terms of reduction of the proportion of *C. burnetii* shedders. The high percentage of animals infected with *C. burnetii* within the flocks could explain in part the low efficiency of the vaccine. In addition, phase I vaccine was applied according to the manufactures' instructions, i.e., in 2 doses, 6 and 3 weeks before artificial insemination in the case of adult ewes, or before natural mating in the case of yearlings. In this manner, by the time yearlings were vaccinated some of them were probably already infected. Our hypothesis is that if applied earlier in the replacement group, vaccine protection could be achieved during the first year of life. Thus, for future vaccination schemes, we plan to vaccinate replacement lambs as soon as possible (ca. at 3 months of

age) and apply a booster injection at the time of breeding in order to provide immunity before natural infection is established.

The approach followed by Guatteo et al. (2008) in infected cattle herds included testing the whole herd by ELISA and PCR before vaccination. Following that approach only those animals negative by both techniques were vaccinated in order to guarantee a better evaluation of the efficacy of the vaccine under field conditions. Unfortunately, the high number of individuals in a sheep flock makes PCR testing very expensive and therefore impracticable. Thus, in the study herein, the vaccine was applied to all the animals in the flock without considering the previous infection status of each individual. Nevertheless, serology of the whole flock was performed before vaccination to retrospectively assess the results of vaccination in relation to the serological status of the animals. However, no significant differences in the level of *C. burnetii* shedding were found between vaccinated and non-vaccinated seronegative animals, in agreement with previous findings in which phase I vaccines failed to prevent shedding (Biberstein et al., 1977; Schmeer et al., 1987). Nevertheless, since serology is not a good indicator of infection status, as it is well known that a percentage of infected sheep do not develop antibodies (Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a), current results should be considered with caution.

Interestingly, and in spite of the abovementioned results, the rate of abortions, the percentage of *C. burnetii* DNA shedders, and the bacterial load excreted by ewes at lambing, decreased dramatically in the reproductive season (2008/09) following the abortion outbreak (2007/08). Although this reduction could be interpreted as a direct effect of the vaccine, the same situation was also observed in the control group. Therefore, a natural decrease in the circulation and excretion rates of *Coxiella* in two consecutive breeding seasons, as demonstrated by Berri et al. (2002) cannot be disregarded. These authors concluded that pregnant animals which are highly infective at the time of the abortion/parturition may not shed *C. burnetii* at later parturitions. Other groups also demonstrated that lambings subsequent to *Coxiella* abortions are usually carried to term, with negative results for *Coxiella* shedding (Babudieri, 1959; Lang, 1990). However, the possibility that ewes may be chronically infected and become potential shedders of the bacteria through the vaginal tract at subsequent pregnancies cannot be discarded.

The seroconversion observed in the control group of yearling ewes in both flocks suggested that infection was still active in the 2008/09 season. However, whereas F2 showed higher rates of seroconversion and a higher percentage of *C. burnetii* shedders among yearlings but very low among older ewes, in F1 there was a lower seroconversion

rate and no shedding in the replacement ewe group, but a high number of shedders among older ewes. These observations may be the result of an endemic *C. burnetii* infection in F1 and an epidemic outbreak in F2. Nonetheless, data from more than just two reproductive seasons and from more sheep flocks would be necessary to more accurately determine the real epidemiologic situation. Surprisingly, although vaccine phase I has been shown to induce a good antibody response (Arricau-Bouvery et al., 2005; Brooks et al., 1986), some vaccinated yearlings did not seroconvert. As blood samples were collected several months after vaccination, the level of antibodies could have decreased along this period indicating the need of annual revaccination to enhance the immune response. However, further studies are necessary given the unknown relationship between antibody titer and resistance to shedding.

Although differences between flocks are difficult to understand, differences in management and housing conditions could provide some clues. In fact, two important differences between both flocks can be highlighted. Firstly, the new facilities of F2, with periodic removal of the manure by means of a below-slat mechanical scraper, which would probably remove the manure without raising aerosols, thus decreasing risk of indoor air contamination as reflected by the negative aerosols. Secondly, reproductive management differences might play a role. First lambing in F2 occurs when ewes are 15 months old, and therefore more sensitive to *C. burnetii* infection than >2 years old ewes (first lambing in F1). Nevertheless this should be confirmed in further studies.

Q fever in humans is commonly acquired by inhaling infectious aerosols or dust contaminated with *C. burnetii* excreted by birth fluids, faeces or milk of domestic ruminants (Arricau-Bouvery, et al., 2003b; Astobiza et al., 2010; Berri et al., 2000; Berri et al., 2005a; Guatteo et al., 2007a; Rodolakis et al., 2007). Some studies have detected *C. burnetii* in aerosols in artificial situations (Delay et al., 1950; Tigertt et al., 1961; Welsh et al., 1958) and also in natural infected environments (Kersh et al., 2010; Schulz et al., 2005; Yanase et al., 1998). Nonetheless, our study is the first to assess the quantity of *C. burnetii* in air in a sheep flock from lambing until the end of the lactation inside and outside facilities. The positive results obtained indoors and outdoors in F1 at lambing confirmed the high risk of airborne transmission at the lambing period, when placentae and fetal fluids are delivered with high bacterial load that contaminates the environment (Maurin and Raoult, 1999). In addition, *C. burnetii* remained in air two months after lambing, as long as most of the adult ewes lambed. The detection of positive air samples only in F1 but not in F2 could perhaps be explained by the higher percentage of shedders at lambing and the different characteristics of the sheep premises (bedding and manure removal) as discussed above. Additionally, ventilation was

higher in F2, where air flowed continuously from each side of the sheep barn towards the roof. In contrast, windows and doors were the only means of ventilation in F1 and they remained closed for most of the time.

In conclusion, after an outbreak of *C. burnetii* abortion in sheep, high quantities of the bacterium are released to the environment with the consequent risks for uninfected animals and humans. In the following reproductive season, lower quantities of *C. burnetii* are shed but the risk of infection still remains active as shown by the air positive aerosol samples and the seroconversion rates observed in young animals throughout the lambing season. Vaccination with Phase I vaccine may be an effective preventive method when administered to uninfected flocks or recently infected flocks with a high percentage of susceptible animals. According to the results reported herein, however, vaccination of heavily infected commercial flocks does not seem to have a significant effect in reducing the number of shedders and the bacterial load excreted in the first year after an outbreak of abortion. Vaccination should be considered as a long term effective control option (EFSA, 2010). Once an outbreak of abortions by Q fever is confirmed, medical, hygienic and preventive measures should be implemented in the flock to minimize the risks of infection to humans. Our observations suggest that management of the flock may have a substantial effect in diminishing the levels and time at which *C. burnetii* circulates in a flock. Further research on a higher number of infected flocks and a longer follow-up period will help to elucidate the way in which management modulates *C. burnetii* life-cycle.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funding from INIA, FAU2006-00002-C04-01 and FEDER. Ianire Astobiza is the recipient of a predoctoral fellowship of the Department of Environment, Territorial Planning, Agriculture and Fisheries of the Basque Government. F. Ruiz-Fons is supported by a postdoctoral contract from the 'Instituto de Salud Carlos III' of the Spanish Government. We acknowledge the collaboration of farmers and veterinary practitioners involved in the cases.

Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock

Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A.,
García-Pérez, A.L.

Applied and Environmental Microbiology 2011; 77, 20: 7405-7407.

ABSTRACT

Vaccination is considered one of the best options for controlling *Coxiella burnetii* infection in livestock. The efficacy of phase I vaccine was investigated over 4 years in a sheep flock with confirmed *C. burnetii* infection. Shedding was not detected in ewes and yearlings in the last 2 years, but *C. burnetii* still persisted in the environment.

SHORT COMMUNICATION

Q fever is a zoonotic disease caused by the obligatorily intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. A broad range of species has been identified as reservoir for *C. burnetii*, but livestock are considered to be the main source of human infection (Angelakis and Raoult, 2009; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). *C. burnetii* is responsible for abortion and stillbirths in small ruminants (Angelakis and Raoult, 2009; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Infected females shed large quantities of *C. burnetii* into the environment after abortion or at normal delivery through fetal membranes or placentas, but also via different body secretions such as urine, milk and faeces (Angelakis and Raoult, 2009; Astobiza et al., 2010). Humans become infected mainly by inhalation of contaminated aerosols or dust. Although the optimal strategy for controlling infection in livestock may require a combination of measures, vaccination is one of the most effective (Arricau-Bouvery et al., 2005; EFSA, 2010), and vaccines composed of antigenic phase I bacteria have been shown to be more protective than those prepared with phase II (Arricau-Bouvery et al., 2005; Ormsbee et al., 1964). The efficacy of a commercial phase I vaccine has been assessed in naturally infected cows (Guatteo et al., 2008) and in goat and sheep flocks (EFSA, 2010; Hogerwerf et al., 2011; Rousset et al., 2009b), demonstrating protection in noninfected susceptible animals. Based on previous results (Astobiza et al., 2011a), our hypothesis was that in extensively infected sheep flocks a long-term vaccination scheme would be required to reduce *C. burnetii* excretion within the flock. To test this hypothesis, we measured the percentage of *C. burnetii* shedders, the level of bacterial excretion, and the presence of bacteria in aerosols in premises where sheep were kept during 4 years of annual seasonal vaccination in a flock with a history of abortions.

The study flock was managed under a semi-intensive system, with animals being kept indoors from January to May, including the lambing time and milking periods. In April 2005, 66.7% (20/30) of the ewes had antibodies against *C. burnetii* as determined by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) (Cox kit, LSI, France), and bulk milk tank (BTM) was *C. burnetii* positive by PCR. This flock was sold, and the new owner was interested in determining whether Q fever infection was still present, so in May 2007 a new BTM sample

was analyzed and was found to be PCR positive for *C. burnetii*, and blood samples from the whole flock were analyzed by ELISA and showed a high seroprevalence (56.6%, 231/408). The farmer agreed to implement a vaccination programme with an inactivated phase I vaccine (Coxevac, CEVA Santé Animal, France) planned for four consecutive reproductive seasons (2007/08, 2008/09, 2009/10 and 2010/11). Import permissions (Coxevac was not commercially available in Spain) and approval for the experimental work by the local Animal Health and Welfare Authorities were obtained.

The vaccine was administered according to manufacturer's recommendations 6 and 3 weeks before artificial insemination, leaving a group of unvaccinated animals. Although unvaccinated animals could serve as a continuous reservoir for *C. burnetii* replication, leading to an underestimation of vaccine efficacy (Guatteo et al., 2008), it was of interest to leave a small group of animals unvaccinated to measure a possible effect of the vaccination on the percentage of shedders and the bacterial load shed. Thus, in the first season a control group was left unvaccinated (25% of the ewes, n = 106; 25% of yearlings, n = 19). In the second year of vaccination (2008-09) every adult ewe was vaccinated (n = 226) and a control group was maintained only in the yearling group (50% of the yearlings, n = 40). Finally, in the last 2 years of vaccination (2009-10 and 2010/11), the whole flock was vaccinated.

In order to monitor the effect of vaccination on *C. burnetii* shedding in ewes and yearlings during the four vaccination seasons, vaginal mucus, milk and feces (feces were sampled in only the first and second seasons) of animals selected at random within 30 days postlambing were sampled. The presence of *C. burnetii* was also monitored as previously described (Astobiza et al., 2011a) in aerosols inside and outside areas where sheep were kept at monthly intervals during the lambing period, with the exception of the first year, when only one sampling could be done at the end of the lambing period. In the last reproductive season (2010-11), several other environmental samples were collected, including swab wipes (dust) from different solid surfaces in areas where animals were kept (18 samples) and soil samples outside premises that housed sheep. Vaginal swabs, feces samples, milk samples, gelatin filters from the air sampler, and environmental samples were treated for DNA extraction (Astobiza et al., 2011a) and PCR was performed as described elsewhere (Berri et al., 2000). All *C. burnetii* DNA positive samples were analyzed by quantitative PCR (LSI Taq-Vet *Coxiella burnetii*, LSI, France) in order to compare the evolution of bacterial load shedding at lambing and environmental contamination.

In every reproductive season, the farmer was requested to record the ear tags of ewes which experienced abortions. Abortion rates were below 4% in all seasons (Table IV.9), with the exception of the group of yearlings in 2009-10, which suffered 54.5% abortions due to *Toxoplasma gondii* in the absence of other abortifacients. Table IV.9 reports the number of animals examined, the evolution of the percentage of shedders, and the mean bacterial load excreted in 4-year period. The percentage of shedders was very high during the first lambing season and decreased significantly ($P < 0.05$) in the next lambing season (2008-09), with no shedders in the last two seasons. Bacterial load also decreased along the first 2 years (Table IV.9). Although this reduction could be interpreted as a direct effect of the vaccine, the possibility of a natural decrease in the circulation and excretion rates of *Coxiella* in consecutive breeding seasons cannot be discarded (Berri et al., 2002). In addition, an increasing herd immunity resulting from the continuous exposure to the agent could have led to an interruption of the infection cycle. Considering the proportions of vaccinated and nonvaccinated animals shedding bacteria in vaginal mucus, milk and feces (Table IV.10), as well as the mean bacterial loads excreted, no statistical differences were observed between the vaccinated and control groups ($P > 0.05$).

Table IV. 9. Summary of the evolution of shedding through different routes during the first two vaccination seasons when shedders were detected.

Season ^a and animal group (n)	Vaginal mucus		Milk		Faeces	
	No. of shedders (%)	Mean bacterial load (log)	No. of shedders (%)	Mean bacterial load (log)	No. of shedders (%)	Mean bacterial load (log)
2007-2008						
Ewes (55)						
Vaccinated (40)	33 (82.5)	3.86	14 (35.0)	2.54	32 (80.0)	3.20
Control (15)	12 (80.0)	4.22	1 (6.7)	1.72	8 (53.3)	3.22
Yearlings(32)						
Vaccinated (17)	3 (17.7)	2.01	0		0	
Control (15)	2 (13.3)	1.24	0		0	
2008-2009						
Ewes ^b (56)	2 (3.6)	3.23	0		1 (1.8)	0
Yearlings(43)						
Vaccinated (22)	1 (4.5)	0	0		1 (4.5)	0
Control (21)	3 (14.3)	1.06	0		2 (9.5)	1.82

^aNo shedding was detected in 2009-2010 and 2010-2011.

^bAll ewes were vaccinated in 2008-2009.

Table IV. 10. Results of the vaccination programme over the 4-year periods.

Season	Abortion rate (%) in:		No. of animals examined (% shedders)	% of animals shedding (baterial load ^a) in:			No of aerosol samples (no. positive [baterial load ^a])		
	Ewes	Yearlings		Vaginal mucus	Milk	Faeces	Total	Indoor	Outdoor
2007-08	1.2	2.8	87 (63.2)	57.5 (3.08)	27.3 (2.13)	72.7 (3.21)	2	2(0)	0
2008-09	2.6	3.8	99 (10.1)	6.1 (2.15)	0	4.0 (1.82)	10	5(0)	5(1[0.44])
2009-10	2.2	54.5	62 (0)	0	0	- ^b	8	6(2[1.61])	2(1[3.36])
2010-11	1.2	0	72 (0)	0	0	-	9	6(0)	3(0)

^aLog (number of *C. burnetii* organisms)/ml.

^b-, fecal samples were not collected

Positive aerosols were detected at the end of lambing season in 2008-09, coinciding with yearlings' lambing time (Table IV.9). Surprisingly, *C. burnetii* DNA was detected in aerosols collected indoors and outdoors during lambing in the third year of vaccination, when shedding in animals was not observed. However, in the last two seasons, fecal samples were not analyzed, and therefore, the possibility that *C. burnetii* was excreted in feces can not be excluded. Thus, the management of contaminated manure could have generated contaminated aerosols. In the last season (2010-11), no positive aerosols were detected, but *C. burnetii* DNA was detected in 3 out of 18 environmental samples taken from surfaces. This is accordance with the long persistence of this bacterium in the environment (Angelakis and Raoult, 2009; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Nevertheless, further studies are needed to confirm the viability of this bacterium in the environment, and also to genotype the animal and environmental strains to determine whether both types have the same origin.

In conclusion, although preventive phase I vaccination reduces the risk of future Q fever outbreaks in uninfected animals (Guatteo et al., 2008; Hogerwerf et al., 2011), vaccination of an extensively infected flock does not have an immediate significant effect. The detection of positive environmental samples after 4 years of vaccination suggests that vaccination might require a long term commitment to reduce the potential for re-emergence of infections and shedding, as some authors have observed (Camuset and Remmy, 2008) and predicted (Courcoul et al., 2011).

This work was supported by funding from INIA, FAU2006-00002-C04-01 and FEDER.

We acknowledge the collaboration of the farmer.

Evaluation of the efficacy of oxitetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock

Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L.

Enviado y en revisión a: *The Veterinary Journal* 03/11/2011, (ver Anexo VIII.1).

ABSTRACT

This work tried to emulate the usual scenario that veterinary practitioners find when an outbreak of Q fever appears in a sheep flock and gestation is advanced and therefore too late to apply the vaccine. In those cases, immediate application of antibiotics is needed and vaccination has to be postponed until the next reproductive season. Here, 75% of the ewes from a dairy sheep flock suffering from Q fever were treated with oxytetracycline at days +100 and +120 of gestation, keeping the remaining 25% of the animals as untreated control. Vaginal swabs, faeces and milk samples from 81 ewes (57 treated and 24 untreated) were analysed by PCR within 30 days post-lambing revealing a high percentage of *C. burnetii* shedders. No significant differences were found between groups neither in the percentage of shedders nor in the mean bacterial shedding. In the following season vaccination with phase I vaccine was implemented, vaccinating 75% of the ewes and 50% of the replacement ewe lambs before artificial insemination. Both vaccinated and control groups were homogeneously composed of ewes treated and untreated with antibiotics the previous season. The number of shedders and the bacterial excretion loads significantly decreased compared to the previous season but no statistically significant differences were found between the vaccinated and control groups. In addition, no significant effect derived from the application of oxytetracycline in the previous season was observed. Vaccination was repeated the following two seasons, and the percentage of animal shedders was reduced to minimal levels highlighting the importance of vaccination during a long-term period.

Keywords: *Coxiella burnetii*; vaccination; oxytetracycline; sheep; abortion.

INTRODUCTION

Q fever is a zoonotic disease caused by the obligatorily intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. Humans become infected mainly by inhalation of aerosols or dust contaminated with *C. burnetii* shed by infected animals (Tissot-Dupont et al., 2004; Welsh et al., 1958). A broad range of species has been identified as reservoirs for *C. burnetii*, but livestock are considered the main source for human infection (Angelakis and Raoult, 2009; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005) and small ruminants the most frequently involved animals (EFSA, 2010).

C. burnetii is responsible for abortion and stillbirths in small domestic ruminants whereas infected cattle may suffer from metritis and infertility (Angelakis and Raoult, 2009; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Infected females shed large quantities of *C. burnetii* to the environment after abortion or at normal delivery through birth products, such as foetal membranes or placentas, but also via different body secretions such as urine, milk and

faeces (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Astobiza et al., 2010; Guatteo et al., 2007a). In addition, *C. burnetii* produces small, dense, highly resistant spore-like forms (Angelakis and Raoult, 2009) that can survive extracellularly as infectious particles for long periods. Hence, measures leading to a significant decrease of shedding by animals would help to control the spread of the bacterium within a herd and therefore limit the zoonotic risk. An inactivated *C. burnetii* phase I vaccine has been reported effective in experimental and natural conditions in non-previously infected goats, sheep and cows (Arricau-Bouvery et al., 2005b; Guatteo et al., 2008; Hogerwerf et al., 2011). Unfortunately, in most countries vaccines have not been commercially available and antibiotic treatment has been traditionally used to reduce abortions and *C. burnetii* shedding (Behymer et al., 1977; Berri et al., 2001; Berri et al., 2002; Berri et al., 2005a) In fact, treatment with antibiotics is the only control measure available when an outbreak of Q fever affects pregnant ewes at the end of the gestational period, since vaccine should be applied before artificial insemination or natural mating.

In our previous work (Astobiza et al., 2010), oxytetracycline (OTC) did not seem to have any effect in reducing the number of shedders or limiting the length of shedding, but reduction of bacterial load due to treatment was not evaluated. In the current study the hypothesis was that, in the event of an abortion outbreak, antibiotic treatment followed by vaccination before the next reproductive season would reduce or eliminate bacterial excretion and/or decrease the percentage of shedding ewes. This would be the usual scenario that veterinarians find when an outbreak of Q fever appears in a sheep flock and gestation is too advanced for vaccination. Also, since vaccination should be considered as a long term control option (Astobiza et al., 2011b; Courcoul et al., 2011), the immunization programme included vaccine implementation during the two following productive seasons adding to a total of three years vaccine administration. The results of the evolution of *C. burnetii* shedding during four consecutive years under the proposed scheme are presented here.

MATERIALS AND METHODS

Study flock

The studied flock belonged to Latxa breed, the original dairy sheep of the Basque Country (Northern Spain). The flock was managed under a semi-extensive system where animals are indoors from December to June, including lambing time and most of the milking period, and also pass several months grazing in mountain pastures in close contact with other sheep flocks and beef cattle. The farmer complained of abortions while ewes were in the mountain pastures and several causes of abortions had been diagnosed in the past

(*Toxoplasma gondii*, *Chlamydomphila abortus* or Border disease). In May 2007, PCR analysis of a bulk-tank milk (BTM) sample and several individual milk samples taken from 50 lactating ewes gave PCR positive results to *C. burnetii* (38%, 19/50). In addition, blood samples from the whole flock were collected and analyzed by ELISA (Cox kit, LSI-Laboratoire Service International). An overall flock seroprevalence of 54% was observed.

Study design and sampling approach

Once abortion by *C. burnetii* was confirmed in the flock during the 2007/08 breeding season, OTC treatment followed by a 3-year vaccination scheme was programmed in the flock. Figure IV.3 summarises the experimental procedure including the number of ewes and yearlings in each experimental group, and the number of animals sampled.

Season 2007/08: The total census of the flock and ewes' birth dates were obtained from the Latxa Breed Association and animals were listed in ascending order accordingly. Then, every fourth ewe was selected for the untreated group, with the remaining animals being assigned to the treated group. A double treatment with 20mg/kg of OTC (Tenalina LA, CEVA Santé Animale) was then administered at the end of the gestation period (at around day 100 the first dose and 120 the second dose) to 75% of the ewes. A total of 13 ewes had aborted before the first dose of OTC. After treatment the farmer was required to register the ear tags of aborted ewes and yearlings. Once lambing started, vaginal swabs, milk and faecal samples from 81 ewes were collected within the first month after lambing to investigate the percentage of shedders and the bacterial load excreted. Yearlings were all treated with a double OTC treatment at the corresponding gestation dates. *C. burnetii* excretion was not monitored in this group.

Season 2008/09: Before the breeding season started, a vaccination programme was planned with an inactivated phase I vaccine (Coxevac, CEVA, Santé Animale). As Coxevac was not commercially available in Spain, import permissions were obtained from the Spanish Drug Agency. Approval for the experimental work was obtained from the local Animal Health and Welfare Authorities. Seventy five percent of the flock was vaccinated 6 and 3 weeks before artificial insemination according to manufacturer's recommendations and the remaining 25% of the animals were left as the control group. Ewes previously treated with OTC and untreated ewes were homogeneously distributed in each group. Half of the replacement ewe lambs (named 'yearlings' after lambing) were vaccinated and the other half left as control. Vaginal swabs, milk and faeces were collected after lambing from 82 ewes and 48 yearlings to monitor the effect of vaccination. In addition, blood samples were taken

before vaccination and after lambing to assess for seroconversion against *C. burnetii* in non-vaccinated animals, to investigate if infection was still active in the flock.

Seasons 2009/10 and 2010/11: In the following two reproductive seasons, the whole flock was vaccinated again before artificial insemination. Within the first month after lambing, vaginal swabs were collected from 91 and 82 animals each season (Figure IV.3), respectively, including ewes and yearlings, to monitor *C. burnetii* shedding. Two BTM samples were collected in each reproductive season for PCR analysis to study bacterial milk shedding at flock level.

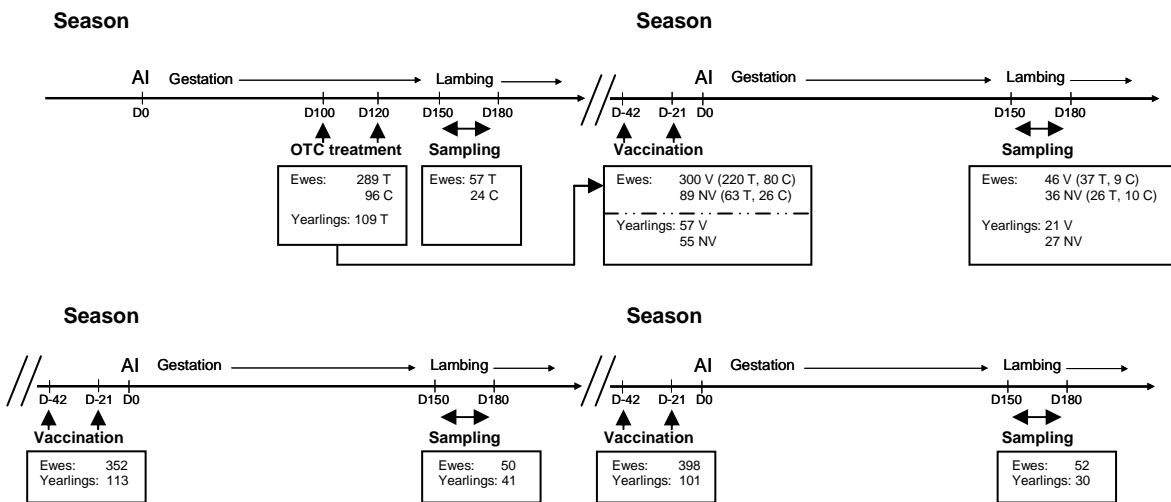


Figure IV. 3. Experimental procedure followed along 4 reproductive seasons. The number of ewes and yearlings included in each experimental group, and the number of animals sampled in each season is indicated. AI, artificial insemination; OTC, oxytetracycline; T, animals treated with OTC; C, control animals not treated with OTC; V, vaccinated animals; NV, non-vaccinated animals.

Laboratory analyses

Foetuses and placenta, vaginal swabs and sera from aborted animals were collected in each season and analysed following routine laboratory procedures (Hurtado et al., 2001). In addition, vaginal swabs, milk and faeces samples collected at lambing were treated for DNA extraction (Guatteo et al., 2007a; Rodolakis et al., 2007) including negative controls every ten samples to rule out DNA contamination. The extraction process was continued using BioSprint 96 DNA Blood Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. PCR amplification was performed using primers targeting a transposon-like repetitive region of *C. burnetii* (trans-1: 5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3; trans-2: 5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3') as described elsewhere (Berri et al., 2000; Willems et al., 1994).

In order to quantify the number of bacteria shed by the animals, a selection of samples was analysed by quantitative real time PCR (qPCR) using a commercial kit (LSI Taq-Vet *Coxiella burnetii*, Laboratoire Service International) and an ABIPRISM 7500 FAST thermocycler (Applied Biosystems). A sample was considered positive if the Ct (cycle threshold) value of the target gene was below 40 and amplification of the IAC was required to rule out false negatives caused by PCR inhibition. Loads of *C. burnetii* were quantified using serial dilutions of known concentration of the external positive control provided by ANSES (Agence Francaise de Securite Sanitaire des Aliments, France, courtesy of Dr. Elodie Rousset). Results were expressed as log of *C. burnetii*.

The presence of anti-*C. burnetii* antibodies in sera from replacement animals was analysed by the ELISA Cox kit (LSI- Laboratoire Service International) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analyses

In order to evaluate the effects of the antibiotic treatment and vaccination, and the combination of both of them, the frequencies of *C. burnetii* shedders in each group were compared with the Fisher's exact test. Comparison of log-transformed mean bacterial shedding values in PCR positive samples between groups and the type of sample were analysed by comparison of means in order to demonstrate the potential effect of control measures in decreasing *C. burnetii* shedding. All statistical analyses were carried out with the SAS statistical package (SAS Institute, 9.1). *P* values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Season 2007/08: Effects of antibiotics in *C. burnetii* shedding

The farmer considered that the number of abortions decreased after the first antibiotic treatment. A total of 4 ewes and 3 yearlings aborted, and 5 of them belonged to the OTC treated group (2 ewes and 3 yearlings). *C. burnetii* DNA was confirmed by PCR in one placenta but the ewe could not be identified and its treatment status remained unknown. Interestingly, *C. burnetii* DNA was absent in the vaginal mucus from aborted ewes. The most relevant finding after investigating other abortifacients was the high seroprevalence (92%, 12/13) against Border disease virus (BDV).

A high percentage of animals that lambled normally shed *C. burnetii* by at least one route (vaginal mucus, faeces or milk). The percentages of shedders in the OTC and control groups are shown in Table IV.11. No significant differences were found between groups

regarding the percentage of shedders or the bacterial load excreted. The mean bacterial load excreted through milk was statistically lower compared to faecal samples or vaginal mucus ($P<0.05$). Also the percentage of milk shedders was lower.

Season 2008/09: Effects of vaccination in *C. burnetii* shedding

In the following year, 1.5% (6/395) of the ewes and 14.5% (17/117) of the yearlings aborted, but only 16 of them could be identified, 7 belonging to the vaccinated group and 9 to the unvaccinated group. Five foetuses, 1 placenta, 13 vaginal swabs and 13 sera were collected from aborted animals. *C. burnetii* DNA was not detected. The histopathological study of placenta and foetal tissues showed compatible lesions with *T. gondii* in 2 foetuses and BDV in 3 foetuses. Serology provided evidence of the circulation of BDV in the flock (46%, 6/13 of sera had BDV antibodies). The presence of other bacterial abortifacients was ruled out.

A significant reduction was observed in the percentage of ewes shedding *C. burnetii* when compared with the percentage of shedders in the previous season ($P<0.05$) (Table IV.11). A total of 26.8% of the animals shed the bacteria through vaginal mucus or faeces but no *C. burnetii* DNA was detected in milk. The mean bacterial load excreted was significantly lower compared to the previous season ($P<0.05$). However, when comparing the vaccinated and non-vaccinated groups no statistical differences were observed neither in the percentage of shedders nor in the bacterial load excreted.

As shown in Table IV.11, no positive effect was observed when evaluating the possible beneficial effects that the application of the antibiotic treatment could have had in reducing the number of shedders and the bacterial load excreted in the following reproductive season. Moreover, when comparing ewes that were sampled in both seasons, 10 OTC-treated ewes shed *C. burnetii* the first season (2007/08), but only 4 remained shedding the bacteria in the following season (2008/09). However, none of the 7 untreated animals that shed the bacteria in 2007/08 shed *C. burnetii* DNA in 2008/09, ruling out a residual effect of the OTC treatment administered the previous season.

In season 2008/09, the group of yearlings (lambs born the previous lambing season and not treated with OTC) shed the bacteria through vaginal mucus (10.4% of shedders) and faeces (18.8% of shedders) and no significant differences were observed between vaccinated and control group. The mean bacterial load excreted by vaccinated yearlings was lower than in the non-vaccinated group (1.62 and 3.19 log *Coxiella* respectively), but differences were not statistically significant.

Table IV. 11. Percentage of ewe shedders and bacterial load excreted after antibiotic treatment in 2007/2008 lambing season, and after vaccination in 2008/2009 lambing season.

	Vaginal mucus		Milk		Faeces	
	% shedders (Pos./Anal.) ^a	Log bacterial load (n) ^b	% shedders (Pos./Anal.)	Log bacterial load (n)	% shedders (Pos./Anal.)	Log bacterial load (n)
2007/2008						
OTC treated (T)	82.5 (47/57)	4.37 (14)	56.1 (32/57)	3.80 (10)	61.4 (35/57)	5.29 (14)
Control (C)	66.7 (16/24)	4.77 (7)	54.2 (13/24)	3.82 (5)	75.0 (18/24)	5.75 (9)
2008/2009						
Vaccinated (V)	15.2 (7/46)	2.53 (7)	0.0	NA ^g	10.9 (5/46)	2.91 (3)
- VT ^c	18.9 (7/37)	2.53 (7)	0.0	NA	13.5 (5/37)	2.91 (3)
- VC ^d	0.0 (0/9)	NA	0.0	NA	0.0 (0/9)	NA
Non vaccinated (NV)	30.6 (11/36)	3.04 (10)	0.0	NA	16.7 (6/36)	2.79 (5)
- NVT ^e	33.3 (8/24)	3.11 (7)	0.0	NA	12.5 (3/24)	3.17 (3)
- NVC ^f	25.0 (3/12)	2.77 (3)	0.0	NA	25.0 (3/12)	2.22 (2)

^a Pos./Anal., Number of positive animals / number of analysed animals; ^b n, number of animals analysed by real-time quantitative PCR; ^c VT, vaccinated animals previously treated with OTC; ^d VC, vaccinated animals not previously treated with OTC; ^e NVT, non-vaccinated animals previously treated with OTC; ^f NVC, non-vaccinated animals not previously treated with OTC; ^g NA, non-applicable

Seroconversion was only assessed in non-vaccinated yearlings to avoid interferences with vaccine residual antibodies, and 18.2% (10/55) of the unvaccinated yearlings seroconverted indicating that *C. burnetii* infection was active during the second reproductive season (2008/09).

Evolution of *C. burnetii* shedding along the control programme

A high reduction in the percentage of shedders and bacterial load was observed along the four consecutive lambing seasons (Figure IV.4). In the third season (2009/10), when the whole flock had been vaccinated, the percentage of aborted animals decreased in ewes and yearlings (2.0 and 1.8%, respectively) and no DNA of *C. burnetii* was detected in 3 fetuses and 1 placenta from aborted animals. Fifty ewes were analyzed and only two of them (4.0%) were PCR positive in vaginal mucus. DNA of *C. burnetii* was also detected in BTM samples. In yearlings, none of the examined animals shed the bacteria.

In the last lambing season (2010/11), the rate of abortions increased both in ewes and yearlings (17.1% and 21.8%, respectively) due to BDV, diagnosis based on the analysis of 7 fetuses, 7 placentae and 10 sera. Lesions compatible with BDV were observed, and serology revealed 80% (8/10) of seropositive animals and the presence of a persistently infected animal. *C. burnetii* was not detected in any of the vaginal swabs collected from 10 aborted animals.

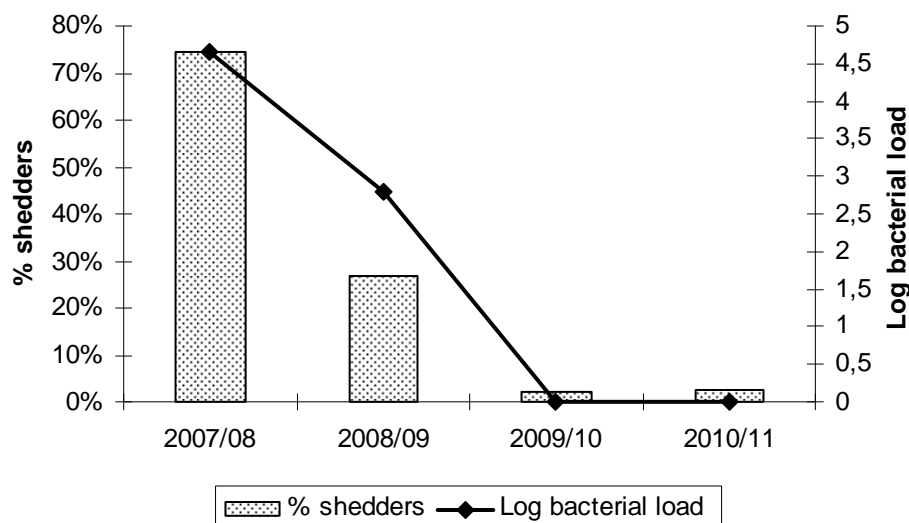


Figure IV. 4. Evolution of the percentage of animal shedders and bacterial shedding through vaginal mucus along four seasons.

Regarding *C. burnetii* shedding, a similar percentage of shedders was detected (3.9%, 2/52) compared to the previous season. Ewes shed the bacteria through vaginal mucus but no excretion of *C. burnetii* was detected in yearlings. BTM samples were also PCR negative.

DISCUSSION

The study flock, managed under a semi-extensive grazing system, was exposed to Q fever and afterwards suffered from other abortifacients, indicating that control of abortions is difficult in these management conditions. Strategies are yet needed to minimize production losses in such conditions. In this study, we tried to minimize the effects of Q fever by first treating with OTC and then with vaccine in phase I during three consecutive years.

This study has shown interesting results concerning the efficacy of OTC in field conditions. Although antibiotic treatment is effectively used in humans to reduce clinical symptoms associated with Q fever, little information on the effectiveness and efficiency of antibiotics against Q fever in domestic ruminants is available, especially in sheep. A former study administering aureomycin for 5 days in cows chronically infected with *C. burnetii* did not show optimal results (Luoto et al., 1951). Other authors dosing chlortetracycline for 30 days in cows during the dry period found that *C. burnetii* infection could be suppressed (Behymer et al., 1977). In most cases, OTC is administered intramuscularly to reduce bacterial shedding. However, in a study where the antibiotic was administered daily in drinking water (Behymer et al., 1977), a significant effect in decreasing the level of antibodies

was reported, but the bacteria were recovered from spleen, suggesting that antibiotic treatment may suppress rather than eradicate *C. burnetii*. Our previous work demonstrated that a double OTC treatment at days 100 and 120 of the gestational period neither prevented the shedding of bacteria nor limited the duration of bacterial excretion in sheep (Astobiza et al., 2010). However, the possibility of new re-infections cannot be discarded, though infected animals seem to be protected against re-infections with the same or different strains (Rodolakis and Cochonneau, 2011). The current study also confirmed a lack of effect of the OTC treatment in reducing bacterial load excretion. In addition, it demonstrated no beneficial residual effect in the next lambing season (2008/09) in terms of reducing or eliminating bacterial excretion in previously treated ewes. Studies on bacterial viability should be performed in order to confirm the infectivity of the bacteria excreted by treated ewes. Nevertheless, as previously reported (Astobiza et al., 2010; Berri et al., 2005a), farmers observed a reduction in abortions after OTC treatment suggesting that antibiotic treatment would maintain foetuses alive until the end of gestation. Therefore, when an outbreak of abortions due to *C. burnetii* occurs, the application of antibiotics could be justified to reduce the associated economical losses. Control interventions based on the combination of several groups of antibiotics should also be evaluated to improve control strategies in ruminants. The combination of doxycycline and hydroxychloroquine has been shown effective in chronic human Q fever (Angelakis and Raoult, 2009); hydroxychloroquine alkalizes the phagolysosomes enhancing the bactericidal activity of doxycycline against *C. burnetii* inside host cells. In any case, antibiotic treatments should guarantee absence of antibiotic residues in carcasses and milk. In this study, first OTC dose was administered when ewes were in the dry period and pregnant and, the second one, on day 120 of gestation; this is one and two months before lambing and milking, respectively. Being OTC withdrawal period in sheep milk ca. 4 days (Fletouris et al., 2008), no risk of antibiotics residues in the carcasses of lambs fed with milk from their dams or in the cheese produced with the milk would occur.

In the next reproductive seasons (season 2008/2009 and thereafter), the laboratory results did not reveal presence of *C. burnetii* DNA in vaginal swabs or placentas from aborted ewes. As previously published, vaccination with phase I vaccine in highly naturally infected sheep flocks does not seem to have a significant effect in reducing the number of shedders or the bacterial load excreted during the first year (Astobiza et al., 2011a). Nevertheless, the absence of abortions due to *C. burnetii* at the same time that seroconversion was observed in the control group of yearlings together with the bacterial load shed by non-vaccinated animals in the second lambing season, suggested that infection was still active in the flock and that phase I vaccine could have had a possible protective effect. However, since *C. burnetii* infection was widespread in the flock, natural immunization

cannot be excluded. In fact, the high percentage of *C. burnetii* shedders at the beginning of the study together with the high seroprevalence in the flock, indicate that vaccine was mostly applied to animals already infected. *C. burnetii* produces long-lasting antibodies which decrease with time. Therefore, the application of the vaccine could have had a booster effect in seropositive animals, as has been already observed (Herczeg et al., 2008). In field conditions, when flocks are heavily infected, it is necessary to implement long-term vaccination programmes (Astobiza et al., 2011b; Camuset and Remmy, 2008) as predicted by some authors (Courcoul et al., 2011). Results showed that *C. burnetii* infection was active during the first two seasons, but the levels of infection decreased significantly along the four years. Nevertheless, whereas in a previous study excretion of *C. burnetii* by vaginal route was totally suppressed after three years of vaccination (Astobiza et al., 2011b), here *C. burnetii* DNA was still detected in vaginal mucus. It is possible that in this case, other pathogens like BDV, previously detected in this flock, upsurged and reactivated *C. burnetii* infection resulting in a prolonged excretion in ewes. In any case, the effect of this vaccine in protecting yearlings during the last two seasons has been demonstrated.

The large reduction in the number of shedders through milk after the second year of the Q fever control programme observed here is in agreement with epidemiological findings previously reported in sheep, which showed a lower bacterial excretion and a shorter time of shedding through milk compared to vaginal mucus or faeces (Astobiza et al., 2010; Rodolakis et al., 2007). This would help to minimize the potential risks of *C. burnetii* transmission through milk or milk derivatives consumption (Benson et al., 1963).

CONCLUSIONS

We demonstrated that the combination of OTC treatment of gestational sheep during a Q fever outbreak followed by a 3 year vaccination scheme reduced the percentage of shedders but did not completely suppress bacterial shedding. Therefore, further investigations are still needed to elucidate the best control option, which may require a combination of different type of actions, to reduce flock infection in a shorter period of time. Possible interactions between the several pathogens that can be simultaneously co-infecting a flock also need to be investigated.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None of the authors has any financial or personal relationships that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funding from INIA, FAU2006-00002-C04-01. Ianire Astobiza is the recipient of a predoctoral fellowship of the Department of Environment, Territorial Planning, Agriculture and Fisheries of the Basque Government. The authors would also like to acknowledge the collaboration of the farmer.

V. RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que la fiebre Q es considerada como una enfermedad endémica en la población humana en la CAPV (Montejo et al., 1985; Sanzo et al., 1991), hasta el momento de iniciar este trabajo la información acerca de la situación de la fiebre Q en los rumiantes domésticos de la CAPV era escasa, y se limitaba a un número limitado de estudios centrados en la especie ovina. En esta zona, la comunidad médica siempre ha asociado el pico máximo de casos de fiebre Q en pacientes humanos al final de la primavera, con el periodo de la paridera ovina, que transcurre durante los meses de invierno hasta el comienzo de la primavera (Cilla et al., 2008). Efectivamente teníamos constancia de la importancia que podía tener el ganado ovino como una de las principales fuentes de infección, ya que se había comprobado que en el 9% de rebaños ovinos de la CAPV con problemas de abortos, la causa era la fiebre Q (Oporto et al., 2006). Además, un trabajo reciente en el que se realizó un estudio serológico mediante ELISA en 1011 animales de 34 explotaciones ovinas mostró que la seroprevalencia media individual era del 9%, y que el 65% de los rebaños tenía al menos un animal seropositivo (García-Pérez et al., 2009). Además el 22% de los 154 rebaños en los que se investigó la presencia de DNA de *C. burnetii* en leche de tanque tenía animales excretores (García-Pérez et al., 2009). Todos estos estudios indicaban el importante papel *a priori* que desempeñaba el ganado ovino en el ciclo doméstico de la fiebre Q en la CAPV, sin embargo, no existían datos recientes sobre la posible implicación de otras especies de rumiantes domésticos, como el ganado bovino y caprino, como reservorios de *C. burnetii* tal y como se apunta por otros autores (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Berri et al., 2003; Woldehiwet, 2004). Los resultados obtenidos en el estudio 1 han mostrado que efectivamente la especie ovina tiene una seroprevalencia frente a *C. burnetii* más alta tanto a nivel de explotación como a nivel individual, indicando una mayor exposición de esta especie al agente. No obstante, no hay que dejar de prestar atención a los resultados obtenidos en el resto de especies. Por un lado el ganado caprino, a pesar del escaso censo que existe en la CAPV (28.500 cabezas) y por lo tanto el bajo número de explotaciones analizadas en este trabajo (N=11), ha presentado resultados de interés. Así un 27% de las explotaciones caprinas estudiadas tiene seroprevalencias $\geq 20\%$, consideradas moderadas-altas. Por otro lado el ganado vacuno ha presentado un mayor número de individuos seropositivos con ambas técnicas, ELISA y FC, con títulos $\geq 1/10$ en FC, indicando un mayor número de infecciones latentes, si se compara por ejemplo con el ganado ovino. En resumen, aunque hay que hacer más estudios en la especie bovina y caprina, los resultados del estudio 1 apuntan también a su participación en el ciclo doméstico de la fiebre Q en la CAPV.

Los resultados obtenidos en este trabajo llaman poderosamente la atención si se comparan con las elevadas seroprevalencias obtenidas en los rumiantes domésticos en la

isla de Gran Canaria (Rodríguez et al., 2010) o en la Comunidad de Madrid (Carballedo et al., 2008). Los tres estudios son comparables entre sí puesto que se realizaron en el mismo periodo de tiempo y con el mismo kit de ELISA. Las seroprevalencias individuales observadas en Gran Canaria en el ganado caprino (60.4%), ovino (31.7%) y bovino (12.2%) fueron en general elevadas. Así mismo en la zona Centro las seroprevalencias fueron del 22.4%, 31.5% y 5.6% para caprino, ovino y vacuno respectivamente. Llama la atención que una zona endémica como el País Vasco con una incidencia en humana superior a la de otras comunidades, presente seroprevalencias mas bajas en las especies de rumiantes domésticos que en otras zonas de España. Estas diferencias podrían achacarse a los diferentes sistemas de producción de cada zona, ya que los sistemas intensivos o semi intensivos favorecerían el contacto entre animales y la dispersión de la infección en la explotación (Capuano et al., 2001). Otras posibles razones pueden ser las diferentes razas de cada zona, que pueden presentar diferentes susceptibilidades a la infección, así como diferencias en el sistema inmune de manera que la respuesta humoral sea más duradera y/o eficiente, y también podría deberse a que las cepas de *C. burnetii* circulantes en cada región fueran más o menos inmunógenas y/o más virulentas. Pero a este último aspecto se podrá dar respuesta cuando se lleven a cabo estudios de tipificación de cepas.

En diferentes países europeos se han llevado a cabo estudios serológicos para evaluar la distribución de la fiebre Q en los rumiantes domésticos. Los porcentajes de seroprevalencia encontrados en el ganado ovino en este trabajo son similares a los hallados en otras regiones Mediterráneas (Cetinkaya et al., 2000; Kennerman et al., 2010; Loukaides et al., 2006; Masala et al., 2004; Psaroulaki et al., 2006). Por el contrario, la seroprevalencia hallada en el ganado vacuno y caprino es inferior a la encontrada en otros países (Cetinkaya et al., 2000; Masala et al., 2004; Psaroulaki, et al., 2006). Sin embargo, la comparación entre los diferentes estudios es difícil pues tanto las estrategias de muestreo como las técnicas serológicas utilizadas varían entre estudios (Guatteo et al., 2011). Respecto a las técnicas hay que destacar las diferentes sensibilidades que presentan, ya que el ELISA e IFI son técnicas más sensibles que la fijación de complemento (FC) (Horigan et al., 2011; Kittelberger et al., 2009; Kováčová et al., 1998; Rousset et al., 2007). En el estudio 1, de los 214 animales que presentaban anticuerpos con la técnica ELISA, solo 15 fueron positivos por FC, con títulos de anticuerpos $\geq 1/10$. De ahí la importancia de estandarizar los métodos de diagnóstico y los criterios de interpretación para realizar estudios de seroprevalencia de la fiebre Q (Guatteo et al., 2011). Otro factor a tener en cuenta es el origen del antígeno de *C. burnetii* utilizado. Así, los resultados de la técnica ELISA pueden variar en gran medida según el antígeno que se use (Horigan et al., 2011; Kittelberger et al., 2009; Kováčová et al., 1998; Rodolakis, 2006). Así, el antígeno obtenido a partir de aislados de rumiantes es el que

parece presentar un mejor rendimiento (Horigan et al., 2011; Kittelberger et al., 2009) comparado con el antígeno procedente de garrapata. Esta es la razón por la que nosotros elegimos un kit de ELISA con antígeno procedente de un aislamiento de una placenta ovina (cepa CbO1).

El kit de ELISA utilizado en nuestro estudio de prevalencia emplea una mezcla de antígenos en fase I y en fase II, lo que no permite diferenciar entre infecciones agudas y crónicas. En medicina humana, debido a la gravedad de los casos crónicos de fiebre Q, los kits diagnósticos permiten discernir los anticuerpos frente a cada fase. En medicina veterinaria no se ha trabajado lo suficiente en este sentido, y no existen kits comerciales para ser aplicados con este fin. Recientemente se han realizado estudios en el ganado bovino en los que se emplean estos antígenos por separado (Böttcher et al., 2011; Cooper et al., 2011), y a pesar de no estar bien establecido en animales el significado del desarrollo de los anticuerpos frente fase I y a fase II (McQuiston et al., 2002), algunos estudios sugieren que la presencia de anticuerpos en fase II en animales indicaría una infección reciente (Lackman et al., 1962). Así, se ha visto una asociación entre el incremento de la seroprevalencia en animales entre 2 y 3 años y el incremento en la presencia de antígenos en fase II (Bottcher et al., 2011).

Asimismo, en el estudio 1 se ha observado que en el caso del ganado ovino y caprino, la seropositividad aumenta con la edad de manera que puede deducirse que ésta sería proporcional a la exposición al patógeno tal como se ha observado en otros estudios (García-Pérez et al., 2009; Psaroulaki et al., 2006). Sin embargo, en el caso del ganado bovino los valores de seroprevalencia en los animales jóvenes son parecidos a los de los adultos (Cetinkaya et al., 2000). Esto podría ser debido a las características de manejo, ya que, en el caso del ganado vacuno de carne, en comparación con otras especies, la reposición pasa periodos de tiempo más prolongados con los adultos, favoreciendo la posibilidad de contacto con *C. burnetii*. Es destacable también que no se encontró ningún tipo de relación entre la seroprevalencia y la incidencia de abortos ni en el caso del ganado vacuno ni en el ovino a diferencia de lo observado por otros autores (Berri et al., 2007; Cabassi et al., 2006; Cetinkaya et al., 2000; García-Pérez et al., 2009; Khalili et al., 2009; Sanford et al., 1994); sin embargo, existen otros estudios en los que tampoco se halló una relación entre seroprevalencia frente a *C. burnetii* y abortos (Astobiza et al., 2011c; Paiba et al., 1999b).

El tipo de manejo también puede influir en la prevalencia de *C. burnetii* en un rebaño (Adesiyun et al., 1985; Capuano et al., 2001), tal y como se ha mencionado previamente.

Así, un rebaño que tenga un manejo intensivo o semi-intensivo tendrá una mayor seroprevalencia que un rebaño que tenga un manejo extensivo, porque las condiciones de estabulación y el contacto próximo entre los animales favorecerán la transmisión de agentes patógenos. Sin embargo, nuestro estudio parece indicar que este patrón no está del todo claro. Así, en la Tabla V.1 se resumen los resultados de seroprevalencia obtenidos en este trabajo, incluyendo también resultados recientes correspondientes a un estudio realizado en el ganado vacuno lechero de la CAPV, explotado en sistemas intensivos (Astobiza et al., 2011c). Como se puede apreciar, el ganado vacuno de leche, explotado en régimen intensivo, y el de aptitud cárnica en régimen extensivo, presentan valores de seroprevalencia similares tanto a nivel de explotación como a nivel individual; cuando se observa el porcentaje de explotaciones con seroprevalencias superiores al 25%, también las cifras son similares sugiriendo que tanto los sistemas intensivos como los semi-extensivos presentan un riesgo de expansión de la infección por *C. burnetii* similar.

Tabla V. 1. Seroprevalencia frente a *C. burnetii* en rumiantes domésticos en sistemas semi-extensivos e intensivos del País Vasco (2007-2010) (Fuentes: Presente trabajo y Astobiza et al., 2011c).

Especie	Seroprevalencia explotaciones		Seroprevalencia individual		% rebaños seropr.>25%	
	Nº	Nº Pos (%)	Nº	Nº Pos (%)	Nº	Nº Pos (%)
	Vacuno leche	178	89 (50.0)	2462	165 (6.7)	25
Vacuno carne	42	18 (42.9)	618	41 (6.6)	6	14.0
Ovino	46	34 (73.9)	1298	160 (12.3)	10	21.0
Caprino	11	5 (45.5)	109	9 (8.3)	3	27.0

Las especies de rumiantes domésticos en sistemas de manejo semi-extensivos en contacto con especies silvestres tienen el riesgo de adquirir determinadas infecciones (Gortazar et al., 2007). *A priori* es difícil evaluar la importancia que pueden tener las especies silvestres como reservorios en el ciclo natural de *C. burnetii*, ya que existe poca información sobre las vías de excreción de *C. burnetii* al medio exterior por parte de estas especies. La presencia de DNA de *C. burnetii* en las diferentes especies silvestres, demostrada en el estudio 2, no fue elevada, pero se encuentra en unos rangos similares a las seroprevalencias individuales halladas en los rumiantes domésticos. Así, se detectó DNA de *C. burnetii* en el 5.1% de los corzos, 4.3% de los jabalíes, 9.1% de las liebres y entre las aves silvestres, el 11% de los buitres y el 14% de los milanos negros, poniendo de manifiesto la existencia de un ciclo silvestre de *C. burnetii* en la CAPV. Además, estas especies podrían actuar como especies centinelas y podrían indicar alertas sobre posibles focos de infección de fiebre Q, ya que tal y como se observa en la Figura V.1, la mayoría de

los ejemplares positivos se localizaron en la provincia de Álava en un área de un radio de 30-40 km.

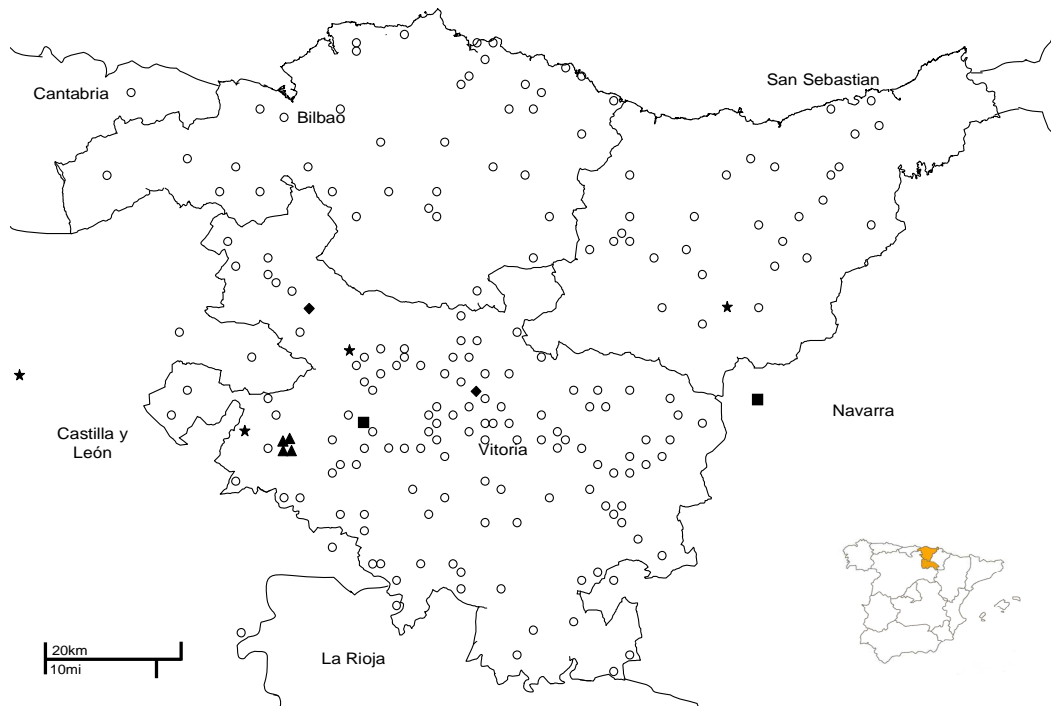


Figura V. 1. Localización de los puntos de muestreo de animales silvestres (símbolos sin relleno). Los símbolos con relleno representan las localidades donde se recogieron los animales positivos a *C. burnetii*: estrellas (corzos), rombos (aves), cuadrados (liebres) y triángulos (jabalíes).

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento en relación a la fiebre Q en animales silvestres, han consistido en estudios serológicos en los que se ha demostrado que numerosas especies animales han tenido contacto con la bacteria (Ejercito et al., 1993; Enright et al., 1971a; Enright et al., 1971b; Giovannini et al., 1988). Sin embargo, en este estudio se optó por la técnica de PCR debido a la complejidad de conseguir los reactivos necesarios para llevar a cabo las técnicas serológicas específicas en la gran diversidad de especies silvestres a investigar. La eficacia de la aplicación de PCR para la detección de DNA de *C. burnetii* en tejidos de animales silvestres ya había sido probada en estudios realizados en ratones domésticos y ratones de campo en el entorno de explotaciones ovinas de la CAPV (Barandika et al., 2007) y también, en otros países, en torno a explotaciones porcinas, caprinas, bovinas, avícolas e incluso zonas urbanas de Holanda (Reusken et al., 2011), indicando que los micromamíferos son capaces de mantener el ciclo infeccioso de *C. burnetii* y contribuir así a la transmisión y propagación del patógeno. También había sido detectado mediante PCR, DNA de *C. burnetii* en ciervos de diferentes zonas de España (Ruiz-Fons et al., 2008). Esto sugiere la importancia de estos ungulados silvestres como

reservorios de la infección, y contrasta con la negatividad de nuestros resultados en esta especie, que podría explicarse por el escaso número de ciervos analizados en este estudio. A diferencia de los resultados en ciervos, en los corzos analizados sí que se detectó la presencia de DNA de *C. burnetii*. Los corzos positivos fueron capturados en la época de partos lo que sugiere que la fuente de infección entre individuos podrían haber sido las placentas infectadas, ya que, si se equipara con lo que sucede en el ganado ovino y caprino, la placenta es el tejido que alberga una mayor carga de *C. burnetii*. De igual forma, los jabalíes positivos eran hembras que vivían en zonas próximas y fueron cazadas tras la paridera, y también podrían haberse infectado con las placentas o productos de parto de animales infectados. Esto, junto con su comportamiento sociable y su desplazamiento en grupos, hace que la transmisión de *C. burnetii* entre jabalíes pueda ser mayor que en otras especies. Sin embargo, tal y como se ha mencionado anteriormente, la escasez de estudios sobre las vías de transmisión de *C. burnetii* en estas especies, hace que estas observaciones sean meras hipótesis.

Sorprendentemente, todos los carnívoros fueron negativos. La prevalencia que se esperaba encontrar en este grupo era mayor, en parte por el tipo de alimentación en este grupo de mamíferos, basada en cadáveres de animales, y en parte también por las altas seroprevalencias observadas por otros autores (Enright et al, 1971a). La negatividad hallada en este estudio podría ser atribuida a que el número de ciertas especies de carnívoros analizados no fue representativo, por lo que, probablemente, un mayor número de capturas habría permitido poder detectar bajas prevalencias de *C. burnetii*. Sin embargo el número de tejones y zorros analizados sí que fue representativo, pero fueron capturados en los meses de invierno, cuando su actividad y por lo tanto la posibilidad de interacción con otros animales disminuye, reduciendo así las posibilidades de contagio.

Como contrapunto a las anteriores observaciones, sí que se encontró un porcentaje elevado de liebres positivas, hecho que se relacionó con su alimentación en base a hierba, quizás contaminada con *C. burnetii* procedente de las heces de rumiantes domésticos excretores que cohabitaban en los mismos pastos comunales, tal y como ha sido descrito en otras especies (Ejercito et al., 1993; Enright et al., 1971a). Así, en un estudio realizado en Nueva Escocia, se encontraron seroprevalencias del 49%, sugiriendo que la infección en liebres puede estar muy extendida en algunas zonas (Marrie et al., 1993). Además, cabe destacar la importancia de esta especie como reservorio de *C. burnetii* debido a la existencia de brotes humanos asociados con liebres positivas a *Coxiella* (Marrie et al., 1986).

En relación con las aves, las especies que viven en el entorno de las explotaciones ganaderas (Enright et al., 1971b; Riemann et al., 1973) o las especies carroñeras (Enright et al., 1971b; To et al., 1998b) son las que han presentado tasas más altas de seroprevalencia frente a *C. burnetii*, lo que coincide plenamente con los resultados moleculares obtenidos en este estudio, ya que han presentado prevalencias altas entre el 11 y el 14%. Asimismo, estos resultados son de sumo interés, ya que tanto el milano negro por ser un ave migratoria como el buitre por su capacidad de volar largas distancias, podrían transportar la infección de un área determinada a otra.

En cuanto a las garrapatas de los animales silvestres analizadas en esta tesis, fueron todas negativas sugiriendo que los ixódidos no presentan ningún papel importante en la transmisión de *C. burnetii* en esta área. Estos resultados coinciden plenamente con el estudio previo que se realizó en garrapatas recogidas en la vegetación de la CAPV y en el que se detectó DNA de *Coxiella* pero con niveles mínimos de infección (0,9% en *Haemaphysalis punctata*) (Barandika et al., 2008). Quizás la ausencia de DNA de *Coxiella* podría ser explicada por el hecho de que las especies de garrapatas que se encuentran en la CAPV no son buenos reservorios de la bacteria, a diferencia de lo que ocurre en otras zonas de España en las que *C. burnetii* sí que está presente. Así, mientras que las especies más abundantes y frecuentes en norte de España son *Ixodes ricinus* y *Haemaphysalis punctata*, en el centro de España *Hyalomma lusitanicum* y *Dermacentor marginatus* son las más abundantes (Barandika et al., 2011). Así, Toledo et al. (2009a) en la zona centro de España encontraron positividad a *Coxiella* en un 7% en garrapatas del género *Hyalomma*. Estos resultados coinciden plenamente con otro estudio realizado en Chipre en el que el 7.3% de las garrapatas del género *Hyalomma* analizadas eran positivas a *C. burnetii* (Psaroulaki et al., 2006). Por otro lado, y en lo que se refiere a la garrapata más abundante en la CAPV, *I. ricinus*, en un estudio realizado en Holanda en un total de 1891 garrapatas adultas de esta especie (Sprong et al., 2011), todas ellas fueron negativas; los mismos resultados se observaron en un estudio realizado en Luxemburgo (Reye et al., 2010), mientras que en Alemania, la prevalencia hallada fue baja (1.9%) (Hildebrandt et al., 2011). Todo ello resalta la escasa importancia que parece tener *I. ricinus* como reservorio de *C. burnetii* en comparación con las especies de *Hyalomma*. Así, en función de las garrapatas presentes en una zona, éstas podrían participar en el ciclo silvestre de la fiebre Q. En el caso de la CAPV en la que *Hyalomma* sp. está ausente (Barandika et al., 2011) o a bajos niveles, no hemos hallado resultados que apunten a que otras especies de ixódidos puedan suplir el papel de reservorio de *C. burnetii*.

Por otra parte, este estudio ha proporcionado nueva información acerca de las especies predominantes de garrapatas que parasitan a las principales especies silvestres encontradas en la CAPV, completando la información disponible del Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (Cordero del Campillo et al., 1994). Así, en cérvidos y lagomorfos, *I. ricinus* es la especie más abundante, *Dermacentor marginatus* y *Dermacentor reticulatus* en jabalíes, mientras que en carnívoros la especie predominante fue *Ixodes hexagonus*. Otras especies que han sido descritas por primera vez en la CAPV gracias a este estudio, han sido *I. hexagonus* en ginetas y marta, *H. hispanica* y *H. concinna* en zorro, y finalmente, *D. reticulatus* e *I. canisuga* en visón americano. Este trabajo pone de manifiesto también la importancia de realizar programas de vigilancia de la presencia de agentes patógenos y de vectores en fauna silvestre, de manera que se pueda controlar la introducción de nuevas especies de garrapatas en una determinada zona, tal y como han hallado varios autores (Ogden et al., 2008; Sonenshine, 1991; Sonenshine, 1993).

Además de los aspectos destacados hasta ahora, en esta tesis se han obtenido importantes resultados que amplían la información epidemiológica existente sobre la infección por *C. burnetii* en el ganado ovino y especialmente en la contaminación ambiental generada tras un episodio de fiebre Q. La principal fuente de contagio para los animales y personas es la inhalación de aerosoles contaminados con bacterias eliminadas a través de la placenta y fluidos fetales por animales infectados durante el periodo de abortos o durante la paridera. Además, los animales infectados excretan *C. burnetii* a través de la orina, heces y leche (Arricau-Bouvery et al., 2003b; Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a; Guatteo et al., 2006; Guatteo et al., 2007a), haciendo de la paridera la época primordial para la propagación de la infección. Así, en el desarrollo de los diferentes estudios de esta tesis se ha observado que tras un brote de abortos por fiebre Q en ganado ovino se observa un alto porcentaje de animales eliminadores de *C. burnetii* a través de las diferentes vías de excreción (38-95%). En este sentido, el estudio 3, además de estudiar la eficacia del tratamiento antibiótico con OTC sobre la reducción del número de abortos, la reducción del número de animales eliminadores y/o el tiempo de excreción de la bacteria, ha permitido conocer los periodos y las principales vías de excreción de *C. burnetii* en el ganado ovino, tras el parto y a lo largo de toda la lactación.

Se ha podido comprobar que la principal vía de eliminación de *C. burnetii* en el ganado ovino es a través de los fluidos vaginales y de las heces, y en menor medida a través de la leche, siendo estas vías y la duración de los periodos de excreción diferentes de los observados en el ganado bovino y caprino, donde la leche es la principal ruta de excreción (Rodolakis et al., 2007; Rodolakis et al., 2009a). Además, se observó que en el

ganado ovino la eliminación en leche era esporádica y se concentraba principalmente en el primer mes tras el parto, mientras que la excreción vaginal y fecal era más prolongada. En el caso de la eliminación fecal, en este trabajo se encontraron animales eliminadores de la bacteria hasta 150 días después el parto, resaltando la prolongada eliminación de la bacteria en las heces del ganado ovino. Así, debido a que la excreción de la bacteria se produce principalmente a través de los fluidos vaginales y las heces, las medidas de control para evitar la transmisión de *C. burnetii* se deberían enfocar principalmente hacia estas dos rutas de excreción (Berri et al., 2003). Por otro lado, aunque la vía digestiva parece ser poco eficiente, la ingesta de leche cruda procedente de rebaños infectados debería de evitarse, ya que tras su ingestión no se ha observado enfermedad pero sí se ha observado seroconversión en humanos (Benson et al., 1963; Hatchette et al., 2001). También existen estudios en los que se ha encontrado *Coxiella* en leche cruda comercializada en supermercados, o en huevos, mayonesa y queso (Fretz et al., 2007; Hirai et al., 2011), por lo que es imprescindible suprimir la infección en las explotaciones lecheras, para evitar cualquier tipo de riesgo para los consumidores. El hecho de que la ruta de transmisión oral sea poco efectiva puede ser debido a la escasa eliminación de bacterias a través de la leche en comparación con otras rutas de excreción, tal y como se ha constatado en éste y otros estudios. Así, en ovejas infectadas experimentalmente, se ha observado que éstas eliminan de 100 a 1000 veces menos cantidad de bacterias a través de la leche que las que puedan eliminar a través del moco vaginal (Rodolakis et al., 2009a).

Además otros datos epidemiológicos de interés derivan del estudio 4. En los dos rebaños estudiados se detectaron tasas de abortos moderadas, un alto porcentaje de animales eliminadores de *C. burnetii*, y unas elevadas tasas de excreción bacteriana. En la siguiente temporada reproductiva, en la que se había vacunado el 75% de las ovejas, en el grupo control sin vacunar se observó un bajo porcentaje de abortos, y una reducción significativa tanto del número de animales eliminadores de *C. burnetii* como de la carga bacteriana al comienzo de la paridera. Esto sugiere que hay una reducción natural de la infección a través de parideras consecutivas, debido probablemente a la inmunización natural que experimentan los animales en un rebaño altamente infectado (Berri et al., 2002). Por ello, para conocer el curso natural de la infección por *C. burnetii*, hubiera sido deseable dejar un rebaño control sin vacunar, pero dada la importancia zoonótica de esta infección, fue preciso aplicar medidas de control de forma inmediata.

En el momento en que aparecen los abortos, al final de la gestación, únicamente queda la opción de administrar antibióticos, postponiendo la vacunación para aplicarla antes de la siguiente temporada de cubriciones. Por ello en este trabajo hemos tratado de

comprobar la eficacia de las medidas de control que pueden tomar los veterinarios de campo en la práctica clínica, como son la aplicación del tratamiento antibiótico y la vacunación. Hasta el momento de comenzar esta tesis la eficacia del tratamiento con OTC no estaba plenamente descrita. Este trabajo representa la primera ocasión en la que se estudia la eficacia de la OTC en un rebaño ovino naturalmente infectado por *C. burnetii*, evaluando su efecto sobre la reducción del número de abortos, así como su efecto sobre la reducción de la excreción bacteriana a través de los fluidos vaginales, leche y heces. La elección de la OTC como tratamiento antibiótico fue debido a su difusión intracelular, y a su corto periodo de eliminación. No obstante, en el periodo de administración (final de la gestación) no existía ningún riesgo de eliminación de residuos a través de la leche o de la carne, ya que los animales a tratar no estaban en ordeño, ni lactantes, ni en periodo de ir a matadero.

El tratamiento con OTC no redujo el tiempo de eliminación de la bacteria ni tampoco el número de animales eliminadores, aunque sí se apreció un descenso del número de abortos tras la aplicación de la primera dosis. Resultados similares se han descrito en un estudio realizado en el ganado vacuno (Woernle et al., 1985), pero en ganado caprino, la administración de OTC no tuvo ningún efecto positivo (Blain, 2007, citado en EFSA, 2010). El tratamiento con OTC tampoco disminuyó la carga bacteriana eliminada por los animales por ninguna de las tres rutas (fluido vaginal, leche y heces), ni acortó el periodo de excreción, ni tuvo ningún efecto residual en la siguiente paridera, tal y como se observó en el Estudio 6. Sin embargo, debido a que disminuye de alguna manera el número de abortos, se recomienda su aplicación para reducir al máximo las pérdidas económicas ya que en la época en la que aparecen los abortos, al final de la gestación, es el único método de control disponible. Los resultados derivados de este estudio indican la necesidad de investigar sobre la eficacia de otras familias de antibióticos para el tratamiento de la fiebre Q. Por ejemplo, la aplicación de doxiciclina junto con hidroxicloroquina, que resultan eficaces en el tratamiento de casos humanos (Angelakis y Raoult, 2009), ya que la hidroxicloroquina alcaliniza el medio del fagolisosoma de la célula y de esta manera el antibiótico puede llevar a cabo su función destruyendo la bacteria. Otro factor que se podría tener en cuenta sería la vía de administración del antibiótico, ya que en la mayoría de los estudios la OTC se ha aplicado por vía intramuscular, y cuando otros autores la han aplicado en el agua de bebida, se han observado indicios de mejora (Behymer et al., 1977).

Debido a la falta de eficacia de la OTC en la reducción de la infección en el rebaño, se planteó estudiar la eficacia de la vacunación. Actualmente, la única vacuna disponible en el mercado es la vacuna en fase I inactivada (COXEVAC, CEVA) comercializada para su

uso en el ganado bovino y caprino (y en ovino con prescripción especial). Es la vacuna que se ha empleado masivamente en los Países Bajos para controlar la infección por *C. burnetii* en el ganado caprino, ya que esta especie se ha identificado como la principal fuente de infección en el brote humano (van den Brom et al., 2009). Hasta ahora todos los estudios realizados con esta vacuna se han centrado mayoritariamente en el ganado vacuno y caprino (Arricau-Bouvery et al., 2005; Camuset y Remmy, 2008; Guatteo et al., 2008; Hermans et al., 2011; Hogerwerf et al., 2011; Rousset et al., 2009b) demostrando un efecto protector en animales susceptibles no infectados. Sin embargo, en el momento de comenzar esta tesis el efecto de esta vacuna no había sido comprobado en el ganado ovino, por lo que el presente trabajo (Estudios 4 y 5) representa la primera ocasión en la que se ha evaluado el efecto de esta vacuna en rebaños ovinos comerciales naturalmente infectados con *C. burnetii*, en el periodo de un año (Estudio 4) y tras un periodo de vacunación de 4 años (Estudio 5).

En el transcurso del Estudio 4, se evaluó la eficacia de la vacuna en el periodo de un año en dos rebaños ovinos que habían padecido durante la temporada anterior abortos por fiebre Q afectando al 6% de los animales del rebaño. Se trabajó con 2 rebaños teniendo en cuenta que los efectos de la vacunación en rebaños infectados naturalmente podrían variar entre rebaños, debido a las diferentes características del manejo y las diferencias entre instalaciones (Behymer et al., 1976; Sadecky et al., 1975). Por ejemplo, se ha comprobado por otros autores que las explotaciones que compran pienso comercial y que retiran la cama más de 10 veces en un año, tienen una probabilidad menor de sufrir fiebre Q que las que dan alimento hecho en la propia explotación y retiran la cama con menor frecuencia (Cantas et al., 2011). Otros factores, tales como la presencia de garrapatas, la higiene deficiente, y la presencia de carnívoros domésticos en el entorno, también han sido asociados con mayor riesgo de padecer fiebre Q (Cantas et al., 2011). Así, partiendo de tasas similares de abortos el año anterior, los dos rebaños, tras la vacunación, presentaron distintos porcentajes de ovejas eliminadoras de *C. burnetii* al parto (64.4% y 9.4%). En uno de los rebaños la infección parecía seguir un patrón endémico, con un alto porcentaje de animales eliminadores entre las ovejas adultas y tasas bajas de seroconversión (F1), mientras que el otro rebaño se ajustaba mejor a un patrón epidémico, con un mayor número de animales eliminadores entre el grupo de las primas y altas tasas de seroprevalencia (F2), resaltando las diferencias existentes entre rebaños. En el primer caso, las viejas instalaciones y un manejo más tradicional podrían ser algunos de los motivos del patrón de la infección, mientras que en el segundo caso, las nuevas instalaciones, una buena ventilación, el suelo de emparrillado y la separación de los corderos de las madres tras el encalostro, son

algunos aspectos que podrían explicar las diferencias observadas, tal y como se ha discutido en el estudio 4.

Una vez que comenzó la paridera y se tomaron muestras a ovejas recién paridas vacunadas y no vacunadas, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en términos de reducción de la carga bacteriana ni en porcentaje de animales eliminadores de *C. burnetii*. Otros estudios realizados previamente también demostraron que las vacunas en fase I no fueron capaces de prevenir la excreción de *Coxiella* (Biberstein et al., 1977; Schmeer et al., 1987). Sin embargo, a la hora de realizar este estudio, no se tuvo en consideración el estado inicial de los animales a la hora de vacunar, es decir, si estaban previamente infectados o no. Según el estudio de Guatteo et al. (2008), la vacuna mostró una mayor eficacia en los animales susceptibles, no infectados previamente, y cuyo estatus fue verificado antes de vacunar mediante técnicas de PCR y ELISA. En nuestro caso el análisis individual de la totalidad de los animales componentes de los 2 rebaños mediante técnicas de ELISA y PCR era económicamente inviable por lo que decidimos vacunar, en condiciones de campo, sin valorar previamente el estatus (infectado o no) de cada individuo. No obstante, teniendo en cuenta los resultados serológicos previos a la vacunación, es decir, si los animales eran seropositivos o no, lo que indicaría un contacto previo con *C. burnetii* antes de la vacunación, se observó que no existían diferencias significativas en el porcentaje de animales eliminadores de *C. burnetii* entre los animales que eran seronegativos y que se vacunaron, y entre los que eran seronegativos y no se vacunaron. No obstante, las técnicas serológicas no están consideradas como buenos indicadores del estado de la infección por *C. burnetii* a nivel individual, ya que un porcentaje de animales infectados no desarrollan anticuerpos (Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a). Un ejemplo de ello son los niveles de seroprevalencias moderados hallados en los rebaños estudiados en esta tesis, entre el 35% y el 57%, que no se corresponden, en general, con los altos porcentajes de animales eliminadores de *C. burnetii* observados.

La aparente ausencia de efecto de la vacuna durante el primer año de aplicación puede atribuirse a la amplia difusión de la infección por *C. burnetii* entre los animales, ya que se partía de altas tasas de animales eliminadores el año anterior, en el momento de producirse los abortos. Además, en el caso de las corderas de reposición (futuras primas, o animales de primer parto), es probable que cuando se vacunaron, muchas de ellas ya estuvieran infectadas debido a la alta carga bacteriana generada por las ovejas abortadas y/o paridas, reduciéndose así la eficacia potencial de la vacunación (Guatteo et al., 2008; Hogerwerf, et al., 2011; Rousset et al., 2009). También, el hecho de haber dejado un lote control sin vacunar, pudo servir como fuente de infección para los animales, infravalorando

así el efecto potencial de la vacuna. Sin embargo, a la hora de estudiar la eficacia de la vacunación, es necesario disponer de grupo vacunado y no vacunado, ya que si se hubiera vacunado un rebaño en su totalidad y se hubiera dejado otro rebaño control, los resultados no hubieran sido comparables ya que cada rebaño tiene su propio sistema de manejo, instalaciones diferentes, y niveles distintos de infección.

A pesar de que *a priori* puede parecer que la vacuna no ha sido eficaz, hay que tener en cuenta que tras la primera vacunación, en la inmediata paridera se observó una reducción del porcentaje de abortos, del número de animales eliminadores y de la carga bacteriana excretada. Esto junto con la existencia de seroconversión en el grupo de primas no vacunadas, que indicaba la existencia de una infección activa, hace pensar que la vacuna sí que tuvo cierto efecto protegiendo a los animales susceptibles. Sin embargo, esta reducción se observó también en el grupo de animales no vacunados, por lo que no se puede descartar la posibilidad de una reducción natural de la infección en el transcurso de las parideras, tal y como se ha descrito previamente (Berri et al., 2002).

Respecto a la respuesta serológica inducida por la vacunación solo el 7.5% (3/40) de las primas vacunadas presentaban anticuerpos frente a *C. burnetii* una vez transcurridos 9 meses tras la vacunación, indicando la necesidad de dar recuerdos vacunales debido a la baja persistencia de estos anticuerpos. Esta respuesta también se ha observado en terneros donde los animales que fueron vacunados antes de los 14 meses de edad, eran seronegativos 1 año después de la vacunación (Rodolakis et al., 2009a). Es de destacar que la vacuna empleada en este estudio está compuesta de células enteras de la cepa Nine Mile I, cepa que induce una mayor producción de anticuerpos comparándola con otras cepas de *C. burnetii* (Kazar et al., 1995).

Como se ha mencionado anteriormente, la fiebre Q en humanos es adquirida principalmente por la inhalación de aerosoles contaminados con *C. burnetii*. En diferentes estudios se ha detectado la bacteria en varios tipos de muestras medioambientales recogidas tanto en zonas urbanas como rurales (Kersh et al., 2010; Schulz et al., 2005; Tigertt et al., 1961; Welsh et al., 1958; Yanase et al., 1998). Sin embargo, el presente estudio (estudio 4) representaría la primera ocasión en la que se monitoriza y cuantifica el número de bacterias de *C. burnetii* en el aire en el transcurso de la paridera, tanto en el interior como en el exterior de una explotación ovina desde el momento del parto hasta el final de la lactación. De esta forma la presencia de DNA de *C. burnetii* en los aerosoles muestreados, ha confirmado el alto riesgo de infección que existe a lo largo de la paridera y durante el comienzo de la lactación ya que se encontraron aerosoles positivos 2 meses tras el

comienzo de los partos. Asimismo, la ausencia de aerosoles positivos en uno de los rebaños, destaca la posible influencia que pueden tener las características de las explotaciones, ya que esta explotación tenía mejor ventilación en la nave ya que el aire fluía de un lado al otro de las nuevas instalaciones, además tenía suelo de emparillado, así como separación de las corderas de las madres tras la toma de calostro, a diferencia de la explotación en la que se detectaron aerosoles contaminados con *C. burnetii*, con instalaciones no renovadas, con un sistema de ventilación que consistía en ventanas y puertas que permanecían constantemente cerradas, cama con lecho de paja y acúmulo de estiércol durante largos periodos de tiempo, y amamantamiento natural de las corderas de reposición con sus madres.

Coxiella puede permanecer en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo, por lo que la vacunación debe de aplicarse durante varios años consecutivos. Existe un estudio en el ganado vacuno en el que por lo menos se necesitaron 3 años para suprimir el número de animales eliminadores del rebaño (Camuset y Remmy, 2008). Los mismos resultados fueron obtenidos por David y Cremoux (citado por EFSA, 2010) en el ganado caprino. Un estudio reciente en el que se desarrolla un modelo de predicción para el ganado vacuno (Courcoul et al., 2011), estima que sería necesario un mínimo de 10 años de vacunación para eliminar la infección completamente. En el Estudio 5 se valoró la eficacia de la vacunación durante 4 años en un rebaño ovino altamente infectado. Se partía de un 80% de animales eliminadores de *C. burnetii* en el primer año tras la vacunación, y este porcentaje disminuyó considerablemente el segundo año, llegando a desaparecer la excreción en animales durante el tercer y cuarto año de vacunación. Sin embargo, la bacteria seguía estando presente en el medio ambiente, como lo corroboraron las muestras medioambientales de aerosoles tomadas durante el tercer año y las muestras de polvo recogidas de diferentes superficies sólidas tras el último año de vacunación. La detección de la bacteria en los aerosoles recogidos los dos últimos años de vacunación, bien en el aire o en el polvo de las instalaciones, indica que a pesar de no existir animales excretores, la bacteria sigue presente, por lo que si se dejara de vacunar, la infección podría volver a instaurarse en el rebaño. Por ello estos resultados nos llevan a recomendar la vacunación frente a *Coxiella* durante al menos 5 años.

Para confirmar el significado de los resultados positivos en las muestras medioambientales, se debería de comprobar la viabilidad bacteriana, tal y como han descrito otros autores. Así, se recuperó *Coxiella* a partir de muestras de bazo de ratones que habían sido inoculados con muestras medioambientales recogidas tanto de zonas con actividad primaria como de zonas urbanas (Kersh et al., 2010), indicando la viabilidad de las formas

extracelulares de *C. burnetii* en el medio ambiente. Por lo tanto, no hay que descartar que en nuestro estudio siga persistiendo la bacteria en el interior de las instalaciones ovinas que han soportado un elevado número de animales infectados, y por consiguiente una elevada carga bacteriana.

Es interesante señalar que en el Estudio 5, cuando se recogieron los aerosoles positivos se observó que el viento tenía componente sur y que además la cantidad de precipitaciones acumuladas durante los siete días previos al muestreo de aire era menor. Esta asociación entre dirección del viento y clima seco favoreciendo la generación de aerosoles, ya había sido descrita previamente en brotes de fiebre Q humana (Tissot-Dupont et al., 1999; Tissot-Dupont et al., 2004). Esto podría explicar la detección de aerosoles contaminados en ausencia de infección en los animales muestreados. Por ejemplo, la retirada del estiércol de la nave podría haber generando aerosoles contaminados, aunque también habría que considerar otras fuentes de infección, como podrían ser las poblaciones de ratones domésticos presentes en la explotación, tal y como ha sido constatado en anteriores estudios (Barandika et al., 2007).

El estudio del genotipado de las cepas podrá confirmar si el genotipo que se encuentra en los aerosoles y en otras muestras medioambientales es el mismo que el detectado en los animales en la explotación y también se podrá demostrar si coexisten genotipos diferentes dentro de una misma explotación (Rodolakis y Cochonneau, 2011). En cualquier caso, aunque coexistieran diferentes genotipos en la explotación, esto no afectaría a la eficacia de la vacuna, ya que un estudio experimental llevado a cabo para evaluar si un animal infectado con una cepa de *C. burnetii*, podría reinfectarse con otra cepa diferente, demostró que una infección primaria de *C. burnetii* protege frente a otras cepas, por lo que una vacuna en fase I basada en una determinada cepa, conferirá la suficiente protección frente a nuevas infecciones con cepas diferentes (Rodolakis y Cochonneau, 2011). Este hecho ya se había constatado con una vacuna de células enteras en fase I que generaba una protección cruzada contra diferentes cepas de *C. burnetii* (Ormsbee et al., 1964), sugiriendo que una vacuna que esta compuesta por organismos en fase I de *C. burnetii* puede proveer de una protección completa contra todos los diferentes aislados, por lo que cabe esperar que la vacuna utilizada en este trabajo de tesis debería mostrar la misma eficacia frente a cualquier genotipo presente en el ganado ovino.

En el Estudio 6 se planteó un estudio práctico siguiendo las pautas que los veterinarios aplicarían en el caso de un brote de abortos por fiebre Q en un rebaño ovino. Así, en el rebaño seleccionado se aplicó un doble tratamiento con OTC al final de la gestación para

reducir el número de abortos y la contaminación bacteriana, y se planteó la vacunación en las 3 estaciones reproductivas consecutivas, realizando un seguimiento de la evolución de la infección por *C. burnetii* en el rebaño durante 4 años. Los resultados de la vacunación durante las tres temporadas consecutivas confirman los datos obtenidos en el Estudio 5, en el que se observó que se necesitan un mínimo de 5 años de vacunación para eliminar la bacteria del rebaño y del medio ambiente. Teniendo en cuenta los resultados del estudio 6 en comparación con el estudio 5, se pudo observar que la aplicación de un tratamiento antibiótico a todo el rebaño no conllevó ningún efecto adicional en las sucesivas parideras, en las que se vacunó, ya que no redujo el tiempo de exposición a la infección en el rebaño, por lo que es necesario seguir investigando acerca de nuevas estrategias de tratamiento para el ganado ovino infectado por *C. burnetii*.

En lo referente a combinar otras opciones de control de la fiebre Q con la vacunación, son interesantes los resultados obtenidos en un estudio realizado en una explotación de ganado vacuno en la que se combinó la vacunación con el sacrificio de los animales excretores durante un periodo de 3 años. Así, la combinación del desvieje de los animales positivos y la vacunación logró erradicar la infección por Fiebre Q en 3 años, y se logró mejorar de esta manera la fertilidad del rebaño, desapareciendo los problemas relacionados con metritis y abortos (Camuset y Remmy, 2008). Otras estrategias empleadas han sido la vacunación junto con el sacrificio de animales gestantes y la prohibición temporal de reproducción (Roest et al., 2011b). Estas mismas medidas junto con el tratamiento del estiércol o purines parece que han sido adecuadas para limitar la propagación de *C. burnetii* entre rebaños y para limitar la transmisión a los humanos, tal y como han podido demostrar en el brote de Holanda (Roest et al., 2011b).

Para poder comparar y evaluar la eficacia y la eficiencia de los diferentes métodos de control, es importante destacar qué técnicas diagnósticas se han llevado a cabo en cada estudio, ya que no existe una armonización en cuanto a los métodos de detección de la bacteria. Tampoco se ha desarrollado hasta el momento ninguna técnica DIVA para poder diferenciar entre animales vacunados de animales que han adquirido naturalmente la infección, punto de especial relevancia debido a que se está extendiendo cada vez más el uso de la vacunación frente a la fiebre Q.

En definitiva, el presente estudio ha permitido obtener unos resultados de gran interés en relación a la epidemiología y control de la fiebre Q tanto para la Salud Pública como para la Sanidad Animal. En este sentido, se han actualizado los datos de seroprevalencia de *C. burnetii* en los rumiantes domésticos de la CAPV en régimen semi-extensivo, destacando al

ganado ovino como el principal reservorio de la bacteria y como consecuencia de ello, como principal fuente de transmisión de la fiebre Q. También se ha podido contribuir al conocimiento del ciclo silvestre de la fiebre Q en la CAPV, destacando a los jabalíes, corzos, liebres y aves carroñeras como posibles reservorios de *C. burnetii*. Asimismo, el haber valorado diferentes estrategias de control de la fiebre Q en el ganado ovino, ha permitido tener un conocimiento más preciso de la eficacia de los métodos de control actualmente disponibles, y en consecuencia, saber que actuación sería la más adecuada tras la aparición de un brote de fiebre Q. Así, tal y como se ha presentado a lo largo de esta tesis, creemos conveniente administrar el tratamiento antibiótico tras el diagnóstico de abortos por fiebre Q, tomando a la vez una serie de precauciones para evitar la difusión de *C. burnetii* en el resto del rebaño y su propagación al exterior. La siguiente medida a tomar sería la vacunación a medio-largo plazo, prestando especial atención al grupo de animales jóvenes, es decir, vacunando y revacunando las corderas de reposición a partir de los 3 meses de edad, nuevamente antes de la primera cubrición, así como una dosis de recuerdo anual. Hemos observado que se puede conseguir la reducción de la infección por *C. burnetii* en la población animal, especialmente en las primaras, tras un periodo de vacunación de 2 años, pero dada la alta persistencia de *Coxiella* en el medio, recomendamos vacunar durante al menos 5 años consecutivos, combinando la vacunación junto con medidas de profilaxis, entre las que destacamos la destrucción inmediata de las placentas, un manejo adecuado del estiércol y la desinfección de las instalaciones.

VI. CONCLUSIONES

1. Los resultados del estudio de seroprevalencia frente a *C. burnetii* en los rumiantes domésticos de la CAPV sugieren que el ganado ovino es el principal reservorio de *C. burnetii*, siendo el ganado vacuno y caprino reservorios secundarios. No se ha observado una relación entre el nivel de seroprevalencia y la incidencia de abortos, pero sí un aumento de la seroprevalencia frente a *C. burnetii* en función de la edad.
2. Se han identificado posibles reservorios de *C. burnetii* entre las especies silvestres de la CAPV. Los corzos, jabalíes, liebres y aves carroñeras pueden representar una fuente de infección para el ganado doméstico con el que comparten biotopos, y viceversa. La ausencia de DNA de *C. burnetii* en las garrapatas recogidas de los animales silvestres sugiere que las especies de ixódidos no juegan un papel importante en la transmisión o en el mantenimiento de *C. burnetii* en la CAPV.
3. Tras un brote de abortos por fiebre Q en un rebaño ovino, la infección se distribuye ampliamente en el rebaño, encontrando un porcentaje elevado de animales excretores (38-95%) y seroprevalencias moderadas o altas (35-57%). En la siguiente paridera, se observa una disminución en el porcentaje de abortos pero existe un alto porcentaje de ovejas que paren normalmente y que eliminan grandes cantidades de *C. burnetii* a través de diferentes vías generando una elevada contaminación ambiental.
4. Existen dos rutas predominantes de excreción de *C. burnetii* en el ganado ovino, la vía vaginal y la vía fecal, con mayor excreción bacteriana y eliminaciones en ocasiones persistentes, mientras que la eliminación a través de la leche es intermitente, la excreción bacteriana es menor y de más corta duración. Los animales infectados pueden eliminar la bacteria durante al menos 2 meses a través del moco vaginal, 5 meses a través de las heces y 4 meses a través de la leche.
5. Por vez primera, se ha detectado y cuantificado la presencia de *C. burnetii* en el aire tanto en el interior como en el exterior de las instalaciones ovinas a lo largo del transcurso de la paridera, confirmando el alto riesgo de transmisión de la fiebre Q a los animales susceptibles y a las personas que frecuentan la explotación. Esta situación persiste durante al menos 2 meses, durante el periodo de máxima concentración de partos. El manejo del rebaño y las características de las instalaciones parecen tener un efecto sustancial en disminuir los niveles ambientales de *C. burnetii* presentes así como en reducir el tiempo de circulación de la bacteria.

6. El doble tratamiento con oxitetraciclina aplicado en rebaños ovinos con abortos por fiebre Q no tiene un efecto significativo en la reducción del número de animales eliminadores, en el acortamiento del periodo de excreción bacteriana a través de heces, leche o fluidos vaginales, ni en la reducción de la excreción bacteriana. Tampoco se ha observado un efecto reductor del tratamiento sobre la persistencia de *Coxiella* en la siguiente paridera. Sin embargo, sí que se apreció una reducción del número de abortos tras la primera dosis.
7. La vacunación con la vacuna en fase I en rebaños ovinos altamente infectados no parece tener un efecto significativo en reducir el número de animales eliminadores ni la carga bacteriana excretada tras el primer año post-vacunación. Ello puede ser debido a la amplia difusión de la infección en el rebaño. Sin embargo a partir del segundo año de vacunación los niveles de infección alcanzan niveles mínimos, especialmente en el grupo de primiparas.
8. La vacunación frente a *C. burnetii* debe de considerarse como un método de control a medio-largo plazo, ya que, a pesar de que la infección desaparece en la población animal a partir del tercer año de vacunación, *C. burnetii* permanece en el ambiente durante periodos de tiempo prolongados.

VII. RESUMEN, SUMMARY, LABURPENA

RESUMEN

La fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial causada por *Coxiella burnetii*, una bacteria intracelular capaz de infectar tanto a animales domésticos como silvestres, y que da lugar a abortos y problemas reproductivos. Las principales fuentes de infección a los humanos son el ganado ovino, caprino y bovino, que cuando están infectados eliminan esta bacteria a través de sus productos del parto, de sus fluidos vaginales, leche y heces, generando aerosoles que posteriormente pueden ser inhalados por individuos susceptibles a la infección. Como en muchas otras zoonosis, el control de la fiebre Q en animales influirá sobre la incidencia de dicha enfermedad en humanos, por lo que es importante establecer medidas de control de la infección. Hasta el presente trabajo, se sabía que el ganado ovino era reservorio de *C. burnetii* en la CAPV, sin embargo, la situación en relación al ganado caprino y bovino era desconocida. De igual manera, existían escasos estudios acerca de la prevalencia de *C. burnetii* entre la población de animales silvestres. Asimismo, se desconocía si el tratamiento antibiótico basado en la OTC era eficaz en reducir la infección tras un brote de abortos debidos a fiebre Q. De igual forma, se desconocía la eficacia de la vacunación con una vacuna en fase I en rebaños ovinos infectados naturalmente.

En este sentido, y en primer lugar, se desarrolló un estudio acerca de la seroprevalencia de *C. burnetii* en la CAPV que permitió confirmar que el ganado ovino seguía representando una de las principales fuentes de transmisión de la fiebre Q, con una seroprevalencia a nivel de rebaño del 74%, seguida del ganado caprino (45%) y del ganado bovino (43%) con seroprevalencias individuales del 11.8%, el 8.7% y 6.7% respectivamente. Además, se estudió la importancia del ciclo silvestre de *C. burnetii* en la CAPV, y se detectó DNA de *C. burnetii* en el 5.1% de los corzos, 4.3% de los jabalíes, 9.1% de las liebres, y entre las aves silvestres, el 11% de los buitres y el 14% de los milanos negros, indicando que estas especies podrían actuar como reservorios así como especies centinela de brotes de fiebre Q. Las garrapatas recogidas de las especies analizadas fueron negativas por PCR, sugiriendo que los ixódidos no representan un papel importante en la transmisión de *C. burnetii*.

Debido a la alta seroprevalencia de *C. burnetii* hallada en el ganado ovino en la CAPV, se llevaron a cabo diferentes estudios con el objetivo de evaluar las diferentes opciones de control de la fiebre Q en rebaños ovinos infectados. De esta manera, se comprobó la eficacia del tratamiento antibiótico con oxitetraciclina en un rebaño ovino infectado y se observó que este tratamiento no reducía el tiempo de eliminación de la bacteria ni el número de animales eliminadores, ni la carga bacteriana excretada, aunque sí se apreció un descenso del número de abortos. Tampoco se observó ningún efecto residual de la OTC en la siguiente paridera. Además, este estudio reflejó que la principal vía de

eliminación de *C. burnetii* en el ganado ovino era a través de los fluidos vaginales y de las heces, y en menor medida en leche, siendo en la leche la eliminación esporádica y concentrada sobre todo en el primer mes tras el parto, mientras que la excreción vaginal y fecal era más prolongada. Además, se cuantificó la cantidad de *C. burnetii* presente en el aire tanto en el interior como en el exterior de las instalaciones a lo largo del transcurso de la paridera, confirmando el alto riesgo de transmisión de la fiebre Q a animales susceptibles y a personas que frecuentan la explotación.

Por otra parte, se planteó estudiar la eficacia de la vacunación en rebaños ovinos infectados naturalmente. La vacuna había mostrado buenos resultados en proteger animales susceptibles no infectados. Tras vacunar cuatro rebaños ovinos diferentes, dejando un grupo control sin vacunar para comprobar la eficacia de la vacuna, se observó que tras el primer año de vacunación se produjo una reducción en el porcentaje de abortos, en el número de animales eliminadores y en la carga bacteriana excretada. Además, la existencia de seroconversión en los animales no vacunados indicaba la existencia de una infección activa lo que hace pensar que la vacuna podría haber tenido cierto efecto protegiendo a animales susceptibles. Sin embargo, esta reducción se observó también en el grupo de animales no vacunados, por lo que no se podía descartar la posibilidad de una reducción natural de la infección, tal y como se ha descrito previamente. Al observar que a corto plazo la vacuna parecía no tener un efecto significativo, ya que no existieron diferencias significativas en la reducción del número de animales eliminadores ni en la excreción bacteriana entre los animales vacunados y los control, se estudió la eficacia de la vacunación tras un periodo de 4 años en un rebaño ovino infectado. Tras un alto porcentaje de animales eliminadores de *C. burnetii* en la primera paridera, este porcentaje disminuyó considerablemente el segundo año post vacunación, llegando a desaparecer la excreción en animales durante el tercer y cuarto año de vacunación. Sin embargo, la bacteria seguía estando presente en el medio ambiente, como lo corroboraron los aerosoles tomados durante el tercer año y las muestras de polvo recogidas de diferentes superficies sólidas el último año de vacunación, sugiriendo que al menos son necesarios 5 años de vacunación para reducir la infección ambiental por *C. burnetii* a niveles mínimos.

Por lo tanto, podemos concluir que *C. burnetii* esta presente tanto en el ciclo doméstico como en el silvestre de la CAPV, siendo el ganado ovino una importante fuente de transmisión de la bacteria. Asimismo, se destaca el papel de los jabalíes, corzos, liebres y aves carroñeras como posibles reservorios. Con este estudio se dispone de una mayor información acerca de las diferentes estrategias de control frente a la fiebre Q que se podrán llevar a cabo en caso de la aparición de un brote de fiebre Q en un rebaño ovino.

SUMMARY

Q fever is a zoonosis caused by *Coxiella burnetii*, an intracellular bacterium that affects domestic and wild animals and causes abortion and reproductive problems in ruminants. The main sources of *C. burnetii* infection are cattle, sheep and goats. The most important route of human Q fever infection is inhalation of contaminated aerosols or dust containing *C. burnetii* shed by infected animals, mainly at parturition when infected females shed great numbers of bacteria through birth products, vaginal mucus, milk and faeces. As is the case for many other zoonoses, control of Q fever in animals will influence the incidence of this disease in humans, highlighting the importance of the implementation of adequate control options to reduce human infection risk. At the time this work started, sheep were considered to be an important source of Q fever infection in the Basque Country, but there was a lack of information on the status of *C. burnetii* infection in cattle and goats in the region. Also, little was known about the prevalence of *C. burnetii* in wildlife in the Basque Country. Regarding control methods, antibiotic treatment with oxitetracycline (OTC) had been used to reduce the number of abortions by *C. burnetii* in sheep, but its efficacy in decreasing the rate of infection after a *C. burnetii* outbreak had not been accurately assessed. Similarly, no data were available concerning the efficacy of an inactivated phase I vaccine in highly naturally infected sheep flocks.

In this PhD Thesis, a serological study was conducted with the aim of investigating the seroprevalence of *C. burnetii* in livestock in the Basque Country. Results confirmed that sheep are the main source of infection with a herd seroprevalence of 74%, followed by goats (45%) and cattle (43%); average individual *C. burnetii* seroprevalence observed was 11.8%, 8.7% and 6.7% in sheep, goats and cattle, respectively. To investigate the role of wildlife, a molecular survey was conducted to estimate the distribution and incidence of *C. burnetii* infection in wildlife in the Basque Country. *C. burnetii* DNA was detected in 5.1% of roe deer, 4.3% of wild boar, 9.1% of hares; and, among wild birds, in 11% of vultures and 14% black kites. These species should therefore be considered as potential sources of infection and could also act as sentinel for the presence of infection foci. All the adult ticks analyzed were negative for *C. burnetii*, suggesting that ticks do not play an important role in the transmission of *C. burnetii* in this area.

Due to the high seroprevalence of *C. burnetii* found in sheep flocks in the Basque Country, several studies were conducted with the purpose of evaluating the different options available to control Q fever in highly infected sheep flocks. With this purpose, the efficacy of antibiotic treatment with OTC in an infected dairy sheep flock was assessed. Results showed that OTC did neither prevent the shedding of *C. burnetii* nor limited the duration of bacterial excretion. In addition, OTC did not reduce the bacterial load excretion and no beneficial

residual effect in the next lambing season was observed in terms of reducing or eliminating bacterial excretion in previously treated ewes. Nevertheless, a decrease in the number of abortions was observed. In addition, this study showed that the main routes of *C. burnetii* shedding in sheep were vaginal discharges and faeces, and to a lesser extent, milk. Whereas shedding through milk was sporadic and concentrated during the first month after parturition, vaginal and faecal shedding continued for longer.

A further study was designed to assess the efficacy of vaccination in highly naturally-infected sheep flocks. Animal vaccination was proposed due to the good results reported elsewhere in preventing shedding in non-infected susceptible animals. One year after vaccination of four sheep flocks (including a non-vaccinated control group in each flock) with a phase I vaccine, a reduction was observed in the percentage of abortions, in the number of shedders and in the bacterial mean load. Besides, the seroconversion of non-vaccinated young animals indicated the existence of an active infection, suggesting that the vaccine could have had a possible effect in protecting susceptible animals. A similar reduction was nevertheless also observed in the group of unvaccinated animals, so that the possibility of a natural self-limitation of the infection could not be discarded, as it has been described before. Since vaccination during a single year did not show a significant effect in reducing the number of shedders and the bacterial load excreted, a four-year vaccination scheme was designed and evaluated on a highly naturally infected flock. The high percentage of animal shedders found during the first year of vaccination decreased considerably in the second year and shedding completely disappeared in the last two years of the vaccination programme. However, *C. burnetii* was still present in the environment after completion of the four-year vaccination programme since air samples collected during the third year and dust samples taken from solid surfaces during the last year tested positive. These results would suggest that at least five years of vaccination are needed to reduce environmental contamination with *C. burnetii* to minimum levels.

In summary, it can be concluded that *C. burnetii* is involved both in the domestic and the wild cycles in the Basque Country, being sheep one of the most important reservoirs for *C. burnetii* in this region. It is also noteworthy the role of wild boar, roe deer, hares and carrion wild birds as potential reservoirs of *C. burnetii*. Finally, this study has provided valuable information on different strategies for Q fever infection control that could be implemented in case of an outbreak of Q fever in a sheep flocks in order to limit economic losses and reduce risk for human infection.

LABURPENA

Q sukarra mundu osoan zehar zabaldurik dagoen zoonosi bat da eta *Coxiella burnetii* deritzon zelula barneko bakterio batek eragiten du gaixotasuna. Etxeko animaliak zein animalia basatiak infektatzeko gai da, abortu eta ugalketa arazoak eraginez. Gizakiarentzat infekzio iturri nagusia ardi, ahuntz eta behi aziendek osatzen dute, izan ere, hauek infektaturik aurkitzen badira, bakterioa kanporatzen dute erditze produktuekin batera, baginako fluidoekin, esnea zein gorotzen bitartez, aerosolak sortuz eta arnasten duten indibiduo sentiberak infektatuz.

Beste hainbat gaixotasun zoonotikorekin gertatzen den moduan, animaliangan egiten den Q sukarra-erikiko kontrolak eragina izango du gaixotasun honek gizakiarengan izan dezakeen agerrerak, beraz garrantzitsua da infekzioarekiko kontrol neurriak ezartzea.

Lan hau burutu den arte, ardi-aziendek *C. burnetii*-ren gordailu gisa jokatzeko dutela jakina zen Euskal Autonomia Erkidego-an, hala ere, ahuntz eta behi azienden egoera ezezaguna zen. Halaber, animalia basatiengan *C. burnetii*-ren prebalentziari buruzko ikerketa gutxi ezagutzen ziren. Gainera, Q sukarrak eragindako abortu-agerraldi baten aurrean, oxitetraziklina (OTC) botika bidezko tratamendua eraginkorra ote zen ez zegoen garbi. Era berean, naturalki infektaturiko ardi-aziendarengan, I fase-ko txertoaren eragina ezezaguna zen.

Era honetara, lehenik eta behin, Euskal Autonomia Erkidego-an *C. burnetii*-ren seroprebalentzia jakiteko ikerketa burutu zen, ardi-aziendak Q sukarra-ren transmisio iturri nagusi gisa jokatzeko jarraitzen zuela egiaztatuz. Ardi-aziendarengan %74-eko seroprebalentzia detektatu zen, eta baxuagoa izan zen ahuntz (%45) eta behi (%43) aziendengan. Seroprebalentzia indibidualak %11,8, %8,7 eta %6,7-koak izan ziren hurrenez hurren.

Gainera, *C. burnetii*-k Euskal Autonomia Erkidego-an ziklo basatiarengan izan dezakeen garrantzia ere aztertu zen eta *C. burnetii*-ren ADN-a aurkitu zen orkatz (%5,1), basurde (%4,3), erbi (%9,1) eta hegaztia basatien artean, sai erre (%11) eta miru beltzengan (%14). Eraitza hauek aditzera ematen dute espezie hauek Q sukarra-ren agerraldietan gordailu zein zentinelak gisa joka dezaketela. Animalia hauengan jasotako akainak PCR bitartez aztertu ondoren emaitza guztiak negatibo izan ziren, beraz ixodidoek Q sukarra transmititzeko orduan paper garrantzitsua jokatzeko ez dutela iradoki zen.

Euskal Autonomia Erkidego-ko ardi-aziendengan aurkitutako seroprebalentzia altua ikusita, zenbait ikerketa burutu ziren infektatutako ardi-aziendengan Q sukarra-ren agerrera kontrolatzeko aukera ezberdinak aztertuz. Era honetara, OTC botika bidezko tratamendu baten eraginkortasuna frogatu zen infektaturiko ardi-azienda batengan eta zera ikusi zen: tratamenduak ez zuela bakterioaren kanporatze denbora gutxiagotzen, ez zela animalia

kanporatzaileen kopurua murrizten, ezta kanporatutako bakterio karga ere, baina abortu kopurua txikiagoa izan zen. Bestalde, ez zen OTC-aren hondakinik antzeman hurrengo erditzean. Gainera ikerketa honek erakutsi zuen ardi-aziendengan *C. burnetii*-ren kanporaketa fluido baginal eta gorotzen bitartez gertatzen zela batipat eta neurri txikiago batean esnearekin. Esnearen bitartez emandako kanporaketa esporadikoa eta erditze ondorengo lehenengo hilabetean kontzentratua egongo litzateke, bestalde bagina zein gorotzen bidezko kanporaketa denboran luzeagoa litzateke. Gainera, erditze garaian zehar *C. burnetii*-ren kantitatea kuantifikatu zen, bai airean eta baita instalazioen barne nahiz kanpoaldean. Animalia sentibera nahiz esplotazioan sarri ibiltzen diren pertsonak, Q sukarra-ren transmisio arrisku altua zutela baieztatu zen.

Bestalde, naturalki infektaturiko ardi-aziendengan txertoaren eraginkortasuna ikertzea planteatu zen. Txertoak emaitza onak eman zituen infektatu gabeko animalia sentiberak babesterakoan. Lau ardi-azienda ezberdin txertatu ziren eta bakoitzean, txertoaren efikazia baieztatzeko kontrol gisa jokatu zuen txertatu gabeko talde bat aukeratu zen. Txertatu eta handik urte batera abortuen portzentaia jeitsi zela ikusi zen, baita animalia kanporatzaileen kopurua eta kanporatutako bakterio karga ere bai. Gainera, txertatu gabeko animaliangen serokonbertsioa gertatu zen. Honek, infekzio aktibo bat zegoela adierazten zuen eta txertoak nolabaiteko babes efektuaren bat euki zezakeela pentsatu zen, animalia sentiberak babestuz. Hala ere, murrizpen hauek txertatu gabeko animaliangen ere ikusi ziren, naturalki gertatutako infekzioaren murrizpen bat denik ezin delarik baztertu, aurretik deskribatu den moduan. Txertoak epe laburrera efektu esanguratsurik ez zuela antzeman zen, ez bait zen ezberdintasun adierazgarririk ikusi animalia kanporatzaileen kopuruaren murrizpenean, ezta txertatutako zein kontrol gisa jokatzeko zuten animalien arteko bakterioen kanporaketan. Horregatik txertoaren efikazia 4 urteren buruan ikertu zen infektaturiko ardi-azienda batengan. Lehenengo erditze garaian *C. burnetii* kanporatzen zuten animalien portzentaia altua zen, baina neurri handi batean portzentaia hau murriztu zen txertatu eta handik bi urtetara, 3. eta 4. urteetan animalien eskrezioa desagertzea iritsi zelarik. Dena den, bakterioak ingurumenean egoten jarraitzen zuela baieztatu zen, 3. urtean zehar jasotako aerosolek eta txertoa jarri zen azken urtean, azalera solidoetan hartutako hauts laginak aztertu ondoren. Honela, gutxienez 5 urteren buruan txertoa jarri behar dela iradoki zen, *C. burnetii*-ren infekzioa ingurumenean maila baxuenetara murrizteko.

Beraz, Euskal Autonomia Erkidego-an, *C. burnetii* etxeko ziklo nahiz basatian aurkitzen dela ondorioztatu dezakegu, ardi-azienda bakterio honen transmisio iturri garrantzitsua izanik. Gainera, basurde, orkatz, erbi eta hegaztia harrapakarien papera azpimarragarria da, gordailu gisa jokatu dezaketen eina. Ikerketa honek, informazio handia eskaintzen du ardi-azienda batengan Q sukarra-ren agerreraren aurrean, aurka egiteko kontrol estrategia ezberdinak eskainiz.

VIII. ANEXOS

**ANEXO I: ENVÍO DEL ARTÍCULO 6 A LA REVISTA "THE VETERINARY JOURNAL"
(03/11/2011)**

-----Mensaje original-----

De: ees.ytvjl.0.14f176.fabe33c2@eesmail.elsevier.com
[mailto:ees.ytvjl.0.14f176.fabe33c2@eesmail.elsevier.com] En nombre de TVJL
Enviado el: jueves, 03 de noviembre de 2011 18:20
Para: agarcia@neiker.net
Asunto: Submission Confirmation for The Veterinary Journal

Title: EVALUATION OF THE EFFICACY OF OXYTETRACYCLINE TREATMENT FOLLOWED BY VACCINATION AGAINST Q FEVER IN A HIGHLY INFECTED SHEEP FLOCK

Dear Ms Garcia-Perez,

Your submission has been received by the journal The Veterinary Journal. You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/ytvjl/>

Username: Your username is: u0889aga

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Editorial Office Staff
The Veterinary Journal

-----Mensaje original-----

De: ees.ytvjl.0.16a2ae.9a145699@eesmail.elsevier.com
[mailto:ees.ytvjl.0.16a2ae.9a145699@eesmail.elsevier.com] En nombre de TVJL
Enviado el: jueves, 19 de enero de 2012 18:43
Para: agarcia@neiker.net
Asunto: Revision Confirmation for YTVJL-D-11-00986R2

Ms. No. YTVJL-D-11-00986R2

EVALUATION OF THE EFFICACY OF OXYTETRACYCLINE TREATMENT FOLLOWED BY VACCINATION AGAINST Q FEVER IN A HIGHLY INFECTED SHEEP FLOCK

Dear Ms Garcia-Perez,

Thank you for the revised version of your submission to the journal The Veterinary Journal.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/ytvjl/>

Username: Your username is: u0889aga

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Kind regards,
Editorial Office Staff
The Veterinary Journal

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, T., Yamaki, K., Hayakawa, T., Fukuda, H., Ito, Y., Kume, H., Komiya, T., Ishihara, K., Hirai, K., 2001. A seroepidemiological study of the risks of Q fever infection in Japanese veterinarians. *Eur. J. Epidemiol.* 17, 1029-1032.
- Abinanti, F.R., Welsh, H.H., Winn, J.F., Lennette, E.H., 1955. Q fever studies. XIX. Presence and epidemiologic significance of *Coxiella burnetii* in sheep wool. *Am. J. Hyg.* 61, 362-370.
- Adesiyun, A.A., Jagun, A.G., Tekdek, L.B., 1984. *Coxiella burnetii* antibodies in some Nigerian dairy cows and their suckling calves. *Int. J. Zoonoses* 11, 155-160.
- Adesiyun, A.A., Jagun, A.G., Kwaga, J.K., Tekdek, L.B., 1985. Shedding of *Coxiella burnetii* in milk by Nigerian dairy and dual purposes cows. *Int. J. Zoonoses.* 12, 1-5.
- Adesiyun, A.A., Cazabon, E.P., 1996. Seroprevalences of brucellosis, Q fever and toxoplasmosis in slaughter livestock in Trinidad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 49, 28-30.
- Agger, J.F.; Christoffersen, A.B., Rattenborg, E., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 52, 5.
- Aguirre, C., Montejo, M., Hernández, J.L., de la Hoz, C., Marnez, E., Villate, J.L., Sobradillo, V., 1984. An outbreak of Q fever in the Basque country. *Can. Med. Assoc. J.* 131, 48-49.
- Akporiaye, E.T., Baca, G., 1983. Superoxide anion production and superoxide dismutase and catalase activities in *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 154, 520-523.
- Alsaleh, A., Pellerin, J.L., Rodolakis, A., Larrat, M., Cochonneau, D., Bruyas, J.F., Fieni, F., 2011. Detection of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in oviducts and uterine flushing media and in genital tract tissues of the non pregnant goat. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 355-360.
- Amano, K., Williams, J.C., McCaul, T.F., Peacock, M.G., 1984. Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnetii* cell wall and peptidoglycan-protein complex fractions. *J. Bacteriol.* 160, 982-988.
- Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 2004. Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. *Microbiol. Immunol.* 48, 971-975.
- Andoh, M., Zhang, G., Russell-Lodrigue, K.E., Shive, H.R., Weeks, B.R., Samuel, J.E., 2007. T cells are essential for bacterial clearance, and gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and B cells are crucial for disease development in *Coxiella burnetii* infection in mice. *Infec. Immun.* 75, 3245-3255.
- Angelakis, E., Raoult, D., 2009. Q fever. *Vet. Microbiol.* 140, 297-309.
- Aparicio-Garrido, J., Echevarría, V., Salinas, V.M., 1970. Contribución al estudio de la fiebre Q y de la fiebre botonosa en España. *Rev. Diag. Biol.* 19, 447-456.
- Armengaud, A., Kessalis, N., Desenclos, J.C., Maillot, E., Brousse, P., Brouqui, P., Tixier-Dupont, H., Raoult, D., Provencal, P., Obadia Y., 1997. Urban outbreak of Q fever, Briançon, France, March to June 1996. *Euro. Surveill.* 2, 12-13.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003a. Excretion of *Coxiella burnetii* during an experimental infection of pregnant goats with an abortive goat strain CbC1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 524-526.
- Arricau-Bouvery N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003b. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet. Res.* 34, 423-433.

- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G., 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 6, 38.
- Astobiza, I., Aduriz, G., Atxaerandio, R., Barandika, J.F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2007. Estimación de la prevalencia de *Coxiella burnetii* en ganado ovino por métodos serológicos y moleculares. XII Simposio de AVEDILA. Bilbao. España.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *Vet. J.* 184, 172-175.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011a. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res. Vet. Sci.* 91, e58-e63.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011b. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7405-7407.
- Astobiza, I., Ruiz-Fons, F., Piñero, A., Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2011c. Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *J. Dairy Sci.* (aceptado).
- Ausina, V., Sambeat, M.A., Esteban, G., Luquín, M., Condom, M.J., Rabella, N., Ballester, F., Prats, G., 1988. Seroepidemiological study of Q fever in urban and rural areas in Catalonia. *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* 6: 95-101.
- Ayres, J.G., Flint, N., Smith, E.G., Tunnicliffe, W.S., Fletcher, T.J., Hammond, K., Ward, D., Marmion, B.P., 1998. Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *QJM.* 91, 105-123.
- Babudieri, B., 1959. Q fever: a zoonosis. *Adv. Vet. Sci.* 5, 182.
- Baca, O.G., Paretsky, D., 1983. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol. Rev.* 47, 127-149.
- Banazis, M.J., Bestall, A.S., Reid, S.A., Fenwick, S.G., 2010. A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. *Vet. Microbiol.*, 143, 337-345.
- Barandika, J.F., Berriatua, E., Barral, M., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2006. Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. *Med. Vet. Entomol.* 20, 177-188.
- Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Esteban, C., Gil, H., Escudero, R., Barral, M., Jado, I., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6166-6171.
- Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 829-835.

- Barandika, J.F., Olmeda, S.A., Casado-Nistal, M.A., Hurtado, A., Juste, R.A., Valcárcel, F., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2011. Differences in questing tick species distribution between Atlantic and continental climate regions in Spain. *J. Med. Entomol.* 48, 13-9.
- Bartolomé, J., Marín, A., Lorente, S., Heredero, E., Crespo, M.D., 2004. Fiebre Q aguda: 35 casos en Castilla-La Mancha. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22, 292-294.
- Bartolomé, J., Riquelme, E., Hernández-Pérez, N., García-Ruiz, S., Lujan, R., Lorente, S., Medrano-Callejas, R., Crespo, M.D., 2007. Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* infection among blood donors in Albacete. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25, 382-386.
- Bartolomé-Álvarez, J., Robles-Fonseca, L., Vicente-Romero, M.R., Crespo-Sánchez, M.D., 2010. Relationship between publications on non-gastrointestinal bacterial zoonoses and the incidence of the diseases in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28,651-660
- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S.G., Dubovi, E., Schukken, Y., 2008. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.* 39, 23.
- Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A., 2006. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J. Bacteriol.* 188, 2309-2324.
- Behymer, D.E., Biberstein, E.L., Riemann, H.P., Franti, C.E., Sawyer, M., Ruppanner, R., Crenshaw, G.L., 1976. Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle: challenge of immunity after vaccination. *Am. J. Vet. Res.* 37, 631-634.
- Behymer, D., Ruppanner, R., Riemann, H.P., Biberstein, E.L., Franti, C.E., 1977. Observation on chemotherapy in cows chronically infected with *Coxiella burnetii* (Q fever). *Folia Vet. Lat.* 7, 64-70.
- Benson, W.W., Brock, D.W., Mather, J., 1963. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a Q fever infected herd. *Public Health Rep.* 78, 707-710.
- Bernasconi, M.V., Casati, S., Peter, O., Piffaretti, J.C., 2002. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect. Genet. Evol.* 2, 111-120.
- Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A., 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.* 72, 285-293.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet. Rec.* 148, 502-505.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A., 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet. Microbiol.* 85, 55-60.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J.L., Arricau-Bouvery, N., Russo, P., Pepin, M., Rodolakis, A., 2003. Ovine manure used a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. *Vet. Rec.* 153, 269-270.
- Berri, M., Crochet, D., Santiago, S., Rodolakis, A., 2005a. Spread of *Coxiella burnetii* infection in a flock of sheep after an episode of Q fever. *Vet. Rec.* 157, 737-740.
- Berri, M., Rousset, E., Hechard, C., Champion, J.L., Dufour, P., Russo, P., Rodolakis, A., 2005b. Progression of Q fever and *Coxiella burnetii* shedding in milk after an outbreak of enzootic abortion in a goat herd. *Vet. Rec.* 156, 548-549.

- Berri, M., Rousset, E., Champion, J.L., Russo, P., Rodolakis, A., 2007. Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. Res. Vet. Sci. 83, 47-52.
- Biberstein, E.L., Behymer, D.E., Bushnell, R., Crenshaw, G., Riemann, H.P., Franti, C.E., 1974. A survey of Q fever (*Coxiella burnetii*) in California dairy cows. Am. J. Vet. Res. 36, 781-784.
- Biberstein, E.L., Riemann, H.P., Franti, C.E., Behymer, D.E., Ruppanner, R., Bushnell, R., Crenshaw, G., 1977. Vaccination of dairy cattle against Q fever (*Coxiella burnetii*): results of field trials. Am. J. Vet. Res. 38, 189-193.
- Binninger, C.E., Beecham, J.J., Thomas, L.A., Winward, L.D., 1980. A serologic survey for selected infectious diseases of black bears in Idaho. J. Wildl. Dis. 16, 423-430.
- Blancou, J., 1983. Serologic testing of wild roe deer (*Capreolus capreolus* L.) from the Trois Fontaines forest region of eastern France. J. Wildl. Dis. 19, 271-273.
- Bolaños, M., Santana, O.E., Angel-Moreno, A., Pérez-Arellano, J.L., Limiñana, J.M., Serra-Majem, L., Martín-Sánchez, A.M., 2003a. Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). Eur. J. Epidemiol. 18, 259-262.
- Bolaños, M., Santana, O.E., Pérez-Arellano, J.L., Angel-Moreno, A., Moreno, G., Burgazzoli, J.L., Martín-Sánchez, A.M., 2003b. Q fever in Gran Canaria: 40 new cases. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 21, 20-23.
- Boni, M., Davoust, B., Tissot-Dupont, H., Raoult, D., 1998. Survey of seroprevalence of Q fever in dogs in the southeast of France, French Guyana, Martinique, Senegal and the Ivory Coast. Vet. Microbiol. 64, 1-5.
- Bosnjak, E., Hvass, A.M.S.W., Villumsen, S., Nielsen, H., 2010. Emerging evidence for Q fever in humans in Denmark: role of contact with dairy cattle. Clin. Microbiol. Infect. 16, 1285-1288.
- Botros, B.A., Soliman, A.K., Salib, A.W., Olson, J., Hibbs, R.G., Williams, J.C., Darwish, M., el Tigani, A., Watts, D.M., 1995. *Coxiella burnetii* antibody prevalences among human populations in north-east Africa determined by enzyme immunoassay. J. Trop. Med. Hyg. 98, 173-178.
- Böttcher, J., Vossen, A., Janowetz, B., Alex, M., Gangl, A., Randt, A., Meier, N. 2011. Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd. Vet. Microbiol. 151, 291-300.
- Brezina, R., 1958. Contribution to the study of phase variation in *Coxiella burnetii*. Acta virol. 2, 91-102.
- Brooks, D.L., Ermel, R.W., Franti, C.E., Ruppanner, R., Behymer, D.E., Williams, J.C., Stephenson, E.H., 1986. Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. Am. J. Vet. Res. 47, 1235-1238.
- Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J., 1996. A dog-related outbreak of Q fever. Clin. Infect. Dis. 23, 753-755.
- Cabassi, C.S., Taddei, S., Donofrio, G., Ghidini, F., Piancastelli, C., Flammini, C.F., Cavarani, S., 2006. Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. New Microbiol. 29, 211-214.
- Cairns, K., Brewer, M., Lappin, M.R., 2007. Prevalence of *Coxiella burnetii* DNA in vaginal and uterine samples from healthy cats of north-central Colorado. J. Feline Med. Surg. 9, 196-201.
- Camuset, P., Remmy, D., 2008. Q Fever (*Coxiella burnetii*) Eradication in a Dairy Herd by Using Vaccination with a Phase 1 Vaccine. XXV World Buiatrics Congress, Budapest, Hungría. pp 80-81.

- Cantas, H., Muwonge, A., Sareyyupoglu, B., Yardimci, H., Skjerve, E., 2011. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Vet. Res.* 17, 7-13.
- Capuano, F., Landolfi, M.C., Monetii, D.M., 2001. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Vet. Rec.* 149, 669-671.
- Capuano, F., Perugini, A.G., Parisi, A., Montagna, C.O., Nilvelli, M., 2004. Improved detection of *Coxiella burnetii* in cows milk by immunomagnetic separation and PCR. *Vet. Res. Communications* 28, 279–282.
- Carballedo, A.D., Olmeda, S.A., Díez de Tejada Martín, P., Jado, I., Díez, A., Blanco, J., Anda, P., 2008. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in ruminants from central Spain. 5th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Marsella, Francia. pp 60.
- Cardeñosa, N., Sanfeliu, I., Font, B., Muñoz, T., Nogueras, M.M., Segura, F., 2006. Short report: seroprevalence of human infection by *Coxiella burnetii* in Barcelona (northeast of Spain). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 33-35.
- Carrieri, M.P., Tissot-Dupont, H., Rey, D., Brousse, P., Renard, H., Obadia, Y., Raoult, D., 2002. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 17-21.
- Casadevall, A., Pirofsky, L.A., 2006. A reappraisal of humoral immunity based on mechanisms of antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Adv. Immunol.* 91, 1-44.
- Castillo, L., Fernández-Llario, P., Carranza-Almansa, J., Bermejo, F., Hermoso de Mendoza, J., 2010. First seropositive cases of *Coxiella burnetii* in red deer populations in the southwest Iberian peninsula. *J. Zoo Wildl. Med.* 41, 468-73.
- Cekani, M., Papa, A., Kota, M., Velo, E., Berxholi, K., 2008. Report of a serological study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Albania. *Vet. J.* 175, 276–278.
- Cetinkaya, B., Kalender, H., Ertas, H.B., Muz, A., Arslan, N., Ongor, H., Gurcay, M., 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet. Rec.* 146, 131–136.
- Cerf, O., Condrón, R., 2006. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol. Infect.* 134, 946-951.
- Chmielewski, T., Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Podsiadly, E., Thiéry, R., Tylewska-Wierzbanowska, S., 2009. Molecular epidemiology of Q fever in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 58, 9-13.
- Chomel, B.B., Belotto, A., Meslin, F.X., 2007. Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 6-11.
- Cilla, G., Montes, M., Perez-Trallero, E., 2008. Q fever in the Netherlands - what matters is seriousness of disease rather than quantity. *Euro Surveill.* 13. pii: 18975; author reply pii 18976.
- Cisterna, R., 1983. Epidemiología de la infección por *Coxiella burnetii*. Rodríguez Torres A. Ed. *Microbiología* 83, 54-64.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J., Heinzen, R.A., 2004. Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation. *J. Bacteriol.* 186, 7344-7352.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Cockrell, D.C., Voth, D.E., Howe, D., Mead, D.J., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., 2007. Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms. *Infect. Immun.* 75, 290-298.

- Cooper, A., Hedlefs, R., McGowan, M., Ketheesan, N., Govan, B., 2011. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in beef cattle in Queensland. *Aust. Vet. J.* 89, 260-264.
- Cordero del Campillo, Castañón L., Reguera, A., 1994. Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. Universidad de León. León.
- Cour, M.I., González, M.C., González, S., Palau, L., González, C., Ferro, A., 1990. *Coxiella burnetii*: serologic study in various populations. *An. Med. Interna* 7, 513-516.
- Courcoul, A., Hogerwerf, L., Klinkenberg, D., Nielen, M., Vergu, E., Beaudeau, F., 2011. Modelling effectiveness of herd level vaccination against Q fever in dairy cattle. *Vet. Res.* 42, 68.
- Cutler, S.J., Bouzid, M., Cutler, R.R., 2007. Q fever. *J. Infect.* 54, 313-318.
- Czaplicki, G., Houtain, J.Y., Mullender, C., Porter, S.R., Humblet, M.F., Manteca, C., Saegerman, C., 2011. Apparent prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk from dairy herds in southern Belgium. *Vet. J. Sep 29*. [Epub ahead of print]
- de Bruin, A., de Groot, A., de Heer, L., Bok, J., Wielinga, P. R., Hamans, M., van Rotterdam, B. J., Janse, I., 2011. Detection of *Coxiella burnetii* in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6516-6523.
- de los Ríos-Martína, R., Sanz-Moreno, J.C., Martín-Martínez, F., Tébar-Betegón, M.A., Cortés-García, M., Escudero-Nieto, R., 2006. Brote de fiebre Q en un área urbana asociado a la visita a una granja-escuela. *Med. Clin.* 126, 573-575.
- Delay, P.D., Lennette, E.H., Deome, K.B., 1950. Q fever in California; recovery of *Coxiella burnetii* from naturally-infected air-borne dust. *J. Immunol.* 65, 211-220.
- Delsing, C.E., Kullberg, B.J., 2008. Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. *Neth. J. Med.* 66, 365-367.
- Deringer, J.R., Chen, C., Samuel, J.E., Brown, W.C., 2011. Immunoreactive *Coxiella burnetii* Nine Mile proteins separated by 2D electrophoresis and identified by tandem mass spectrometry. *Microbiology.* 157, 526-542.
- Derrick, E.H., Smith, D.J.W, Brown, H.E., 1939. The role of the Bandicoot in the epidemiology of Q fever: a preliminary study. *Med. J. Aust.* 1, 150-155.
- Derrick, E.H., 1973. The course of infection with *Coxiella burnetii*. *Med. J. Aust.* 1, 1051-1057.
- Dyer, R.E., 1949. Q fever; history and present status. *Am. J. Public Health Nations Health* 39, 471-477.
- Dong, J., Olano, J.P., McBride, J.W., Walker, D.H., 2008. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics. *J. Mol. Diagn.* 10, 185-197.
- Dorko, E., Pilipčinec, E., Rimárová, K., Kostovčíková, J., 2010. Serological study of Q fever in sheep in the territory of Eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 17, 323-325.
- Dubuc-Forfait, C., Rousset, E., Champion, J.L., Marois, M., Dufour, P., Zerhaoui, E., Thiery, R., Sabatier, P., 2009. Approach for *Coxiella burnetii* shedding risk assessment in dairy goat herds in south-east of France. *Epidemiologie et Sante Animale*, 55, 117-136.
- Dupuis, G., Petite, J., Péter, O., Vouilloz, M. 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *Int. J. Epidemiol.* 16, 282-287.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on Q fever. *EFSA Journal* 8, 1595.

- Ejercito, C.L., Cai, L., Htwe, K.K., Taki, M., Inoshima, Y., Kondo, T., Kano, C., Abe, S., Shirota, K., Sugimoto, T., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Minamoto, N., Kinjo, T., Isogai, E., Hirai, K., 1993. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in wild animals in Japan. J. Wildl. Dis. 29, 481-484.
- Enright, J.B., Sadler, W.W., Thomas, R.C., 1957. Thermal inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to pasteurization of milk. Public Health Monogr. 47, 1-30.
- Enright, J.B., Franti, C.E., Behymer, D.E., Longhurst, W.M., Dutson, V.J., Wright, M.E., 1971a. *Coxiella burnetii* in a wildlife-livestock environment. Distribution of Q fever in wild mammals. Am. J. Epidemiol. 94, 79-90.
- Enright, J.B., Longhurst, W.M., Wright, M.E., Dutson, V.J., Franti, C.E., Behymer, D.E., 1971b. Q-fever antibodies in birds. J. Wildl. Dis. 7, 14-21.
- Eustat: Basque Statistics Institute.
<http://www.eustat.es/bancopx/spanish/Economía/Sector%20primario/Censo%20agrario/Ganadería/Ganadería.html>.
- Fenollar, F., Raoult, D., 2004. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. APMIS. 112, 785-807.
- Fernandes, I., Rousset, E., Dufour, P., Sidi-Boumedine, K., Cupo, A., Thiéry, R., Duquesne, V., 2008. Evaluation of the recombinant Heat shock protein B (HspB) of *Coxiella burnetii* as a potential antigen for immunodiagnostic of Q fever in goats. Vet. Microbiol. 134, 300-304.
- Field, P.R., Hunt, J.G., Murphy, A.M. 1983. Detection and persistence of specific IgM antibody to *Coxiella burnetii* by enzyme-linked immunosorbent assay: a comparison with immunofluorescence and complement fixation test. J. Infect. Dis. 148, 477-487.
- Field, P.R., Mitchell, J.L., Santiago, A., Dickeson, D.J., Chan, S.W., Ho, D.W., Murphy, A.M., Cuzzubbo, A.J., Devine, P.L., 2000. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with immunofluorescence and complement fixation tests for detection of *Coxiella burnetii* (Q fever) immunoglobulin M. J. Clin. Microbiol. 38, 1645-1647.
- Field, P.R., Santiago, A., Chan, S.W., Patel, D.B., Dickeson, D., Mitchell, J.L., Devine, P.L., Murphy, A.M., 2002. Evaluation of a novel commercial enzyme-linked immunosorbent assay detecting *Coxiella burnetii*-specific immunoglobulin G for Q fever prevaccination screening and diagnosis. J. Clin. Microbiol. 40, 3526-3529.
- 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.
- Fletouris, D.J., Papapanagiotou, E.P., Nakos, D.S., 2008. Liquid chromatographic determination and depletion profile of oxytetracycline in milk after repeated intramuscular administration in sheep. J. Chromatogr. B 876, 148-152.
- Fournier, P.E., Marrie, T.J., Raoult, D., 1998. Diagnosis of Q fever. J. Clin. Microbiol. 36, 1823-1834.
- Fournier, P.E., Raoult, D., 2003. Comparison of PCR and serology assays for an early diagnosis of acute Q fever. J. Clin. Microbiol. 41, 5094-5098.
- Fretz, R., Schaeren, W., Tanner, M., Baumgartner, A., 2007. Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. Int. J. Food Microbiol. 116, 414-418.
- García-Clemente, M., Seco-García, A.J., Gutiérrez-Rodríguez, M., Romero-Álvarez, P., Fernández-Bustamante, J., Rodríguez-Pérez, M., 2007. Outbreak of *Coxiella burnetii* pneumonia. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 25, 184-186.

- García de Cruz, S., Aldea-Mansilla, C., Nebreda, T., Campos, A., 2010. Family outbreak of Q fever. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28, 326-327.
- García-Pérez, A.L., Astobiza, I., Barandika, J.F., Atxaerandio, R., Hurtado, A., Juste, R.A., 2009. Short communication: investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *J. Dairy Sci.* 92, 1581-1584.
- Gardon, J., Heraud, J.M., Laventure, S., Ladam, A., Capot, P., Fouquet, E., Favre, J., Weber, S., Hommel, D., Hulin, A., Couratte, Y., Talarmin, A., 2001. Suburban transmission of Q fever in French Guiana: evidence of a wild reservoir. *J. Infect. Dis.* 184, 278-284.
- George, J., Marrie, T.J., 1987. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in horses in Atlantic Canada. *Can. Vet. J.* 28, 425-426.
- Ghigo, E., Pretat, L., Desnues, B., Capo, C., Raoult, D., Mege, J.L., 2009. Intracellular life of *Coxiella burnetii* in macrophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166, 55-66.
- Gil-Collado, J., Guillén-Llera, J.L., Zapatero-Ramos, L.M., 1979. Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). *Revista Iberica de Parasitología* 39, 107-111.
- Giménez, D.F., 1965. Gram staining of *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 90, 834-5.
- Giovannini, A., Cancellotti, F.M., Turilli, C., Randi, E., 1988. Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) of the San Rossore Preserve, Tuscany, Italy. *J. Wildl. Dis.* 24, 127-132.
- Glazunova, O., Roux, V., Feylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., Raoult, D., 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1211-1217.
- González, M.C., 1995. *Coxiella burnetii*: Estudio seroepidemiológico en la provincia de Huesca. Tesis. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de medicina.
- Gortazar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., Vicente, J. 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 241-256.
- Greenslade, E., Beasley, R., Jennings, L., Woodward, A., Weinstein, P. 2003. Has *Coxiella burnetii* (Q fever) been introduced into New Zealand? *Emerg. Infect. Dis.* 9, 138-140.
- Grilc, E., Socan, M., Koren, N., Ucakar, V., Avsic, T., Pogacnik, M., Kraigher, A., 2007. Outbreak of Q fever among a group of high school students in Slovenia, March-April 2007. *Euro Surveill.* 12, E070719.1.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.* 37, 827-833.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007a. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.* 38, 849-860.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Ledoux, D., le Drean E., Seegers, H. 2007b. Risk of false-negatives results when delaying PCR from sampling for *Coxiella burnetii* detection in dairy cows. *Revue de medecine veterinaire*, 12, 641-644.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007c. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. *Zoonoses Public Health* 54, 191-194.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudreau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328.

- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.F., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. *Vet. Microbiol.* 149, 1-16.
- Hall, C.J., Richmond, S.J., Caul, E.O., Pearce, N.H., Silver, I.A., 1982. Laboratory outbreak of Q fever acquired from sheep. *Lancet* 1, 1004-1006.
- Hatchette, T.F., Hudson, R.C., Schlech, W.F., Campbell, N.A., Hatchette, J.E., Ratnam, S., Raoult, D., Donovan, C., Marrie, T.J., 2001. Goat-Associated Q Fever: A New Disease in Newfoundland. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 413-419.
- Hatchette, T., Campbell, N., Whitney, H., Hudson, R., Marrie, T.J., 2002. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in selected populations of domestic ruminants in Newfoundland. *Can. Vet. J.* 43, 363-364.
- Hatchette, T., Campbell, N., Hudson, R., Raoult, D., Marrie, T.J., 2003. Natural history of Q fever in goats. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3, 11-15.
- Heinzen, R., Stiegler, G.L., Whiting, L.L., Schmitt, S.A., Mallavia, L.P., Frazier, M.E., 1990. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590, 504-513.
- Heinzen, R., Hackstadt, T., Samuel, J.E., 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 7, 149-154.
- Hellín, T., Bouza, E., Casimir, L., 1981. Fiebre Q aguda: experiencia en 23 casos. *Med. Clin.* 77, 1-7.
- Hellenbrand, W., Breuer, T., Petersen, L., 2001. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 789-796.
- Herczeg, J., Kovacs, F., Seemann, G., 2008. Effect of Coxevac® on milk yield in dairy cattle. In: 2011-Q fever reference book. Coxevac. 2nd European Ceva Q fever meeting, Barcelona, Spain, pp 44.
- Hermans, M.H., Huijsmans, C.R., Schellekens, J.J., Savelkoul, P.H., Wever, P.C., 2011. *Coxiella burnetii* DNA in goat milk after vaccination with Coxevac®. *Vaccine* 29, 2653-2656.
- Hildebrandt, A., Straube, E., Neubauer, H., Schmoock, G., 2011. *Coxiella burnetii* and coinfections in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 1205-1207.
- Hirai, K., To, H., 1998. Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 781-790.
- Hirai, A., Nakama, A., Chiba, T., Kai, A., 2011. Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in cheese samples. *J. Vet. Med. Sci.* Oct 7. [Epub ahead of print]
- Ho, T., Htwe, K.K., Yamasaki, N., Zhang, G.Q., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol. Immunol.* 39, 663-671.
- Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D., Nielen, M., 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 379-386.
- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R., Pritchard, G.C., 2011. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23, 924-931.
- Hornstra, H.M., Priestley, R.A., Georgia, S.M., Kachur, S., Birdsell, D.N., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., Kersh, G.J., Keim, P., Massung, R.F., Pearson, T., 2011. Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 6 (11), e26201.

- Hoover, T.A., Vodkin, M.H., Williams, J.C., 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. J. Bacteriol. 174, 5540-5548.
- Howe, D. and Mallavia, L.P., 2000. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. Infect. Immun. 68, 3815-3821.
- Htwe, K.K., Amano, K., Sugiyama, Y., Yagami, K., Minamoto, N., Hashimoto, A., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., 1992. Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* in domestic and companion animals in Japan. Vet. Rec. 131, 490.
- Hubálek, Z., Juricová, Z., Svobodová, S., Halouzka, J., 1993. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. J. Wildl. Dis. 29, 604-7.
- Hucko, M., 1984. The role of the house fly (*Musca domestica* L.) in the transmission of *Coxiella burnetii*. Folia Parasitol. 31, 177-181.
- Huijsmans, C.J., Schellekens, J.J., Wever, P.C., Toman, R., Savelkoul, P.H., Janse, I., Hermans, M.H., 2011. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. Appl. Environ. Microbiol. 77 (6): 2051-2057.
- Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Barandika, J., García-Pérez, A.L., 2001. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet. Parasitol. 102, 17-27.
- Hussein, A., Kováčová, E., Toman, R., 2001. Isolation and evaluation of *Coxiella burnetii* O-polysaccharide antigen as an immunodiagnostic reagent. Acta Virol. 45, 173-180.
- Jäger, C., Willems, H., Thiele, D., Baljer, G., 1998. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. Epidemiol. Infect. 120, 157-164.
- Jones, R.M., Hertwig, S., Pitman, J., Vipond, R., Aspán, A., Bölske, G., McCaughey, C., McKenna, J.P., van Rotterdam, B.J., de Bruin, A., Ruuls, R., Buijs, R., Roest, H.J., Sawyer, J., 2011. Interlaboratory comparison of real-time polymerase chain reaction methods to detect *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. J. Vet. Diagn. Invest. 23, 108-111.
- Kazár, J., Gajdosová, E., Kováčová, E., Valková, D., 1995. Immunogenicity and protective ability of corpuscular and soluble vaccines prepared from different *Coxiella burnetii* phase I strains. Acta Virol. 39, 243-9.
- Kennerman, E., Rousset, E., Gölcü, E., Dufour, P., 2010. Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the southern Marmara Region, Turkey. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 33, 37-45.
- Kersh, G.J., Wolfe, T.M., Fitzpatrick, K.A., Candee, A.J., Oliver, L.D., Patterson, N.E., Self, J.S., Priestley, R.A., Loftis, A.D., Massung, R.F., 2010. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. Appl. Environ. Microbiol. 76, 4469-4475.
- Khalili, M., Sakhaee, E., 2009. An update on a serologic survey of Q Fever in domestic animals in Iran. Am. J. Trop. Med. Hyg. 80, 1031-1032.
- Kim, S. G., Kim, E. H., Lafferty, C. J., Dubovi, E., 2005. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. Emerg. Infect. Dis. 11, 619-621.
- Kim, W.J., Hahn, T.W., Kim, D.Y., Lee, M.G., Jung, K.S., Ogawa, M., Kishimoto, T., Lee, M.E., Lee, S.J., 2006. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle and non-symptomatic people for routine health screening in Korea. J. Korean Med. Sci. 21, 823-826.
- Kittelberger, R., Mars, J., Wibberley, G., Sting, R., Henning, K., Horner, G.W., Garnett, K.M., Hannah, M.J., Jenner, J.A., Pigott, C.J., O'Keefe, J.S., 2009. Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of

- serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants: Recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 57, 262-268.
- Klaassen, C.H., Nabuurs-Franssen, M.H., Tilburg, J.J., Hamas, M.A., Horrevorts, A.M., 2009. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 613-614.
- Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B., 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC.Microbiol.* 6, 2.
- Klyachko, O., Stein, B.D., Grindle, N., Clay, K., Fuqua, C., 2007. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6584-6594.
- Komiya, T., Sadamasu, K., Kang, M.I., Tsuboshima, S., Fukushi, H., Hirai, K., 2003. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infections among cats in different living environments. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1047-1048.
- Kosatsky, K., 1984. Household outbreak of Q fever pneumonia related to a parturient cat. *Lancet* 2, 1447-1449.
- Kováčová, E., Kazár, J., Simková, A., 1998. Clinical and serological analysis of a Q fever outbreak in western Slovakia with four-year follow-up. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 867-869.
- Kováčová, E., Kazár, J., 2002. Q fever-still a query and underestimated infectious disease. *Acta Virol.* 46, 193-210.
- Krumbiegel, E.R., Wisniewski, H.J., 1970. Q fever in Milwaukee. II. Consumption of infected raw milk by human volunteers. *Arch. Environ. Health* 21, 63-65.
- Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanska, S.K., 1993. *Coxiella burnetii* penetration into the reproductive system of male mice, promoting sexual transmission of infection. *Infect. Immunol.* 61, 4188-4195.
- Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanska, S., 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res. Vet. Sci.* 62, 299-300.
- Lackman, D.B., Frommhagen, L.H., Jensen, F.W., Lennette, E.H., 1962. Q fever studies. 23. Antibody patterns against *Coxiella burnetii*. *Am. J. Hyg.* 75, 158-67.
- Lang, G.H., 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals. En: Q fever. Vol I, The Disease. Ed. Marrie T.J. CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 24-48.
- Laughlin, T., Waag, D., Williams, J., Marrie, T., 1991. Q fever: from deer to dog to man. *Lancet* 337, 676-7.
- Lee, J.H., Park, H.S., Jang, W.J., Koh, S.E., Park, T.K., Kang, S.S., Kim, B.J., Kook, Y.H., Park, K.H., Lee, S.H., 2004. Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea. *Microbiol. Immunol.* 48, 125-130.
- Lepe, J.A., Guerrero, F.J., Ruiz-Calderón, A., Castillo, E., Gómez-Salvago, S., Jiménez-Alonso, M.A., Palomo, S., Perea, R., 1999. Epidemiología de la fiebre Q en la zona norte de Huelva. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 17, 65-68.
- Leroy, Q., Raoult, D., 2010. Review of microarray studies for host-intracellular pathogen interactions. *J. Microbiol. Methods* 81, 81-95.
- Letaief, A.O., Yacoub, S., Dupont, H.T., le Cam, C., Ghachem, L., Jemni, L., Raoult, D., 1995. Seroepidemiological survey of rickettsial infections among blood donors in central Tunisia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 266-268.

- Li, Q., Niu, D., Wen, B., Chen, M., Qiu, L., Zhang, J., 2005. Protective immunity against Q fever induced with a recombinant P1 antigen fused with HspB of *Coxiella burnetii*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 130-142.
- Lockhart, M.G., Graves, S.R., Banazis, M.J., Fenwick, S.G., Stenos, J., 2011. A comparison of methods for extracting DNA from *Coxiella burnetii* as measured by a duplex qPCR assay. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 514-20.
- Lorbacher de Ruiz, H., 1977. Q Fever in Colombia, S.A. A serological survey of human and bovine Populations. *Zbl. Vet. Med. B.* 24, 287-292.
- Lorenz, H., Jager, C., Willems, H., Baljer, G., 1998. PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4234-4237.
- Loukaides, F., Hadjichristodoulou, C., Soteriades, E.S., Kolonia, V., Ioannidou, M.C., Psaroulaki, A., Tselentis, Y., 2006. Active surveillance of Q fever in human and animal population of Cyprus. *BMC Infect. Dis.* 6, 48.
- Luoto, L., Huebner, R.J., Stoenner, H.G., 1951. Q fever studies in Southern California. XII. Aureomycin treatment of dairy cattle naturally infected with *Coxiella burnetii*. *Public Health Rep.* 66, 199-204.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M., Weinstein, R.A., 2003. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect. Dis.* 3, 709-721.
- Mallavia, L.P., 1991. Genetics of rickettsiae. *Eur. J. Epidemiol.* 7, 213-221.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Rural y Marino), <http://www.marm.es/es/ganaderia/temas/default.aspx>
- Manfredi-Selvaggi, T., Rezza, G., Scagnelli, M., Rigoli, R., Rassa, M., de Lalla, F., Pellizzer, G.P., Tramarin, A., Bettini, C., Zampieri, L., Belloni, M., Pozza, E.D., Marangon, S., Marchioretto, N., Togni, G., Giacobbo, M., Todescato, A., Binkin, A., 1996. Investigation of a Q-fever outbreak in northern Italy. *Eur. J. Epidemiol.* 12, 403-408.
- Manilla, G., 1998. *Acari Ixodida. Fauna D'Italia.* Edizioni Calderini, Bologna, Italia.
- Marrie, T.J., Fraser, J., 1985. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among veterinarians and slaughterhouse workers in Nova Scotia. *Can. Vet. J.* 26, 181-184.
- Marrie, T.J., van Buren, J., Fraser, J., Haldane, E.V., Faulkner, R.S., Williams, J.C., Kwan, C., 1985b. Seroepidemiology of Q fever among domestic animals in Nova Scotia. *Am. J. Public Health* 75, 763-766.
- Marrie, T.J., Schlech, W.F., III, Williams, J.C., Yates, L., 1986. Q fever pneumonia associated with exposure to wild rabbits. *Lancet* 1, 427-429.
- Marrie, T.J., Durant, H., Williams, J.C., Mintz, E., Waag, D.M., 1988. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *J. Infect. Dis.* 158, 101-108.
- Marrie, T.J., Langille, D., Papukna, V., 1989. Truckin pneumonia - an outbreak of Q-fever in a truck repair plant probably due to aerosols from clothing contaminated by contact with newborn kittens. *Epidemiol. Infect.* 102, 119-127.
- Marrie, T.J., 1990. Q fever - a review. *Can. Vet. J.* 31, 555-563.
- Marrie, T.J., Embil, J., Yates, L. 1993. Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* among wildlife in Nova Scotia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 613-5.

- Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P., 1987. *Veterinary Epidemiology. Measures of disease frequency*. Ames, Iowa State University.
- Martínez-Luengas, F., Borobio, M.V., Gálvez, J., León de Lope, M., Corral, J.L., Mañas, R., 1985. Fiebre Q en Sevilla. Comparación con otras entidades. Descripción de 34 casos y revisión. *Rev. Clin. Esp.* 176, 400-405.
- Martinov, S., 2007. Contemporary state of the problem Q fever in Bulgaria. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 21, 353-361.
- Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., Chessa, G., Cillara, G., Chisu, V., Tola, S., 2004. Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. *Vet. Microbiol.* 99, 301–305.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 518-553.
- Mazyad, S.A., Hafez, A.O., 2007. Q fever (*Coxiella burnetii*) among man and farm animals in North Sinai. *Egypt. J. Egypt. Soc. Parasitol.* 37, 135– 142.
- Mensa, J., Tella, A., Moreno, A., 1993. Five-Day treatment of non severe community-acquired pneumonia with josamycin. *J. Antimicrob. Chem.* 31, 749-754.
- McCaughey, C., McKenna, J., McKenna, C., Coyle, P.V., O'Neill, H.J., Wyatt, D.E., Smyth, B., Murray L.J., 2008. Human seroprevalence to *Coxiella burnetii* (Q fever) in Northern Ireland. *Zoonoses Public Health* 55, 189-194.
- McCaughey, C., Murray, L.J., McKenna, J.P., Menzies, F.D., McCullough, S.J., O'Neill, H.J., Wyatt, D.E., Cardwell, C.R., Coyle, P.V., 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol. Infect.* 138, 21-27.
- McCaul, T.F., Williams, J.C., 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J. Bacteriol.* 147, 1063-1076.
- McKelvie, P., 1980. Q fever in a Queensland meatworks. *Med. J. Aust.* 14, 590-593.
- McQuiston, J.H., Childs, J.E., Thompson, H.A., 2002. Q fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221, 796-9.
- Mediannikov, O., Fenollar, F., Socolovschi, C., Diatta, G., Bassene, H., Molez, J.F., Sokhna, C., Trape, J.F., Raoult, D., 2010. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 4, e654.
- Medic, A., Dzelalija, B., Polic, V.P., Margan, I.G., Turkovi, B., Gilic, V., 2005. Q fever epidemic among employees in a factory in the suburb of Zadar, Croatia. *Croat. Med. J.* 46, 315-319.
- Meiklejohn, G., Reimmer, L.G., Graves, P.S., Helmick, C., 1981. Cryptic epidemic of Q fever in a medical school. *J. Infect. Dis.* 144, 107-113.
- Meskini, M., Beati, L., Benslimane, A., Raoult, D., 1995. Seroepidemiology of rickettsial infections in Morocco. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 539-541.
- Moffat, M.A., Massie, A., Laing, A.G., Mackenzie, R.M., Robinson, H.G., 1970. Q fever in North-East Scotland. *Lancet* 2, 1025–1027.
- Monno, R., Fumarola, L., Trerotoli, P., Cavone, D., Massaro, T., Spinelli, L., Rizzo, C., Musti, M., 2009. Seroprevalence of Q-fever, brucellosis and leptospirosis in farmers and agricultural workers in Bari, Southern Italy. *Ann. Agric. Environ. Med.* 6, 205-209.
- Montejo, M., Corral, J., Aguirre, C., 1985. Q fever in the Basque Country: 1981-1984. *Reviews of Infectious Diseases* 7, 700-701.

- Montes, M., Cilla, G., Vicente, D., Nieto, V., Ercibengoa, M., Pérez-Trallero, E., 2006. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): a hyperendemic area of Q fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 129-132.
- Mourya, D.T., Padbidri, V.S., Dhanda, V. 1983. Mosquito inoculation technique for the diagnosis of Q fever employing an animal model. *Indian J. Med. Res.* 78, 201-4.
- Muñoz-Sanz, A., Vera, A., Rodríguez Vidigal, F., 2007. Fiebre Q en Extremadura: una infección emergente. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25, 230-234.
- Muskens, J., Mars, M.H., Franken, P., 2007. Q fever: an overview. *Tijdschr.Diergeneeskd.* 132, 912-917.
- Muskens, J., van Engelen, E., van Maanen, C., Bartels, C., Lam, T.J. 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet. Rec.* 168, 79.
- Navarro, J.A., Ortega, N., Buendía, A.J., Gallego, M.C., Martínez, C.M., Caro, M.R., Sánchez, J., Salinas, J., 2009. Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. *Vet. Rec.* 165, 175-178.
- Nelder, M.P., Lloyd, J.E., Loftis, A.D., Reeves, W.K., 2008. *Coxiella burnetii* in wild-caught filth flies. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1002-4.
- Nebreda, T., Contreras, E., Merino, F.J., Dodero, E., Camos, A., 2001. Brote de fiebre Q y seroprevalencia en una población rural de la provincia de Soria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 19, 57-60.
- Nguyen, S.V., Hirai, K., 1999. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol. Let.* 180, 249-254.
- Norlander, L., 2000. Q fever epidemiology and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2, 417-424.
- Nuño, F.J., Noval, J., Campoamor, M.T., del Valle, A., 2002. Fiebre Q aguda en Asturias. *Rev. Clin. Esp.* 202, 569-573.
- Ogden, N.H.; Lindsay, L.R.; Hanincova, K., 2008. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1780-1790.
- Omsland, A., Cockrell, D.C., Fischer, E.R., Heinzen, R.A., 2008. Sustained axenic metabolic activity by the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 190, 3203-3212.
- Omsland, A., Cockrell, D.C., Howe, D., Fischer, E.R., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Heinzen, R.A., 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106, 4430-4434.
- Oporto, B., Barandika, J.F., Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., García-Pérez, A.L., 2006. Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in northern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 498-501.
- Ormsbee, R.A., Bell, E.J., Lackman, D.B., Tallent, G., 1964. The influence of phase on the protective potency of Q fever vaccine. *J. Immunol.* 92, 404-412.
- Ortiz de Lejarazu, R., Tornel, J., Onrubia, C., Useros, J.L., 1983. Anticuerpos fijadores de complemento frente a *Coxiella burnetii* en diversos grupos de población. Estudio en 290 sueros seleccionados clínicamente. Rodríguez Torres A (ed), *Microbiología* 83, 393-394.
- Paiba, G.A., Green, L.E., Lloyd, G., Patel, D., Morgan, K.L. 1999a. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.* 144, 519-522.

- Paiba, G.A., Lloyd, G., Bewley, K., Webster, G.J., Green, L.E., Morgan, K.L., 1999b. An investigation of *Coxiella burnetii* infection at calving within a herd of dairy cows in England using PCR. Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millennium. Amsterdam: elsevierBrouqui, P., Raoult, D., 387-392.
- Palau, L., López, O., Cour, M.I., González, M.C., Cuevas, L., García, M.C., 1989. *Coxiella burnetii*: serologic study on bovine from the community of Madrid. Rev. Sanid. Hig. Pública 63, 43-6.
- Palmer, N.C., Kierstead, M., Key, D.W., Williams, J.C., Peacock, M.G., Vellend, H., 1983. Placentitis and abortion in goats and sheep in Ontario caused by *Coxiella burnetii*. Can. Vet. J. 24, 60-61.
- Palomo, L.J., Gisbert, L., 2002. Atlas de los mamíferos terrestres de España. Sociedad Española de Conservación de la Naturaleza, Madrid, España. pp 1-564.
- Panning, M., Kilwinski, J., Greiner-Fischer, S., Peters, M., Kramme, S., Frangoulidis, D., Meyer, H., Henning, K., Drosten, C., 2008. High throughput detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR with internal control system and automated DNA preparation. BMC Microbiol. 8, 77.
- Pape, M., Mandraveli, K., Nikolaidis, P., Alexiou-Daniel, S., Arvanitidou-Vagiona, M., 2009. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in a healthy population from northern Greece. Clin. Microbiol. Infec. 15, 146-147.
- Parisi, A., Fraccalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Capuano, F., Sottili, R., 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. Vet. Microbiol. 118, 101-6.
- Pascual-Velasco, F., Otero-Ferrio, I., Borobio-Enciso, M.V., 1991. Prevalence of antibodies against *Coxiella burnetii* in a healthy population in Lanzarote (Canary islands). An. Med. Interna 8, 233-234.
- Pascual-Velasco, F., 1996. Fiebre Q. Junta de Castilla-León, Consejería de Sanidad y Bienestar Social, Zamora, España.
- Pascual-Velasco, F., Montes, M., Marimon, J.M., Cilla, G., 1998. High seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in Eastern Cantabria (Spain). Int. J. Epidemiol. 27, 142-145.
- Pascual-Velasco, F., 2010. *Coxiella burnetii* infections in domestic ruminants in Canary islands (Spain). (Letter to the editors). Transbound. Emerg. Dis. 57, 464.
- Peacock, M.G., Philip, R.N., Williams, J.C., Faulkner, R.S., 1983. Serological evaluation of Q fever in humans: enhanced phase I titers of immunoglobulins G and A are diagnostic for Q fever endocarditis. Infect. Immun. 41, 1089-1098.
- Pérez-Gallardo, F., Clavero, G., Hernández, S., 1949. Investigaciones sobre la fiebre Q en España. Rev. Sanid. Hig. Pública. 28, 489-496.
- Pérez-Gallardo, F., Clavero, G., Hernández, S., 1952. Investigations on the epidemiology of Q fever in Spain; mountain rabbits and dormouses as a reservoir of *Coxiella burnetii*. Rev. Sanid. Hig. Pública. 26, 81-87.
- Pérez-Trallero, E., Cilla, G., Montes, M., Saénz-Dominguez, J.R., Alcorta, M. 1995. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection among slaughterhouse workers in northern Spain. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14, 71-73.
- Perugini, A.G., Capuano, F., Esposito, A., Marianelli, C., Martucciello, A., Iovane, G., Galiero, G., 2009. Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS1111 DNA amplification: a preliminary report. Res. Vet. Sci. 87, 189-91.

- Pinsky, R.L., Fishbein, D.B., Greene, C.R., Gensheimer, K.F., 1991. An outbreak of cat-associated Q fever in United States. *J. Infect. Dis.* 164, 202-204.
- Plommet, M., Capponi, M., Gestin, J. 1973. Experimental Q Fever In Cattle. *Annales De Recherches Veterinaires* 4, 325-346.
- Porten, K., Rissland, J., Tigges, A., Broll, S., Hopp, W., Lunemann, M., Treeck, U., Kimmig, P., Brockmann, S.O., Wagner-Wiening, C., Hellenbrand, W., Buchholz, U., 2006. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infect. Dis.* 6, 147.
- Prada, J., Gay, B., Llorente, A., 1959. Primer caso de fiebre Q en España. *Rev. Med. Colonial.* 15, 131-136.
- Prats, G., Gurgui, M., Ausina V., 1982. Infección por *Coxiella burnetii*. A propósito de 10 casos. *Med. Clin.* 79, 155-159.
- Psaroulaki, A., Hadjichristodoulou, C., Loukaides, F., Soteriades, E., Konstantinidis, A., Papastergiou, P., Ioannidou, M.C., Tselentis, Y., 2006. Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 576-586.
- Ramos, J.M., Masía, M., Rodríguez, J.C., Gutiérrez, F., 2005. Fiebre Q aguda en la Comunidad Valenciana. Estudio de 30 casos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23, 512-512.
- Ransom, S.E., Huebner, R.J., 1951. Studies on the resistance of *Coxiella burnetii* to physical and chemical agents. *Am. J. Hyg.* 53, 110-119.
- Raoult, D., Torres, H., Drancourt, M., 1991. Shell-vial assay: evaluation of a new technique for determining antibiotic susceptibility, tested in 13 isolates of *Coxiella burnetii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 2070-2077.
- Raoult, D., Laurent, J.C., Mutilod, M., 1994. Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* 101, 318-320.
- Raoult, D., Fenollar, F., Stein, A., 2002. Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. *Arch. Intern. Med.* 162, 701-704.
- Raoult, D., Marrie, T., Mege, J., 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect. Dis.* 5, 219-226.
- Raoult, D., 2010. Q fever, free amoeba and air conditioning. *Clin. Infect. Dis.* 51, 869-870.
- Rarotra, J.R., Yadav, M.P., Sethi, M.S., 1978. Sero-epidemiology of Q-fever in poultry. *Avian Dis.* 22, 167-168.
- Rehacek, J., Kaaserer, B., Urvolgyi, J., Lukacova, M., Kovacova, E., Kocianova, E., 1994. Isolation of *Coxiella burnetii* and of an unknown rickettsial organism from *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria. *Eur. J. Epidemiol.* 10, 719-723.
- Reinthalder, F.F., Mascher, F., Sixl, W., Arbesser, C.H., 1988. Incidence of Q fever among cattle, sheep and goats in the Upper Nile province in southern Sudan. *Vet. Rec.* 122, 137.
- Reid, A., Malone, J., 2004. Q fever in Ireland. A seroprevalence study of exposure to *Coxiella burnetii* among department of agriculture workers. *Occup. Med.* 54, 544-547.
- Reimer, L.G., 1993. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 193-198.
- Reusken, C., van der Plaats, R., Opsteegh, M., de Bruin, A., Swart, A., 2011. *Coxiella burnetii* (Q fever) in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* at livestock farms and urban locations in the

- Netherlands; could *Rattus* spp. represent reservoirs for (re)introduction? *Prev. Vet. Med.* 101, 124-130.
- Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A., Muller, C.P., 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2923-2931.
- Rhode, C., Kelly, P.J., Raoult, D., 1993. Dairy cows as reservoirs of *Coxiella burnetii* in Zimbabwe. *Cent. Afr. J. Med.* 39, 208–210.
- Richardus, J. H., Donkers, A., Dumas, A.M., Schaap, G.J, Akkermans, J.P., Huisman, J., Valkenburg, H. A., 1987. Q fever in the Netherlands: a sero-epidemiological survey among human population groups from 1968–1983. *Epidemiol. Infect.* 98, 211–219.
- Riemann, H. P., Behymer, D.E., Franti, C.E., Crabb, C., Schwab, R.G., 1979. Survey of Q fever agglutinins in birds and small rodents in northern California, 1975-76. *J. Wildl. Dis.* 15, 515-523.
- Rodolakis, A., Souriau, A., Raynaud, J.P., Brunault, G., 1980. Efficacy of a long-acting oxytetracycline against chlamydial ovine abortion. *Ann. Rech. Vet.* 11, 437-444.
- Rodolakis, A., 2006. Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small Rum. Res.* 62, 121-124.
- Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natorp, J.C., Vadet, J.P., Arricau-Bouvery, N., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J. Dairy Sci.* 90, 5352-5360.
- Rodolakis, A., Clement, P., Cochonneau, D., Beaudeau, F., Sarradin, P., Guatteo, R., 2009a. Investigation of humoral and cellular immunity of dairy cattle after one or two year of vaccination with a phase I *Coxiella* vaccine. *Procedia in Vaccinology* 1, 85-88.
- Rodolakis, A. 2009b, Biology of *Coxiella burnetii* and host response to infection. In: *Proceedings of EBF Symposium Q fever an emerging disease*. Marsella, Francia, pp 7-16.
- Rodolakis, A., Cochonneau, D. 2011. Effective protection against experimental *Coxiella burnetii* infection in mice by primo-infection. In: *Proceedings of the 2nd European Ceva Q fever symposium*. Barcelona, Spain, pp 13.
- Rodríguez, N.F., Carranza, C., Bolaños, M., Pérez-Arellano, J.L., Gutiérrez, C., 2010. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Gran Canaria Island, Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 57, 66-67.
- Rogan, W.J., Gladen, B., 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *Am. J. Epidemiol.* 107, 71-76.
- Roest, H.I., Ruuls, R.C., Tilburg, J.J., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H., Vellema, P., van den Brom, R., Wouda, W., Spierenburg, M.A.H., van der Spek, A.N., Buijs, R., de Boer, A.G., Willemsen, P. Th.J., van Zijderveld, F.G., 2011a. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 668-675.
- Roest, H.I., Tilburg, J.J., van der Hoek, W., Vellema, P., van Zijderveld, F.G., Klaassen, C.H., Raoult, D., 2011b. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol. Infect.* 139, 1-12.
- Rolain, J.M., Gouriet, F., Brouqui, P., Larrey, D., Janbon, F., Vene, S., Jarnestrom, V., Raoult, D., 2005. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clin. Infect. Dis.* 40, 82-88.

- Romero-Jiménez, M.J., Suárez-Lozano, I., Fajardo, J.M., Benavente, A., Menchero, A., Iglesia, A., 2003. Hepatitis aislada como forma de presentación de la fiebre Q: características clínicas y epidemiológicas en 109 pacientes. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21, 193-195.
- Rousset, E., Durand, B., Berri, M., Dufour, P., Prigent, M., Russo, P., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., Aubert, M., 2007. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.* 124, 286-97.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., 2009a. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 428-433.
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M., Gasnier, T., Duquesne, V., Thiery, R., Aubert, M.F., 2009b. Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 2, 188-189.
- Ruiz-Beltrán, R., Herrero-Herrero, J.I., Martín-Sánchez, A.M., Martín-González, J.A., 1990. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conori*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia typhi* in Salamanca province (Spain). Serosurvey in the human population. *Eur. J. Epidemiol.* 6, 293-299.
- Ruiz-Fons, F., Rodríguez, O., Torina, A., Naranjo, V., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2008. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet. Microbiol.* 126, 282-286.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R.A., García-Pérez A.L., 2010. Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. *BMC Vet. Res.* 6, 3.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., García-Pérez A.L., 2011. Measuring antibody levels in bulk-tank milk as an epidemiological tool to search for the status of *Coxiella burnetii* in dairy sheep. *Epidemiol. Infect.* 139, 1631-1636.
- Ruiz-Téllez, A., Muñoz-Saitua, J., Agud-Aparicio, J.M., Loma-Osorio Montes, A., Fernández de Gamarra-Betolaza, J., 1985. Fiebre Q en Álava: estudio clínico de un brote epidémico (primera de dos partes). *An. Med. Intern.* 3, 104-108.
- Ryan, E.D., Kirby, M., Collins, D.M., Sayers, R., Mee, J.F., Clegg, T., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiol. Infect.* 139, 1413-1417.
- Sadecky, E., Brezina, R., Kazar, J., Urvolgyi, J., 1975. Immunization against Q-fever of naturally infected dairy cows. *Acta Virol.* 19, 486-488.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Czaplicki, G. 2011, Diagnostic decision tree based on epidemiological survey. In: Proceedings of the 2nd European Ceva Q fever symposium. Barcelona, Spain, pp 8-9.
- Saenz de Santamaría, J., Morales, J., García de la Llana, F., 1983. Fiebre Q, características clínicas, disproteinéicas e histopatológicas en dos nuevas observaciones. *Rev. Clin. Esp.* 168, 411-414.
- Sáez de Ocariz, J.L., Gelabert, J.L., Juste, R.A., 1987. Informe técnico número 5. Encuesta serológica sobre la difusión de algunas enfermedades del ganado ovino latxo. Publicaciones del Dpto.de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco, 7-9.
- Salinas-Melédez, J.A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., Fimbres-Durazo, H., Hernández-Vidal, G., 2002. Serologic survey in animals of 'Q' fever in Nuevo Leon. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44, 75-78.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- Sampere, M., Font, B., Font, J., Sanfeliu, I., Segura, F., 2003. Q Fever in Adults: Review of 66 Clinical Cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 108-110.
- Sánchez, J., Souriau, A., Buendía, A.J., Arricau-Bouvery, N., Martínez, C.M., Salinas, J., Rodolakis, A., Navarro, J.A., 2006. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *J. Comp. Pathol.* 135, 108-115.
- Sanford, S.E., Josephson, G.K., MacDonald, A., 1994. *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. *Can. Vet. J.* 35, 376-378.
- Sanzo, J.M., García, M.A., Sáez, M.P., Sarobe, T., Audikana, A., Dehesa, V., 1991. Fiebre Q sukarra. Vitoria-Gasteiz: Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco 1ª, 5-79.
- Sanzo, J.M., García-Calabuig, M.A., Audicana, A., Dehesa, V., 1993. Q fever: prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in the Basque country. *Int. J. Epidemiol.* 22, 1183-1188.
- Saz, J.V., Bacellar, F., Merino, F.J., Filipe, A. 1993. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia conori* infection in the province of Soria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 11, 469-473.
- Schelling, E., Diguimbaye, C., Daoud, S., Nicolet, J., Boerlin, P., Tanner, M., Zinsstag, J., 2003. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev. Vet. Med.* 61, 279-293.
- Schimmer, B., Morroy, G., Dijkstra, F., Schneeberger, P.M., Weers-Pothoff, G., Timen, A., Wijkmans, C., van der Hoek, W., 2008. Large ongoing Q fever outbreak in the south of The Netherlands, 2008. *Euro. Surveill.* 13, pii: 18939.
- Schmeer, N., 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the demonstration of IgG1, IgG2 and IgM antibodies in bovine Q fever infection. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* 259, 20-34.
- Schmeer, N., Muller, P., Langel, J., Krauss, H., Frost, J.W., Wieda, J., 1987. Q fever vaccines for animals. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A* 267, 79-88.
- Schulz, J., Runge, M., Schroder, C., Ganter, M., Hartung, J., 2005. Detection of *Coxiella burnetii* in the air of a sheep barn during shearing. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 112, 470-472.
- Schulze, K., Schwalen, A., Klein, R.M., Thomas, L., Leschke, M., Strauer, B.E., 1996. A Q fever pneumonia epidemic in Dusseldorf. *Pneumologie* 50, 469-473.
- Scott, G.H., Williams, J.C., Stephenson, E.H., 1987. Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 691-700.
- Scott, G.H., Williams, J.C., 1990. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590, 291-296.
- Scrimgeour, E.M., Al-Ismaïly, S.I., Rolain, J.M., Al-Dhahry, S.H., El-Khatim, H.S., Raoult, D., 2003. Q Fever in human and livestock populations in Oman. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 221-225.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., Deboy, R.T., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Madupu, R., Dodson, R.J., Khouri, H.M., Lee, K.H., Carty, H.A., Scanlan, D., Heinzen, R.A., Thompson, H.A., Samuel, J.E., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F., 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5455-5460.
- Shannon, J.G., Heinzen, R.A., 2008. Infection of human monocyte-derived macrophages with *Coxiella burnetii*. *Methods Mol. Biol.* 431, 189-200.

- Shannon, J.G., Cockrell, D.C., Takahashi, K., Stahl, G.L., Heinzen, R.A., 2009. Antibody-mediated immunity to the obligate intracellular bacterial pathogen *Coxiella burnetii* is FC receptor- and complement-independent. *BMC Immunol.* 10, 26.
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Henning, K., Ziller, M., Niemczuck, K., Roest, H.I.J., Thiéry, R. 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Q-2009-00511.
- Slaba, K., Hussein, A., Palkovic, P., Horvath, V., Toman, R., 2003. Studies on the immunological role of virenose and dihydrohydroxystreptose present in the *Coxiella burnetii* phase I lipopolysaccharide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 505-509.
- Smetanova, K., Schwarzova, K., Kocianova, E., 2006. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in Ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 312-315.
- Smith, D.J.W. a D., E.H., 1940. Studies in the epidemiology of Q fever. The isolation of six strains of *Rickettsia burneti* from the tick *Haemaphysalis humerosa*. *Aust. J. Exp. Med. Sci.* 18, 99-102.
- Sobradillo, V., Ansola, P., Baranda, F., Corral, J., 1989. Q fever pneumonia: a review of 164 community-acquired cases in the Basque country. *Eur. Respir. J.* 2, 263-266.
- Sonenshine, D. E., 1991. *Biology of Ticks I.* Oxford University Press, New York, USA.
- Sonenshine, D. E., 1993. *Biology of Ticks II.* Oxford University Press. New York, USA.
- Soriau, A., Arricau-Bouvery, N., Bodier, C., Rodolakis, A., 2003. Comparison of the efficacy of Q fever vaccines against *Coxiella burnetii* experimental challenge in pregnant goats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 521-523.
- Spitalska, E., Kocianova, E., 2003. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. *Eur. J. Epidemiol.* 18, 263-266.
- Sprong, H., Tijssen-Klasen, E., Langelaar, M., de Bruin, A., Fonville, M., Gassner, F., Takken, W., van Wieren, S., Nijhof, A., Jongejan, F., Maassen, C.B., Scholte, E.J., Hovius, J.W., Emil-Hovius, K., Spitalská, E., van Duynhoven, Y.T., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q Fever. *Zoonoses Public Health* doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01421.x
- Spyridaki, I., Gikas, A., Kofteridis, D., Psaroulaki, A., Tselentis, Y., 1998. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2063-2067.
- Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Loukaides, F., Antoniou, M., Hadjichristodoulou, C., Tselentis, Y., 2002. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 86-90.
- Stein, A., Raoult, D., 1992. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2462-2466.
- Stein, A., Raoult, D., 1999. Pigeon pneumonia in provence: A bird-borne Q fever outbreak. *Clin. Infect. Dis.* 29, 617-620.
- Stephen, S., Achyutha R.K.N., 1980. Q fever in India: a review. *J. Indian Med. Assoc.* 74, 200-203.
- Suárez-Estrada, J., Rodríguez-Barbosa, J.I., Gutiérrez-Martín, C.B., Castañeda-López, M.R., Fernández-Marcos, J.M., González-Llamazares, O.R., Rodríguez-Ferri, E.F., 1996. Seroepidemiological survey of Q fever in León province, Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 12, 245-250.

- Sukrija, Z., Hamzic, S., Cengic, D., Beslagic, E., Fejzic, N., Cobanov, D., Maglajlic, J., Puvacic, S., Puvacic, Z. 2006. Human *Coxiella burnetii* infections in regions of Bosnia and Herzegovina, 2002. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 124-128.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006. Establishment of a genotyping scheme of *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiol. Lett. 254, 268-274.
- Tatsumi, N., Baumgartner, A., Qiao, Y., Yamamoto, I., Yamaguchi, K., 2006. Detection of *Coxiella burnetii* in chicken market eggs and mayonnaise. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 502-505.
- Téllez, A., Sáinz, C., Echevarría, C., de Carlos, S., Fernández, M.V., León, P., Brezina, R., 1988. Q fever in Spain: acute and chronic cases, 1981-1985. Rev. Infect. Dis. 10, 198-202.
- Téllez, A., Martín, A., Anda, P., de la Fuente, L., Benítez, P., García, C., León, P., 1989. Study of *C. burnetii* human and animal seroprevalence in a rural population in Madrid community. Eur. J. Epidemiol. 5, 444-446.
- Thiele, D., Willems, H., Köpf, G., Krauss, H., 1993. Polymorphism in DNA restriction patterns of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed field gel electrophoresis and image analysis. Eur. J. Epidemiol. 9, 419-425.
- Tigertt, W.D., Benenson, A.S., Gochenour, W.S., 1961. Airborne Q fever. Bacteriol. Rev. 25, 285-293.
- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. Am. J. Epidemiol. 150, 67-74.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. Emerg. Infect. Dis. 10, 1264-1269.
- Tissot-Dupont, H., Vaillant, V., Rey, S., Raoult, D., 2007. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. Clin. Infect. Dis. 44, 232-237.
- To, H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1998a. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. J. Vet. Med. Sci. 60, 859-861.
- To, H., Sakai, R., Shirota, K., Kano, C., Abe, S., Sugimoto, T., Takehara, K., Morita, C., Takashima, I., Maruyama, T., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1998b. Coxiellosis in domestic and wild birds from Japan. J. Wildl. Dis. 34, 310-316.
- Toledo, A., Jado, I., Olmeda, A.S., Casado-Nistal, M.A., Gil, H., Escudero, R., Anda, P., 2009a. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 9, 465-468.
- Toledo, A., Olmeda, A.S., Escudero, R., Jado, I., Valcarcel, F., Casado-Nistal, M.A., Rodriguez-Vargas, M., Gil, H., Anda, P., 2009b. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81, 67-74.
- Torina, A., Vicente, J., Alongi, A., Scimeca, S., Turla, R., Nicosia, S., Di, M., V, Caracappa, S., de la Fuente, J., 2007. Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003-2005. Zoonoses Public Health 54, 8-15.
- Tylewska-Wierzbanowska, S., Kruszevska, D., Chmielewski, T., 1996. Epidemics of Q fever in Poland in 1992-1994. Roczn. Akad. Med. Białymst. 41, 123-128.
- Vaidya, V.M., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N., Rathore, R.S., Kaur, S., Barbuddhe, S.B., 2010. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 33, 307-321.

- Valencia, M.C., Rodríguez, C.O., Puñet, O.G., de Blas-Giral, I., 2000. Q fever seroprevalence and associated risk factors among students from the veterinary school of Zaragoza, Spain. *Eur. J. Epidemiol.* 16, 469-476.
- van den Brom, R., Vellema, P., 2009. Q fever outbreaks in small ruminants and people in the Netherlands. *Small Ruminant Res.* 86, 74-79.
- van der Hoek, W., Dijkstra, F., Schimmer, B., Schneeberger, P.M., Vellema, P., Wijkmans, C., ter Schegget, R., Hackert, V., van Duynhoven, Y., 2010. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro. Surveill.* 15, 12. pii: 19520.
- Vest, E.D., Lundgren, D.L., Parker, D.D., Johnson, D.E., Morse, E.L., Bushman, J.B., Sidwell, R.W., Thorpe, B.D., 1965. Results of a five-year survey for certain enzootic diseases in the fauna of western Utah. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14, 124-135.
- Villalta, J., Ingelmo, M., Coca, A. 1981. Endocarditis por fiebre Q. Aspectos epidemiológicos, serológicos, clínicos y terapéuticos. A propósito de 2 casos. *Med. Clin.* 77, 294-297.
- Vodkin, M.H., Williams, J.C., 1988. A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both mycobacteria and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 1227-1234.
- Waag, D.M. 2007. *Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection. *Vaccine* 25, 7288-7295.
- Webster, J.P., Lloyd, G., Macdonald, D.W., 1995. Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitology* 110 (Pt 1), 31-35.
- Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J.E., Weiss, E., Woese, C.R., 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.* 171, 4202-4206.
- Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., 1958. Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of infective aerosols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 70, 528-540.
- Whitney, E.A.S., Massung, R.F., Candee, A.J., Ailes, E.C., Myers, L.M., Patterson, N.E., Berkelman, R.L., 2009. Seroepidemiologic and occupational risk survey for *Coxiella burnetii* antibodies among US veterinarians. *Clin. Infect. Dis.* 48, 550-557.
- Willeberg, P., Ruppanner, R., Behymer, D.E., Haghghi, S., Kaneko, J.J., Franti, C.E., 1980. Environmental exposure to *Coxiella burnetii*: a sero-epidemiologic survey among domestic animals. *Am. J. Epidemiol.* 111, 437-443.
- Willems, H., Thiele, D., Frolich-Ritter, R., Krauss, H., 1994. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zentralbl. Veterinarmed.* 41, 580-587.
- Williams, J.C., Hoover, T.A., Waag, D.M., Banerjee-Bhatnagar, N., Bolt, C.R., Scott, G.H., 1990. Antigenic structure of *Coxiella burnetii*. A comparison of lipopolysaccharide and protein antigens as vaccines against Q fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 590, 370-80.
- Williams, J.C., Peacock, M.G., Waag, D.M., Kent, G., England, M.J., Nelson, G., Stephenson, E.H., 1992. Vaccines against coxiellosis and Q fever. Development of a chloroform:methanol residue subunit of phase I *Coxiella burnetii* for the immunization of animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 653, 88-111.
- Wilson, L.E., Couper, S., Prempeh, H., Young, D., Pollock, K.G., Stewart, W.C., Browning, L.M., Donaghy, M., 2010. Investigation of a Q fever outbreak in a Scottish co-located slaughterhouse and cutting plant. *Zoonoses Public Health.* 57, 493-498.
- Woernle, H., Limouzin, C., Muller, K., Durand, M.P., 1985. La fièvre Q bovine. *Bull. Acad. Vét. de France* 58, 91-100.

- Woldehiwet, Z., 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res. Vet. Sci.* 77, 93-100.
- Wouda, W., Dercksen, D.P., 2007. Abortion and stillbirth among dairy goats as a consequence of *Coxiella burnetii*. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 132, 908-911.
- Yadav, M.P., Rarotra, J.R., Sethi, M.S., 1979. The occurrence of coxiellosis among rodents and shrews in the Tarai area of Uttar Pradesh. *J. Wildl. Dis* 15, 11-14.
- Yadav, M.P., Sethi, M.S., 1979. Sero-epidemiological studies on coxiellosis in animals and man in the state of Uttar Pradesh and Delhi (India). *Int. J. Zoonoses* 6, 67-74.
- Yanase, T., Muramatsu, Y., Inouye, I., Okabayashi, T., Ueno, H., Morita, C., 1998. Detection of *Coxiella burnetii* from dust in a barn housing dairy cattle. *Microbiol. Immunol.* 42, 51-53.
- Yoshiie, K., Oda, H., Nagano, N., Matayoshi, S., 1991. Serological evidence that the Q fever agent (*Coxiella burnetii*) has spread widely among dairy cattle of Japan. *Microbiol. Immunol.* 35, 577-581.
- Zhang, G.Q., Nguyen, S.V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Kim, H.J., Fukushi, H., Hirai, K., 1998. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *J. Clin. Microbiol.* 36, 77-80.
- Zhang, G., Samuel, J.E., 2004. Vaccines against *Coxiella* infection. *Expert. Rev. Vaccines* 3, 89-96.
- Zhang, G., Russell-Lodrigue, K.E., Andoh, M., Zhang, Y., Hendrix, L.R., Samuel, J.E., 2007. Mechanisms of vaccine-induced protective immunity against *Coxiella burnetii* infection in BALB/c Mice. *J. Immunol.* 179, 8372-8380.
- Zhang, J., Wen, B., Chen, M., Zhang, J., Niu, D., 2005. Balb/c mouse model and real-time quantitative polymerase chain reaction for evaluation of the immunoprotectivity against Q fever. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 171-175.
- Zusman, T., Yerushalmi, G., Segal, G., 2003. Functional similarities between the icm/dot pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 71, 3714-3723.