

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Departamento de Inmunología Microbiología y Parasitología

Fiebre Q en explotaciones de ganado ovino y caprino lechero: cinética de la infección, estudio de la viabilidad y los genotipos de *Coxiella burnetii*, y efecto en la calidad de los productos derivados

Memoria presentada por:

Raquel Álvarez Alonso

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad del País Vasco /Euskal Herriko

Unibertsitatea

2020

A los que están.

A los que se fueron.

“La suerte no existe, se trabaja”

PRESENTACIÓN DE LA TESIS

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Sanidad Animal de NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario. Su desarrollo ha sido posible gracias al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) a través de la financiación del proyecto titulado “Fiebre Q en explotaciones de ganado ovino y caprino lechero: cinética de la infección, estudio de la viabilidad y los genotipos de *Coxiella burnetii*, y efecto en la calidad de los productos derivados” (INIA RTA2013-00051-C02-01) , y la financiación del contrato predoctoral que ha disfrutado la doctoranda (2 mayo 2016-30 abril 2020).

La investigación realizada en esta tesis ha dado lugar cuatro publicaciones que se citan a continuación:

- **Álvarez-Alonso, R.**, Barandika, J.F., Ruíz-Fons, F., Ortega-Araiztegi, I., Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2018. **Stable levels of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy sheep flocks but changes in genotype distribution after a 10-year period in northern Spain.** *Acta Vet. Scand.*, 60(1):75.
- **Álvarez-Alonso, R.**, Zendoia, I.I., Barandika, J.F., Jado, I., Hurtado, A., López, C.M., García-Pérez, A.L., 2020. **Monitoring *Coxiella burnetii* infection in naturally-infected dairy sheep flocks throughout four lambing seasons and investigation of viable bacteria.** *Front. Vet. Sci.* (enviado, 29/03/2020, Anexo I).
- **Álvarez-Alonso, R.**, Basterretxea, M., Barandika, J.F., Hurtado, A., Idiazabal, J., Jado, I., Beraza, X., Montes, M., Liendo, P., García-Pérez, A.L., 2018. **A Q fever outbreak with a high rate of abortions in a dairy goat farm: *Coxiella burnetii* shedding, environmental contamination and viability.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(20): e01650-18
- Barandika, J.F., **Álvarez-Alonso, R.**, Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2019. **Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk.** *Int. J. Food Microbiol.*, 303:42-45.

neiker



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	v
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
II.1 <i>Coxiella burnetii</i> , agente causal de la fiebre Q	11
II.2 Ciclo doméstico y silvestre de la fiebre Q	14
II.3 El ciclo doméstico de la fiebre Q y los pequeños rumiantes	19
II.4 Investigación de la infección por <i>C. burnetii</i> en los rebaños de pequeños rumiantes	29
II.4.1 Investigación de la implicación de <i>C. burnetii</i> en los brotes de abortos.....	29
II.4.2 Investigación de la infección por <i>C. burnetii</i> en un rebaño tras un brote de fiebre Q	30
II.4.3 Investigación de los genotipos de <i>C. burnetii</i> relacionados con los brotes de fiebre Q y caracterización de cepas	35
II.4.4 Investigación de la infección por <i>C. burnetii</i> en el entorno medioambiental de la explotación	42
II.4.5 Investigación de la viabilidad de <i>C. burnetii</i>	43
II.5 Control de la fiebre Q en explotaciones de pequeños rumiantes	46
II.5.1 Tratamiento antibiótico	47
II.5.2 Vacunación	48
II.5.3 Otras medidas de control y profilaxis	50
III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	55
III.1 Selección de las poblaciones de estudio y toma de muestras	57
III.2 Procesado y análisis de las muestras	61
III.2.1 Técnicas moleculares	61
III.2.2 Técnicas serológicas	66
III.2.3 Estudio de la viabilidad de <i>C. burnetii</i>	67
III.3 Análisis estadísticos	70

IV. ARTÍCULOS / ESTUDIOS.....	71
ARTÍCULO / ESTUDIO 1.....	73
Stable levels of <i>Coxiella burnetii</i> prevalence in dairy sheep flocks but changes in genotype distribution after a 10-year period in northern Spain	73
ARTÍCULO / ESTUDIO 2.....	81
Monitoring <i>Coxiella burnetii</i> infection in naturally-infected dairy sheep flocks throughout four lambing seasons and investigation of viable bacteria	81
ARTÍCULO / ESTUDIO 3.....	105
A Q fever outbreak with a high rate of abortions in a dairy goat farm: <i>Coxiella burnetii</i> shedding, environmental contamination and viability.....	105
ARTÍCULO / ESTUDIO 4.....	125
Viable <i>Coxiella burnetii</i> in hard cheeses made with unpasteurized milk.....	125
V. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL.....	135
VI. CONCLUSIONES.....	157
VII. RESUMEN, SUMMARY, LABURPENA.....	161
VIII. ANEXOS.....	169
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	173
X. AGRADECIMIENTOS.....	199

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos de fiebre Q notificados por las diferentes Comunidades Autónomas en 2016.....	3
Figura 2. Modelo del ciclo de desarrollo de <i>C.burnetii</i> en una célula eucariota (monocitos, macrófagos, u otro tipo de células transformadas como las células Vero).	12
Figura 3. Modelo de rutas de eliminación y transmisión de <i>C. burnetii</i> desde el reservorio animal.....	15
Figura 4. Separación de las distintas fases del queso tras la centrifugación.	62
Figura/Figure 5. Spatial geographical location of 46 sheep farms in northern Spain sampled in 2005 and 2015 and their <i>C. burnetii</i> status.....	79
Figura/Figure 6. Percentage of <i>C. burnetii</i> shedders (ewes, yearlings and, if applicable, purchased animals) throughout the four lambing seasons in the four studied flocks, through vaginal fluids (V), milk (M) and faeces (F) with mean Ct values \pm SD, represented with diamonds. The circles represent the mean of the Ct values \pm SD obtained in real-time PCR from dust samples taken during ewes lambings (grey circles) and yearlings lambings (red circles). ...	91
Figura/Figure 7. Percentage of shedder animals by at least one excretion route (vaginal fluids, faeces or milk), and seroprevalence observed corresponding to ewes and yearlings of the four studied flocks during four lambing season (bars). <i>C. burnetii</i> DNA present in aerosols taken outside (empty triangles) and inside (black triangles) animal premises from lambing to the end of milking season are also represented.....	93
Figura/Figure 8. Evolution of <i>C. burnetii</i> shedding through milk measured by BTM real-time PCR analyses throughout the four milking periods.	94
Figura/Figure 9. Classification and regression tree (CRT) showing determining risk-factors for <i>C. burnetii</i> detection in dust (A), indoor aerosols (B) and outdoor aerosols (C).....	95
Figura/Figure 10. Dynamics and duration of <i>C. burnetii</i> shedding (mean Ct \pm SD) through different excretion routes in 35 goats with recent abortions.....	115
Figura/Figure 11. Evolution of seroprevalence against <i>C. burnetii</i> in the 35 goats with recent abortions studied.....	115
Figura/Figure 12. Dynamics of <i>C. burnetii</i> DNA in aerosols taken inside and outside animal premises, and relationship with abortions and normal parturitions.	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación de algunos brotes humanos de fiebre Q asociados al ganado ovino y caprino en diversos países.....	22
Tabla 2. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia frente a <i>C. burnetii</i> en ganado ovino realizados en diversos países.....	24
Tabla 3. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia frente a <i>C. burnetii</i> en ganado caprino realizados en diversos países.	26
Tabla 4. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia frente a <i>C. burnetii</i> en rebaños caprinos y ovinos de diferentes países.....	27
Tabla 5. Resultados de algunos estudios de prevalencia de ADN de <i>C. burnetii</i> en muestras de leche de rebaños caprinos y ovinos en diferentes países.	28
Tabla 6. Reacción de la PCR para la detección de <i>C. burnetii</i>	64
Tabla 7. Categorías establecidas por el fabricante de los kits comerciales de ELISA en función del título (S/Px100) y según el tipo de muestra.	66
Tabla/Table 8. Percentage of <i>C. burnetii</i> positive flocks and SNP genotypes identified in bulk-tank milk samples collected in 2005 and 2015 in northern Spain.	77
Tabla/Table 9. <i>C. burnetii</i> infection status in 2005 and 2015 of the 46 sheep flocks from northern Spain analysed in both periods.	78
Tabla/Table 10. General information of the sheep flocks included in the study: management practices, characteristics of animal premises, biosecurity measures implemented in the farms, and Q fever status prior to the study started.	86
Tabla/Table 11. Logistic regression model for the prevalence of shedders.....	92
Tabla/Table 12. SNP genotyping results from selected DNA samples obtained in each flock from animals and the environment (dust and aerosols) during the four lambing seasons.	97
Tabla/Table 13. Investigation of viable <i>C. burnetii</i> in dust collected at yearling lambings in the studied flocks throughout the study using Balb/c mice and culture in Vero cell lines.....	99
Tabla/Table 14. Results of the viability study of <i>C. burnetii</i> in dust using Balb/c and cultivation in Vero cells lines.....	118
Tabla/Table 15. Epidemiological and serological data compiled in level 1 risk group.	120
Tabla/Table 16. Results of the viability study of <i>C. burnetii</i> in unpasteurized cheeses using BALB/c mice and culture in Vero cell lines.	132

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACCM	Acidified Citrate Cysteine Media
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AENOR	Asociación Española de Normalización y Certificación
APSW	Abortion, Premature delivery, Stillbirth and Weak offspring
AIC	Akaike Information Criterion
ANOVA	Analysis Of Variance
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
Aw	Water Activity
BSA	Bovine Serum Albumin
BSL₃	Biosafety Level 3
BTM	Bulk-tank milk
CAPV	Comunidad Autónoma del País Vasco
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFT	Complement Fixation Test
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CI	Confidence Interval
CN	Control Negativo
CP	Control Positivo
CRT	Classification and Regression Tree
Ct	Cycle threshold
df	Degrees of Freedom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
DO	Densidad Óptica
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
e	Euler's number
e.g.	exempli gratia (por ejemplo/for example)
EG	Equivalentes Genómicos
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMA	Ethidium monoazide
F	Faeces
FBS	Fetal Bovine Serum
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
GE	Genome Equivalents
GG	Grupo Genómico/Genomic Group
GPS	Global Positioning System
HEL	Human Embryonic Lung (fibroblasts)
IAC	Internal Amplification Control
ICC-PCR	Integrated Cell Culture-PCR
i.e.	id est (esto es/that is)
IFA	Indirect Immunofluorescence Assay

IFAT	Immunofluorescence Antibody Test
IgG	Inmunoglobulina G/Immunoglobulin G
IgM	Inmunoglobulina M/Immunoglobulin M
IHD	Institut Hospitalo-Universitaire (Marseille)
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
INRA	French National Institute for Agricultural Research
IRS-PCR	Infrequent Restriction Site-PCR
LCV	Large-cell variant
LT	Leche de tanque
M	Milk
MLVA	Multilocus Variable number of tandem repeats- VNTR-Analysis
MPN-PCR	Most probable number-PCR
MST	Multispacer Sequence Typing
NA	Not Applicable
ND	Not Done
Neg	Negative
Nº/N/No.	Número/Number of
OIE	Office International des Epizooties
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame
OSALAN	Laneko segurtasun eta Osasunerako Euskal Erakundea/ Instituto Vasco de Seguridad y Salud Laboral
OTC	Oxytetracycline
<i>p</i>	Probability value
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate-Buffered Saline (tampón fosfato salino)
PCR	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PCR-RFLP	PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
pH	Potencial de Hidrógeno/ Potential of Hydrogen
p.i.	Post-inoculación/Post-inoculation
PMA	Propidium Monoazide
Pos	Positive
Pr	Resultant Probability
qPCR	Quantitative real-time PCR (PCR a tiempo real cuantitativa)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
RLB	Reverse Line Blot hybridization assay
<i>rpm</i>	Revoluciones Por Minuto/Revolutions Per Minute
SCID	Severe Combined Immunodeficient
SCV	Small-cell variant
SD	Standard Deviation
SDC	Small dense cell
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIM	Sistema de Información Microbiológica
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
USA	United States of America

V	Vaginal fluids
mg	miligramo/milligram
ml	mililitro/millilitre
mM	milimolar/millimolar
nm	nanómetro
μl	microlitro/microlitre
μm	micrómetro
μM	micromolar

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fiebre Q es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, causada por la bacteria intracelular *Coxiella burnetii*. Se ha demostrado que está presente en la mayor parte de los países donde se ha investigado su presencia, a excepción de Nueva Zelanda (Eldin et al., 2017; Guatteo et al., 2011).

En algunos países la fiebre Q supone un problema de salud pública como en el caso de España, donde la fiebre Q se considera una enfermedad endémica en algunas Comunidades Autónomas (Cardeñosa et al., 2006; Espejo et al., 2014; Montes et al., 2006; Ramos et al., 2005). Desde el año 2015 es una enfermedad de declaración obligatoria en el Sistema de Información Microbiológica (SIM), y en el último informe disponible (2016) (<https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>), se han documentado 352 casos. El País Vasco es una de las Comunidades Autónomas más afectadas (Figura 1). Además, en el último informe publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA and ECDC, 2019), España encabeza la lista de los países europeos con más casos de fiebre Q en 2018, mostrando el ratio más alto, con 0,67 casos por 100.000 habitantes. Por otro lado, los últimos datos publicados por el Departamento de Salud del Gobierno Vasco (<http://www.euskadi.eus/informacion/informe-de-salud-publica/web01-a3vipub/es/>) indican que durante el año 2016 hubo 77 casos de fiebre Q y 81 en 2017. Álava fue la provincia que presentó menos casos, 11 y 6, respectivamente, en comparación con Guipúzcoa (35 y 23) y Vizcaya (31 y 52).



Figura 1. Casos de fiebre Q notificados por las diferentes Comunidades Autónomas en 2016.
Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE).

Las manifestaciones clínicas de la fiebre Q son variadas (Honarmand, 2012). La fiebre Q aguda puede dar lugar a síntomas similares a los de una gripe (fiebre, cefalea, fatiga, mialgia, etc), y también puede dar lugar a cuadros más graves con neumonía o hepatitis (Eldin et al., 2017). En algunos casos, entre el 1 y el 5 % (Fournier et al., 1998; Tissot-Dupont and Raoult, 2008), la infección se cronifica, con endocarditis e infecciones vasculares como manifestaciones clínicas más importantes, pudiendo desembocar en la muerte del paciente (Eldin et al., 2017; van den Brom et al., 2015a). En España, según la zona geográfica, la fiebre Q se manifiesta de forma diferente, con casos de neumonía en el norte de la Península, y fiebre y hepatitis en el centro-sur y Canarias (Alende-Castro et al., 2018). Aunque todavía no se conoce la causa, las diferentes manifestaciones clínicas podrían estar relacionadas con los diferentes genotipos de *C. burnetii* (Alende-Castro et al., 2018; Eldin et al., 2017).

C. burnetii es capaz de infectar a un amplio rango de hospedadores (mamíferos, aves y artrópodos- garrapatas principalmente) (Angelakis and Raoult, 2010; Eldin et al., 2017). Hoy en día se sabe que los rumiantes domésticos son el principal reservorio de *C. burnetii* y por lo tanto la principal fuente de infección en los brotes humanos de fiebre Q (Clark and Soares Magalhaes, 2018; van den Brom et al., 2015a). *C. burnetii* puede provocar diversos problemas reproductivos en los rumiantes. En el caso del ganado vacuno, se ha descrito que *C. burnetii* causa infertilidad, mastitis o metritis, y raramente abortos, mientras que en el ganado ovino y caprino puede provocar lo que se ha denominado como “APSW complex” (aborto, parto prematuro, nacimiento de mortinatos o descendencia débil) (Agerholm, 2013). En algunos rebaños caprinos se han reportado tasas de abortos superiores al 50%, mientras que en el ganado ovino los abortos por *C. burnetii* tienen una incidencia menor (Agerholm, 2013; van den Brom et al., 2015a).

Los animales infectados no solo excretan grandes cantidades de *C. burnetii* mediante los fluidos y tejidos expulsados durante el aborto o el parto normal, sino que también excretan la bacteria a través de diferentes vías como leche, fluidos uterinos o heces durante varias semanas después del parto/aborto (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Rodolakis et al., 2007). Tras su liberación al medio exterior a través de fluidos y anejos fetales, heces y orina, *C. burnetii* puede resistir durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente en su forma extracelular (similar a una espora) bajo condiciones severas (presión osmótica, temperatura, desecación,...) (Eldin et al., 2017; Maurin and Raoult, 1999). Una vez en el ambiente, *C. burnetii* puede ser desplazada a través del viento (Tissot-Dupont et al., 2004), o bien puede ser trasladada de un lugar a otro con el transporte de animales o de subproductos (lana, estiércol), así como a través de vehículos u otras acciones humanas (calzado o ropa contaminada, o utensilios contaminados,...) (Clark and Soares Magalhaes, 2018; EFSA, 2010; Hurtado et al., 2017; Kersh et

al., 2013; Nusinovici et al., 2014). La vía más importante de infección para el ser humano es la inhalación de aerosoles contaminados (Angelakis and Raoult, 2010). La presencia de ADN de *C. burnetii* ha sido detectada en muestras ambientales (aire y polvo) en el entorno de explotaciones ganaderas infectadas (Kersh et al., 2010b; Kersh et al., 2013; Kersh et al., 2016) durante largos periodos de tiempo (Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b; Joulié et al., 2015), pero hasta la fecha, pocos han sido los estudios que han investigado la viabilidad y persistencia de la bacteria en las explotaciones ganaderas afectadas por fiebre Q, es decir, apenas se conoce cuánto tiempo permanece viable *C. burnetii* en el ambiente tras el momento álgido de los abortos/partos. Estudios previos indican que *C. burnetii* puede permanecer activa en el polvo durante al menos 2 meses (revisado por EFSA, 2010). La hipótesis de trabajo en esta tesis es que *C. burnetii* podría permanecer viable en el entorno de una explotación afectada, durante periodos más prolongados y a lo largo de parideras sucesivas. Por ello, conocer este aspecto es de máximo interés a la hora de establecer planes de bioseguridad en las explotaciones tras un brote de fiebre Q.

Así pues, el estudio de la prevalencia de la infección y la cinética la infección por *C. burnetii* en los rebaños de pequeños rumiantes, junto al análisis de la persistencia y viabilidad de la bacteria en el ambiente son necesarios para tomar decisiones a la hora de llevar a cabo programas de prevención y control de la fiebre Q. Se sabe que la infección por *C. burnetii* puede mantenerse activa durante parideras consecutivas (Berri et al., 2002; Berri et al., 2005a; Berri et al., 2007; Canevari et al., 2018), pero los trabajos realizados en esta línea son escasos. Tras un brote de fiebre Q, la vacunación de un rebaño ovino con la vacuna inactivada en fase I durante cuatro años consecutivos, reduce la infección por *C. burnetii* en la población animal a partir del segundo año de vacunación (Astobiza et al., 2011a). Sin embargo, se desconoce la evolución de la infección en rebaños naturalmente infectados, es decir, durante cuantos años puede mantenerse la infección y la excreción de *C. burnetii* en la población animal. La vacuna inactivada en fase I no ha estado disponible en el mercado español hasta hace pocos años, y en la CAPV no se ha implantado ningún plan de control de la fiebre Q, por lo que, este trabajo ha partido de la hipótesis de que, en ausencia de un plan específico de control de la fiebre Q, la infección por *C. burnetii* puede mantenerse activa en un rebaño infectado durante varios años.

Se ha considerado que la fiebre Q es una enfermedad meramente ocupacional que afecta a ganaderos, veterinarios, trabajadores de mataderos, personal de laboratorio, etc., pero también se tiene conocimiento de brotes en personas que han tenido un contacto puntual con animales, o que viven en zonas urbanas y rurales sin contacto con éstos (Barlozzari et al., 2020; Clark and Soares Magalhaes, 2018; Georgiev et al., 2013; van den Brom et al., 2015a). El mayor brote de

fiebre Q descrito hasta el momento fue el ocurrido en Holanda entre 2007 y 2010 con más de 4.000 casos notificados (Dijkstra et al., 2012; Eldin et al., 2017; Schneeberger et al., 2014), remarcando de esta forma la importancia de esta enfermedad como problema de salud pública.

Además del brote de Holanda, ha habido otros brotes de menor alcance, pero no por ello menos importantes (Canadá, Bulgaria, Francia, Alemania, Italia,...) todos relacionados de forma directa o indirecta con ganado ovino y caprino (van den Brom et al., 2015a), y menos frecuentemente con ganado vacuno. Esto podría ser debido a que las vías de excreción de *C. burnetii* al medio exterior, y por lo tanto la contaminación ambiental generada en el entorno de la explotación, variaría según la especie de rumiante. El grupo de trabajo de fiebre Q en NEIKER ha trabajado en proyectos anteriores con las especies ovina y bovina, ya que, entre los rumiantes domésticos de la CAPV, representan los mayores censos ganaderos en comparación con el ganado caprino, que tiene un censo escaso (<http://www.euskadi.eus/ovino-efectivos-producciones-ganaderas/web01-a3estaae/es/>). Por ello, se conocen bien las rutas de excreción de *C. burnetii* en las especies ovina y bovina. Así, los fluidos vaginales y las heces son las vías de excreción más importantes en el ganado ovino (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2013), mientras que la leche es la principal vía de excreción en el ganado vacuno lechero (Piñero et al., 2014a; Piñero et al., 2014b). Debido a que los últimos brotes de fiebre Q humana en la CAPV han estado relacionados con el ganado caprino (Alonso et al., 2015; Alonso et al., 2019; Delgado Naranjo et al., 2011; Hurtado et al., 2017), es imprescindible conocer también cuál es la cinética de infección en esta especie y las vías de excreción de *C. burnetii* tras un brote de fiebre Q, con objeto de comprobar si, tal como indican algunos autores, la leche sería la principal vía de excreción en el ganado caprino (Rodolakis et al., 2007), o bien si, por el contrario, el patrón de infección sería similar al del ganado ovino (Roest et al., 2012; Rousset et al., 2009a).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el genotipo de *C. burnetii* podría definir el espectro clínico de la enfermedad. Además, conocer el genotipo de las cepas de *C. burnetii* causantes de brotes de fiebre Q en rumiantes es fundamental para determinar cuál ha podido ser la potencial fuente de infección en casos o brotes humanos de fiebre Q. En los últimos tiempos se han desarrollado diversas técnicas de genotipado de *C. burnetii*. Hasta la fecha, las técnicas MLVA (Multilocus variable number of tandem repeats - VNTR - analysis) (Arricau-Bouvery et al., 2006; Svraka et al., 2006) y MST (Multispacer Sequence Typing) (Glazunova et al., 2005) se han utilizado ampliamente. Son técnicas basadas en PCR con un alto poder de discriminación. Otra técnica más reciente, el genotipado SNP (Single nucleotide polymorphism-SNP- genotyping) (Huijsmans et al., 2011), al igual que las anteriormente citadas, tampoco

necesita realizar el cultivo previo de las muestras, y aunque no discrimina tanto como MLVA y MST, es rápida y de fácil interpretación, y permite comparar de forma más sencilla los genotipos obtenidos a partir de muestras de animales, ambientales y humanas (Dal Pozzo et al., 2016; Huijsmans et al., 2011; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011; van Schaik and Samuel, 2012). Dadas sus ventajas, consideramos de interés su utilización para la caracterización de cepas de *C. burnetii* en los pequeños rumiantes de la CAPV y poder incorporarla a la investigación de los brotes de fiebre Q. Estudios previos realizados en la CAPV (Astobiza et al., 2012b) mostraron una amplia diversidad genética de *C. burnetii* en las 3 especies de rumiantes domésticos con la técnica MLVA, así como la identificación de 4 genotipos con la técnica MST. La hipótesis de esta tesis es que la diversidad podría ser mayor y que los pequeños rumiantes compartirían genotipos de *C. burnetii* comunes a ambas especies.

Aunque la vía aerógena es la principal ruta para el contagio de fiebre Q en humanos (Eldin et al., 2017), y debido a que en los rumiantes domésticos infectados la excreción de la bacteria se puede dar a través de la leche, se ha postulado la posibilidad de infección por *C. burnetii* a través de la vía oral (Benson et al., 1963; Fishbein and Raoult, 1992; Signs et al., 2012). Por ello, algunos autores (Gale et al., 2015) sugieren que el riesgo de infección tras el consumo de productos lácteos contaminados con *C. burnetii*, aunque bajo, no debería ser descartado totalmente. Así, entre las medidas de control y profilaxis recomendadas por la EFSA, también se encuentra la pasteurización de la leche (EFSA, 2010). En este sentido, existen estudios que han confirmado la viabilidad de la bacteria en leche cruda (Loftis et al., 2010; Olivas et al., 2016), y en quesos blandos tipo “cottage” (revisado por Gale et al., 2015). En el momento de comenzar este trabajo de tesis, en los escasos estudios realizados sobre la viabilidad de *C. burnetii* en quesos curados elaborados con leche cruda, no se detectaron bacterias viables (Eldin et al., 2013; Hirai et al., 2012). Sin embargo, estos trabajos utilizaron un procedimiento experimental muy limitado, por lo que, en esta tesis se pretende confirmar la hipótesis de que *C. burnetii* podría permanecer viable en queso elaborado con leche cruda a lo largo del periodo de maduración, dada la gran resistencia que ha mostrado esta bacteria en diferentes sustratos y condiciones (EFSA, 2010).

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos y las hipótesis planteadas, este trabajo de tesis pretende conseguir los siguientes objetivos:

1. Estudiar la prevalencia de *C. burnetii* en las explotaciones ovinas lecheras de la CAPV y la evolución mostrada en un periodo de 10 años.

2. Estudiar la cinética, persistencia y progresión de la infección por *C. burnetii* en explotaciones lecheras de pequeños rumiantes de la CAPV.
3. Estudiar la viabilidad de *C. burnetii* en muestras medioambientales tomadas en explotaciones afectadas por fiebre Q.
4. Identificar los genotipos de *C. burnetii* presentes en muestras animales y medioambientales de las explotaciones de pequeños rumiantes, su evolución en el tiempo y su relación con brotes humanos de fiebre Q.
5. Investigar la prevalencia de *C. burnetii* en quesos elaborados con leche cruda, y su viabilidad a lo largo del proceso de maduración.

Con los resultados obtenidos se han elaborado cuatro artículos científicos, que constituyen este trabajo de tesis, realizada en el marco del proyecto del proyecto de investigación financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), titulado “Fiebre Q en explotaciones de Ganado Ovino y Caprino Lechero: cinética de la infección, estudio de la viabilidad y los genotipos de *Coxiella burnetii*, y efecto en la calidad de los productos derivados” (INIA RTA2013-00051-C02-01).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 *Coxiella burnetii*, agente causal de la fiebre Q

Coxiella burnetii es una bacteria de pequeño tamaño (anchura 0,2-0,4 μm y longitud 0,4-1 μm), intracelular obligada, acidófila y gram-negativa, descrita en la década de los años 30 del siglo pasado por E.H. Derrick (Eldin et al., 2017). Derrick comprobó que esta bacteria era el agente causal de un síndrome febril de origen desconocido que tuvo lugar en 1935 entre los trabajadores de un matadero de Australia, y que se denominó fiebre Q, haciendo referencia a la “Q” de *query* en inglés, que significa interrogación o pregunta (revisado por Hirschmann, 2019). *C. burnetii* ha sido clasificada como un agente biológico de categoría B por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Estados Unidos). Se le considera como potencial arma biológica debido a su capacidad de diseminación, su modo de transmisión aerógena, y su estabilidad ambiental bajo condiciones adversas. A pesar de que una baja cantidad de *C. burnetii* (entre 1 y 10 bacterias) es capaz de producir enfermedad, no está incluida dentro de la categoría A (Gurtler et al., 2014; Jones et al., 2006; Tigertt et al., 1961) ya que no da lugar a altas tasas de mortalidad como el antrax, o la viruela, por ejemplo (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Madariaga et al., 2003).

Inicialmente, el género *Coxiella* se incluyó dentro de la familia *Rickettsiaceae* (Hirschmann, 2019; Marrie, 1990). Años más tarde, tras el análisis de la secuencia del gen que codifica el ARN ribosómico 16S y el análisis de un grupo de proteínas conservadas (Seshadri et al., 2003; Weisburg et al., 1989), se reubicó en la familia *Coxiellaceae* (orden: *Legionellales*; clase: *Gammaproteobacteria*; filo: *Proteobacteria*) donde el género *Coxiella* incluye una única especie, *C. burnetii* (Roest et al., 2013a).

En el año 2003 se publicó el genoma completo del aislado de referencia Nine Mile I (RSA493) que tiene cerca de 2 millones de pares de bases (pb) (Seshadri et al., 2003). La secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S ha permitido identificar una gran diversidad de endosimbiontes similares a *C. burnetii* (*Coxiella*-like) en garrapatas de diferentes partes del mundo, lo que sugiere que dentro del género *Coxiella* podría haber más de una especie. Estos endosimbiontes tienen un tamaño de genoma más pequeño (0,7-1,7 millones de pb) que *C. burnetii*, por lo que existe la hipótesis de que todos ellos tengan un ancestro común desde el que *C. burnetii* habría evolucionado hacia la capacidad de infectar vertebrados (Buysse et al., 2019; Duron et al., 2017; Eldin et al., 2017)

El ciclo de infección de *C. burnetii*, bacteria intracelular obligada, consta de varias etapas, llevándose a cabo el ciclo de desarrollo dentro del fagolisosoma de las células eucariotas (Figura 2). *Coxiella* presenta un ciclo biológico de supervivencia y división bifásico, en el cual

entran en juego variantes celulares morfológica, antigénica y metabólicamente diferentes, y que difieren en su resistencia a los agentes físicos y químicos (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Por un lado, está la variante celular grande (*large-cell variant* o LCV). La LCV es la forma replicativa, metabólicamente más activa, y tiene un tamaño de $>0,5 \mu\text{m}$. Por otro lado, está la variante celular pequeña (*small-cell variant* o SCV), que es la forma no replicativa de la fase estacionaria, que tiene la cromatina condensada y un tamaño menor ($\sim 0,2$ a $0,5 \mu\text{m}$), y además dispone de un complejo sistema interno de membranas unidas a una envoltura celular gruesa. La forma SCV tiene un mayor porcentaje de peptidoglicanos (32% frente al 2% de la forma LCV) y de proteínas resistentes a la digestión, que contribuyen a su resistencia intra y extracelular (Amano et al., 1984; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; McCaul and Williams, 1981; Sandoz et al., 2016). Las formas SCV y LCV se dividen mediante fisión binaria, aunque en este caso la diferencia es que las LCV muestran en uno de sus extremos una forma celular muy densa, la SDC, que se libera en forma de endoespora tras la lisis de la LCV o por la fisión desigual de la misma. La SDC o célula pequeña densa (*small dense cell*) tiene unos 130-170 nm de diámetro, y está rodeada de 4 capas (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; McCaul and Williams, 1981). La liberación de las endoesporas SDC puede dar lugar a la maduración de la SCV. Ambas variantes, SDC y SCV, son consideradas las formas resistentes de *Coxiella* (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Coleman et al., 2004; McCaul et al., 1991).

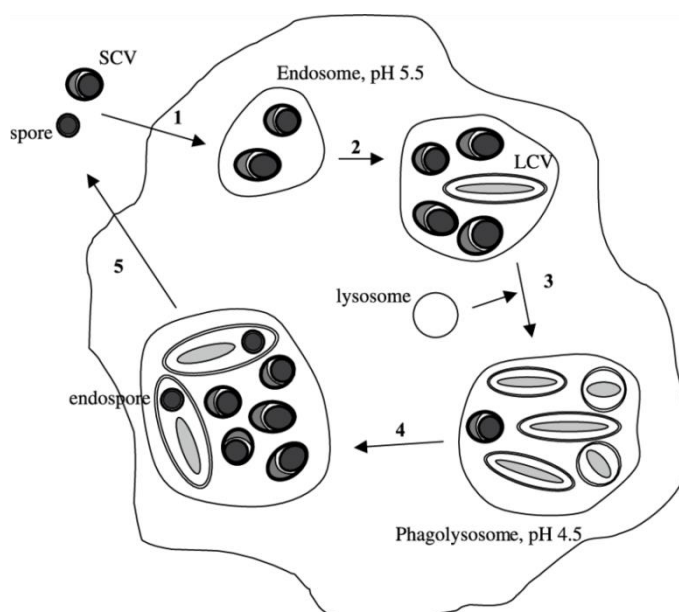


Figura 2. Modelo del ciclo de desarrollo de *C. burnetii* en una célula eucariota (monocitos, macrófagos, u otro tipo de células transformadas como las células Vero). *Fuente:* Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005.

La transición entre una variante y otra obedece a cambios en la expresión de genes específicos que tienen lugar en cada momento del ciclo de desarrollo. El paso de la forma estacionaria a la replicativa estaría favorecida por el ambiente ácido existente en la vacuola, por la presencia de nutrientes y de enzimas del hospedador, y el paso de la fase replicativa a la fase estacionaria tendría lugar como consecuencia de la limitación de nutrientes (Minnick and Raghavan, 2011; Sandoz et al., 2016).

Las formas SCV y SDC son las variantes de *C. burnetii* capaces de sobrevivir extracelularmente en el ambiente gracias a su resistencia frente a factores físicos y químicos, como la desecación, el calor, las radiaciones ultravioleta, el estrés osmótico y oxidativo, entre otros (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; EFSA, 2010). Aunque las formas SDC no han podido ser aisladas hasta el momento, parece que, junto a las SCV podrían sobrevivir en el medio ambiente en nichos intracelulares proporcionados por amebas de vida libre (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005) como *Naegleria* o *Acanthamoeba*, que son muy ubicuas en suelo y agua, tal y como ocurre con *Legionella* (Rowbotham, 1980). Así, se demostró que al infectar *Acanthamoeba castellanii* con *C. burnetii*, tenía lugar el ciclo de diferenciación y multiplicación de la bacteria, formándose nuevas formas SDC dentro de las amebas (La Scola B. and Raoult, 2001).

C. burnetii ha mostrado resistencia a algunos desinfectantes como el Roccal al 2%, Lysol al 5%, o la formalina al 5% ya que tras una exposición durante 24 horas a 24°C, la bacteria permanecía viable (Scott and Williams, 1990). Sin embargo, el etanol al 70%, el peróxido de hidrógeno al 5% o el hipoclorito al 0,5% inactivan *C. burnetii* tras 30 minutos de exposición. El cloroformo al 5% y el formaldehído aplicado en un ambiente con una humedad mínima del 80%, inactivan *C. burnetii* en tiempos inferiores a 30 minutos (EFSA, 2010). Las distintas variantes celulares de *C. burnetii*, podrían diferir en su sensibilidad frente a los diferentes desinfectantes, tiempos y temperaturas de aplicación (Frentzel et al., 2013; Scott and Williams, 1990).

Se sabe que *C. burnetii* puede sobrevivir más de 3 años en leche a 4-6°C, de 12 a 16 meses en la lana, más de 6 meses en solución salina al 10%, 2 meses en polvo, 49 días en orina desecada, más de un mes en carne fresca, y también en la ropa, bajo condiciones de altas y bajas temperaturas y sin contacto directo con la luz del sol (EFSA, 2010; Eldin et al., 2017). *C. burnetii* puede permanecer viable en las garrapatas reservorio y en sus heces durante largos periodos de tiempo (entre 200 y 1000 días) (Eldin et al., 2017). En lo que respecta a la resistencia de *C. burnetii* a la temperatura, es estable a 62°C durante 30 minutos, pero la temperatura de pasteurización (72°C 40 segundos) inactiva la bacteria (EFSA, 2010).

En lo que respecta a la presencia y persistencia de *C. burnetii* en los alimentos, se ha detectado la presencia de *Coxiella* en productos de origen animal como huevos y mayonesa (Tatsumi et al., 2006) y en leche y productos lácteos (yogurt, nata, mantequilla o queso) (Abdali et al., 2018; Capuano et al., 2012; Eldin et al., 2013; Fretz et al., 2007; Galiero et al., 2016; Hirai et al., 2012; Pearson et al., 2014). La viabilidad de *C. burnetii* ya fue demostrada en leche, mantequilla y queso en algunos experimentos llevados a cabo en los años 40 y 50 (revisado por Gale et al., 2015), y posteriormente, también en leche cruda de vaca (Loftis et al., 2010; Olivas et al., 2016; To et al., 1998a). En lo que respecta al queso, solamente un estudio realizado en los años 50 detectó *C. burnetii* viable en queso de tipo “cottage” de 42 días (revisado por Gale et al., 2015). Recientemente, los estudios realizados con quesos elaborados con leche sin pasteurizar no han detectado viabilidad de *Coxiella* (Eldin et al., 2013; Hirai et al., 2012). El tiempo de maduración y el pH, junto a otros parámetros como la actividad del agua (Trmcic et al., 2017), podrían estar influyendo en la supervivencia de *C. burnetii* en el queso (Gale et al., 2015).

II.2 Ciclo doméstico y silvestre de la fiebre Q

C. burnetii es capaz de infectar a un importante número de animales domésticos o silvestres y artrópodos (principalmente garrapatas) (Maurin and Raoult, 1999; Parker et al., 2006). Dentro del ciclo de *C. burnetii* en la naturaleza, y según las especies implicadas, se pueden diferenciar un ciclo doméstico y un ciclo silvestre. La Figura 3 es una adaptación del modelo de transmisión de la fiebre Q propuesto por Hendrik-Jan Roest (Roest et al., 2013a).

En el ciclo doméstico intervienen principalmente los rumiantes domésticos (Guatteo et al., 2011; Pexara et al., 2018), aunque también los animales de compañía (perros, gatos) pueden padecer la infección. No obstante, los rumiantes domésticos, y especialmente el ganado ovino y caprino, son los principales reservorios de *C. burnetii*, y son las especies comúnmente asociadas a los brotes humanos de fiebre Q (EFSA, 2010; Maurin and Raoult, 1999).

Respecto a la importancia de la infección por *C. burnetii* en los rumiantes, los animales gestantes pueden sufrir problemas reproductivos de diferente índole, como infertilidad, mastitis o metritis, principalmente en el ganado vacuno, y abortos, partos prematuros y nacimiento de animales débiles en caso del ganado ovino y caprino. Los abortos tienen una mayor relevancia en el ganado caprino que en el ganado ovino, ya que en esta especie se pueden alcanzar tasas muy elevadas de abortos (Agerholm, 2013; van den Brom et al., 2015a). Los animales infectados, no solo eliminan *C. burnetii* en grandes cantidades a través de los productos del aborto o del

parto (placenta, fluidos amnióticos o membranas fetales), sino que la bacteria también es excretada a través de la leche, heces, fluidos vaginales y orina (Agerholm, 2013; Rodolakis et al., 2007; Roest et al., 2013a). Los millones de bacterias expulsados con las placentas, fluidos uterinos y heces generan una alta contaminación ambiental en las explotaciones afectadas, y las corrientes de aire y el movimiento de los animales dan lugar a la formación de aerosoles contaminados por *C. burnetii*, que al ser inhalados por personas o animales susceptibles, dan lugar a la infección (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). El impacto de la contaminación ambiental generada por *C. burnetii* es mayor en rebaños con un censo elevado y con parideras agrupadas. Por tanto, el mayor riesgo de infección sería en la paridera, cuando se excretan millones de bacterias al medio exterior, durante varias semanas (Astobiza et al., 2010; Joulié et al., 2015). Además, existen otros factores que pueden influir en el riesgo de propagación de la infección desde un rebaño infectado a otros lugares más o menos lejanos. Así la climatología, y en especial la temperatura y la dirección del viento, favorecería la propagación de *C. burnetii* a varios kilómetros de distancia (5-10 kilómetros) (Clark and Soares Magalhaes, 2018; Vranakis et al., 2020). También la vegetación y la orografía pueden intervenir en el éxito del desplazamiento de *C. burnetii* a través del viento (Clark and Soares Magalhaes, 2018; EFSA, 2010).

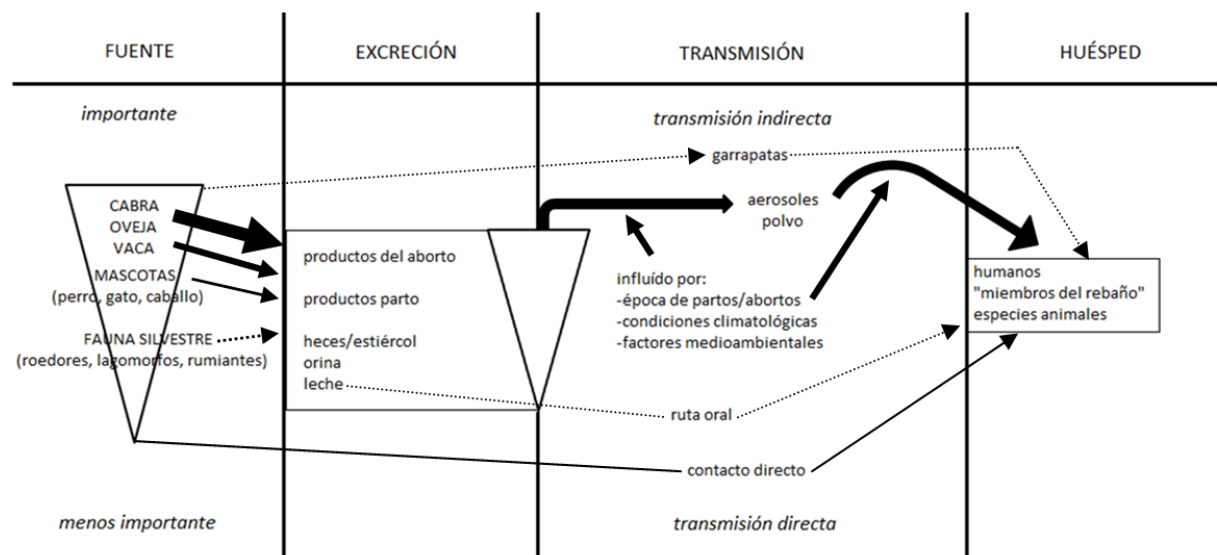


Figura 3. Modelo de rutas de eliminación y transmisión de *C. burnetii* desde el reservorio animal. Adaptación de Roest et al., 2013a.

Algunas prácticas llevadas a cabo por ganaderos, por ejemplo, el manejo inadecuado del estiércol, sacándolo al exterior de la cuadra sin que haya pasado el tiempo suficiente para la inactivación de *C. burnetii*, puede favorecer la dispersión ambiental de *Coxiella* si las condiciones climáticas lo permiten (Clark and Soares Magalhaes, 2018; Plummer et al., 2018; van den Brom et al., 2015a), ya que el estiércol puede albergar restos de placentas y de fluidos fetales, así como heces, y todo este material puede contener altas cargas de *Coxiella*.

Aunque el ganado vacuno es una de las posibles fuentes de infección para las personas, los mayores brotes ocurridos a lo largo de la historia han sido asociados a los pequeños rumiantes (Clark and Soares Magalhaes, 2018; van den Brom et al., 2015a). El hecho de que los abortos a consecuencia de *C. burnetii* sean raros en el ganado vacuno (Agerholm, 2013; Woldehiwet, 2004), que las vacas presenten excreción de *C. burnetii* principalmente a través de la leche (Rodolakis et al., 2007), y que los genotipos detectados en ganado vacuno estén escasamente relacionados con los identificados en los casos humanos de fiebre Q (Huijsmans et al., 2011; Tilburg et al., 2012), sugiere que esta especie ejerce un papel secundario en el ciclo doméstico de la fiebre Q, a pesar de que la prevalencia de *C. burnetii* sea elevada en ganado bovino lechero (Astobiza et al., 2012a; Guatteo et al., 2011). Así, se ha postulado que en función de la especie ganadera mayoritaria en una región o país, podría haber mayor o menor riesgo de la población a padecer fiebre Q. Sin embargo, tenemos el ejemplo de la CAPV, que a pesar de tener un censo caprino escaso (26.695 cabezas censadas en el año 2018) (<http://www.euskadi.eus/caprino-efectivos-producciones-ganaderas/web01-a3estae/es/>), los brotes recientes de fiebre Q en personas han estado relacionados con esta especie (Alonso et al., 2015; Alonso et al., 2019; Hurtado et al., 2017).

También los animales de compañía como los gatos y perros, podrían tener un papel como reservorios de la bacteria tal y como ponen de manifiesto varios estudios serológicos (Boni et al., 1998; Davoust et al., 2019; Higgins and Marrie, 1990; Komiya et al., 2003a; Ma et al., 2020; Meredith et al., 2015; Roest et al., 2011a; Shapiro et al., 2015), y estudios moleculares (Cairns et al., 2007; Chitanga et al., 2018; Fujishiro et al., 2016). Además estas especies se han asociado a brotes familiares de fiebre Q tras el contacto directo con animales infectados que han abortado o parido recientemente (Buhariwalla et al., 1996; García de Cruz et al., 2010; Komiya et al., 2003b; Kosatsky, 1984; Langley et al., 1988; Marrie et al., 1988a; Marrie et al., 1988b; Marrie et al., 1989; Pinsky et al., 1991). No obstante, estas especies, fuera del periodo del peri-parto, no parecen representar un riesgo, ya que, tras el parto, no siguen excretando la bacteria (Ma et al., 2020). El ganado equino también puede tener relevancia en el ciclo doméstico, ya que se han detectado anticuerpos frente a *C. burnetii* en esta especie así como su ADN en muestras

tomadas tras los abortos (Desjardins et al., 2018; Marenzoni et al., 2013), pero no se han realizado suficientes estudios para afirmar que esta especie cumple un papel importante como reservorio de *C. burnetii*, o si simplemente podría ser una especie centinela, indicadora de la presencia de la infección en una determinada zona.

Respecto a las especies silvestres, todavía es una incógnita el riesgo real que representan tanto como reservorios de la infección en la naturaleza, como el papel que juegan en la posible transmisión de la infección a otros animales (domésticos y silvestres) y a humanos. A día de hoy no se posee demasiada información sobre cuáles podrían ser las principales especies silvestres reservorios de *C. burnetii*, ni sobre la incidencia de la infección, las vías de excreción de la bacteria o las principales manifestaciones clínicas que pudiera provocar *C. burnetii* en estas especies silvestres. A pesar de ello, en los últimos años y tras el gran brote de fiebre Q de Holanda, ha habido un aumento en el número de estudios que han tratado de investigar el papel de la fauna silvestre en el ciclo natural de *C. burnetii*. Una revisión reciente (González-Barrio and Ruiz-Fons, 2019), recopila datos sobre los problemas reproductivos que *Coxiella* puede provocar en mamíferos silvestres, como placentitis o fallo reproductivo (abortos, mortinatos, nacimiento de crías débiles) en diversas especies (foca común, león marino de Steller, oso marino ártico, ciervo, antilope acuático, antilope negro, gacela dama, búfalo de agua). También muestra que, al igual que en los rumiantes domésticos, en las especies silvestres hay excreción de *C. burnetii* por vía vaginal (ciervo, conejo común, jabalí y pequeños mamíferos), leche (ciervo), semen (gacela común) y heces (canguro, perezoso, ciervo y jabalí).

Existen varios estudios de seroprevalencia en especies silvestres. Además de los estudios de Marrie et al. (1993) realizados en Canadá en liebres, alces, mapaches, ciervos de cola blanca, y el trabajo de To et al. (1998b) en aves, en los últimos años se han realizado diversos estudios serológicos. En España, se han estudiado principalmente los rumiantes silvestres, con prevalencias que oscilan entre el 1.59 y 36% en los ciervos rojos (Candela et al., 2017; Castillo et al., 2010; Fernández-Aguilar et al., 2016; González-Barrio et al., 2015b; Ruiz-Fons et al., 2008), 1.4-6.8% en muflones (Candela et al., 2017; Fernández-Aguilar et al., 2016), 23.8-30% en cabra montés (Candela et al., 2017; Varela-Castro et al., 2018), y 0.17% en gamos (Candela et al., 2017). También se observó un 41.2% de seropositividad en el conejo europeo (González-Barrio et al., 2015a). Hay otro tipo de estudios en los se ha investigado la presencia de ADN de *C. burnetii* en diversos tejidos de especies silvestres. Dos de los trabajos pioneros son, por un lado, el estudio realizado por Barandika et al. (2007) en micromamíferos domésticos y silvestres, y por otro, el de Astobiza et al. (2011c). En estos estudios se comprobó que los micromamíferos, corzos, jabalíes, liebres, y aves carroñeras, albergaban ADN de *C. burnetii*. Recientemente también se ha

detectado ADN de *Coxiella* en conejos silvestres y ciervos (González et al., 2020). Otros estudios realizados en zorros (Ebani et al., 2017; Psaroulaki et al., 2014), aves (Psaroulaki et al., 2014; Tokarevich et al., 2019), y especies marinas como la foca, león marino, marsopa u oso marino (Duncan et al., 2012; Kersh et al., 2010a; Kersh et al., 2012), han mostrado el amplio abanico de especies que podrían ser reservorios de *C. burnetii*. La interacción entre las personas y los animales silvestres, como en el caso de la actividad de la caza, o cualquier actividad al aire libre, entre otras, podrían favorecer el aumento de los casos de fiebre Q en humanos (González-Barrio and Ruiz-Fons, 2019; Ruiz-Fons, 2017), aunque de momento éstos se han documentado solo de forma esporádica (Davoust et al., 2014; Flint et al., 2016; Schleenvoigt et al., 2015; Stevenson et al., 2015).

Desde que en 1935 fuera aislada la primera cepa de *C. burnetii* (Nine Mile) en la especie *Dermacentor andersoni*, en Montana (Davis and Cox, 1938), las garrapatas han sido consideradas reservorios de *C. burnetii*, y partícipes del ciclo silvestre de la fiebre Q. Hasta la fecha, se han descrito más de 40 especies de garrapatas infectadas de forma natural (Eldin et al., 2017), que podrían ser reservorios y/o vectores de *C. burnetii*, y por lo tanto, podrían transmitir la infección entre animales y, a humanos, aunque esta hipótesis de momento no se ha confirmado.

La capacidad de resistencia, y por lo tanto, la viabilidad de *C. burnetii* en una garrapata podría mantenerse entre 200 y 1000 días. También se han dado cifras de supervivencia de hasta 6 o 10 años dependiendo de la especie de ixódido. Además en algunas especies tiene lugar la transmisión transestadial de *C. burnetii* (de larva a ninfa, y de ninfa a adulto) y también podría haber transmisión transovárica (de garrapata hembra a huevo y de huevo a larva)(Eldin et al., 2017; González et al., 2020; Korner et al., 2020), lo que les confiere un importante papel como reservorio de *Coxiella* en la naturaleza. Parece ser que *C. burnetii* se multiplica en las células epiteliales del intestino de la garrapata, lo que ocasiona la excreción, a través de las heces, de enormes cantidades de *C. burnetii* en fase I, que es la forma virulenta y altamente infectiva (Fournier et al., 1998). *C. burnetii* puede permanecer viable en las heces de las garrapatas desde unos días hasta casi 2 años (Eldin et al., 2017). El interés de este aspecto es que las garrapatas en el momento que se están alimentando en sus hospedadores, podrían contaminar la piel con sus excreciones, y ser fuente de infección para los propios animales, sus cuidadores, o para el personal ajeno a la explotación que acude a realizar tareas con el ganado, como los veterinarios, esquiladores, etc. (Eldin et al., 2017; Korner et al., 2020; Maurin and Raoult, 1999).

II.3 El ciclo doméstico de la fiebre Q y los pequeños rumiantes

En los pequeños rumiantes la infección por *C. burnetii* se suele dar de forma asintomática si los animales no están gestantes, pero, si lo están, puede dar lugar a abortos, y éstos suceden al final de la gestación (Agerholm, 2013; van den Brom et al., 2015a). Además pueden darse partos prematuros, nacimiento de mortinatos o nacimiento de animales débiles (Agerholm, 2013). Estos problemas reproductivos se traducen en problemas socioeconómicos, ya que la infección por *C. burnetii* además de suponer un problema para la salud humana, puede conllevar importantes pérdidas económicas en el sector ganadero (Pérez-Arellano et al., 2018; Saglam and Sahin, 2016), tales como pérdidas en la venta de corderos, venta de leche y quesos, etc. Al mismo tiempo, aunque las medidas de prevención pueden suponer un beneficio a largo plazo ya que evitarían la aparición y dispersión de la infección y se vería reducido el impacto en la salud humana, los gastos generados por la aplicación de tratamientos, vacunas, así como otras medidas de control adoptadas (sacrificio de animales infectados, la prohibición de la reproducción, etc.) y el coste de las analíticas de laboratorio, hacen que el impacto de las pérdidas económicas a consecuencia de la fiebre Q sea elevado (van Asseldonk et al., 2013; van Asseldonk et al., 2015).

En un estudio realizado entre 1999 al 2003 en la CAPV, en el que se analizaron muestras de fetos, placentas y otras muestras procedentes de 148 rebaños ovinos que habían sufrido abortos, se pudo comprobar que *C. burnetii* era la causa del aborto en el 9% de los rebaños (Oporto et al., 2006), cifra similar a la observada para el aborto enzoótico o el aborto paratífico en dicha zona. Las tasas de abortos por fiebre Q en el ganado ovino por lo general son inferiores al 6% (Astobiza et al., 2011b; Berri et al., 2005a; Dijkstra et al., 2012) por lo que a veces los abortos pasan desapercibidos a ojos de los ganaderos, perpetuando en el tiempo el foco y el riesgo de infección. Sin embargo, en el ganado caprino se pueden alcanzar tasas de hasta el 90% (Agerholm, 2013; EFSA, 2010; van den Brom et al., 2015a).

Tal y como se ha avanzado en el capítulo anterior, la paridera es el periodo de mayor riesgo, ya que tras el brote de abortos por fiebre Q, el ganado ovino y caprino infectado excreta al medio exterior cantidades elevadas de *C. burnetii*, especialmente con las placentas, pero también a través de los fluidos fetales, uterinos, heces y leche, que contribuyen a la generación de aerosoles contaminados que pueden persistir durante semanas en el ambiente (Astobiza et al., 2011b; Joulié et al., 2015).

En un estudio comparativo de las diferentes vías de excreción de *C. burnetii* en rumiantes domésticos realizado por Rodolakis et al. (2007), las heces y fluidos vaginales fueron las vías de excreción más importantes en el ganado ovino, ya que no se observaba una excreción constante a través de la leche. De hecho, otros trabajos previos ya habían observado que las ovejas abortadas podían excretar *Coxiella* durante 71 días a través de los fluidos uterinos (Berri et al., 2001) y que el porcentaje de animales excretores de *Coxiella* a través de esta vía era superior que a través de la leche y las heces. Sin embargo, el seguimiento se realizó durante un corto periodo de tiempo (Berri et al., 2001). Los mismos autores observaron que algunas ovejas presentaban infecciones persistentes durante 3 parideras (Berri et al., 2002). Por lo tanto, estos y otros resultados sugieren que la infección puede mantenerse durante al menos 3 parideras, aunque con una reducción significativa del número de animales excretores, así como de la carga bacteriana excretada.

Además de la excreción a través de fluidos vaginales, las heces representan un importante material de riesgo, ya que las ovejas infectadas pueden mantener la excreción a través de las heces a lo largo de varios meses, mientras que el periodo de excreción en leche es más corto y con menor excreción bacteriana (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Joulié et al., 2015). Así, Joulié et al. (2015) detectaron niveles altos de excreción en heces durante 2 meses, y aunque posteriormente los niveles de excreción se mantuvieron bajos, se detectó ADN de *C. burnetii* durante 8 meses.

Los mismos autores observaron que las ovejas que habían abortado excretaban *Coxiella* en mayor cantidad a través de los fluidos vaginales y las heces, y mostraban un periodo de excreción más prolongado que las ovejas que tuvieron un parto normal (Joulié et al., 2015). También comprobaron que durante la primera semana la excreción tendía a ser mayor en animales de primer parto que en los que ya habían parido dos o más veces (Joulié et al., 2015).

En el ganado caprino, tras el brote de abortos inicial, en las parideras sucesivas, se produce una reducción del porcentaje de abortos (Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007; de Cremoux et al., 2012a) y la excreción de *Coxiella* a través de las placentas, por ejemplo, también se reduce, limitándose a las dos primeras parideras tras el brote (Hatchette et al., 2003). Por otro lado, al igual que ocurre en el ganado ovino, hay animales, que aun estando infectados paren de forma normal (Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007; Reichel et al., 2012; Roest et al., 2012; Sting et al., 2013). La excreción de *C. burnetii* suele ser masiva en la paridera consecutiva al brote de abortos, y mayor en animales abortados respecto a los que paren de forma normal (de Cremoux et al., 2012a). En el trabajo de de Cremoux et al. (2012a), al igual que lo observado en

el ganado ovino (Joulié et al., 2015), también se observó que la excreción de *C. burnetii* a través de exudados vaginales era más alta en las primíparas que en animales de más de un parto.

Respecto a las rutas de excreción de *C. burnetii*, en el trabajo de Rodolakis et al. (2007), la leche fue definida como la principal ruta de excreción de *C. burnetii* en ganado caprino. Otro estudio también mostró que tras una infección experimental en cabras gestantes, tras los abortos, *Coxiella* se excretó en fluidos vaginales durante 14 días, mientras que en las heces y la leche la excreción fue discontinua durante 20 y 52 días respectivamente (Arricau-Bouvery et al., 2003). Los mismos autores realizaron una nueva infección experimental, y observaron que la excreción de *Coxiella* en exudados vaginales se mantenía durante 6 semanas, mientras que en las heces y la leche la excreción fue discontinua, durante 4 y 5-6 semanas respectivamente (Arricau-Bouvery et al., 2005). Más recientemente, una nueva infección experimental demostró que la excreción de *C. burnetii* a través de la leche era baja y limitada en el tiempo (38 días) en comparación a la detectada en los exudados vaginales y en las heces (95 días) (Roest et al., 2012). Además, en rebaños naturalmente infectados, parece que la excreción de *C. burnetii* a través de la leche se limita a la paridera en la que han tenido lugar los abortos (Berri et al., 2005b), y si se mantiene en la siguiente paridera, el porcentaje de animales excretores es muy bajo (Berri et al., 2007). Canevari et al. (2018) demostraron que en el ganado caprino la excreción de *C. burnetii* a través de los exudados vaginales también puede mantenerse durante al menos dos parideras consecutivas.

La tendencia observada en los estudios llevados a cabo en rebaños caprinos y ovinos tras un brote de abortos es que se detecta una mayor excreción de *C. burnetii*, en exudados vaginales durante periodos prolongados por lo que algunos grupos proponen el análisis de presencia de ADN de *Coxiella* en este tipo de muestra como una herramienta de diagnóstico de la infección por fiebre Q (Sting et al., 2013).

El ganado ovino y caprino son las especies responsables de la mayor parte de los brotes humanos de fiebre Q (EFSA, 2010; Roest et al., 2013a; van den Brom et al., 2015a). En la Tabla 1 se resumen algunos brotes asociados a estas especies. El brote más importante y con más relevancia por el gran número de personas afectadas fue el brote acontecido en Holanda entre los años 2007 y 2010 y que tuvo su origen en el ganado caprino (Roest et al., 2013a). De 168 casos de fiebre Q en 2007, se pasó a 1000 en 2008 y a 2354 en 2009 según fuentes oficiales (<https://www.rivm.nl/q-koorts>, web del Instituto Nacional para la Salud Pública y el Medio Ambiente de los Países Bajos). Tras la aplicación de diferentes medidas de control (van der Hoek et al., 2012), el número de personas afectadas se redujo a 504 en 2010 y a 81 en 2011. En 2019, se registraron 20 casos de fiebre Q en Holanda y actualmente hay registrados 3 (datos de

la web <https://www.rivm.nl/q-koorts>, actualizada el 17 de marzo de 2020). Las cifras totales de afectados por este brote ponen de relevancia el impacto que tiene la fiebre Q en la salud humana.

Tabla 1. Relación de algunos brotes humanos de fiebre Q asociados al ganado ovino y caprino en diversos países.

OVINO	Año	Nº casos	Referencia
Estados Unidos	1980	81	(Meiklejohn et al., 1981)
Inglaterra	1981	28	(Hall et al., 1982)
España	1981	63	(Ruiz Tellez et al., 1985)
Suiza	1983	415	(Dupuis et al., 1987)
Italia	1987-1988	235	(Boschini et al., 1999)
Alemania	1992	80	(EFSA, 2010)
Italia	1993	58	(Selvaggi et al., 1996)
Alemania	1994	>18	(EFSA, 2010)
Francia	1990-1995	289	(Tissot-Dupont et al., 1999)
Francia	1996	29	(Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005)
Alemania	1996	56	(EFSA, 2010)
Bosnia	1997	26	(Splino et al., 2003)
España	1998	14	(Nebreda et al., 2001)
Francia	2002	88	(Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005)
Italia	2003	133	(Santoro et al., 2004)
Alemania	2003	299	(Porten et al., 2006)
Croacia	2004	14	(Medic et al., 2005)
Alemania	2005	331	(Gilsdorf et al., 2008)
Inglaterra	2006	110	(Wilson et al., 2010)
Eslovenia	2007	35	(Grilc et al., 2007)
Suiza	2012	14	(Bellini et al., 2014)
Hungría	2013	70	(Gyuranecz et al., 2014)
CAPRINO	Año	Nº casos	Referencia
Francia	1987	40	(Fishbein and Raoult, 1992)
España	1986-1988	35	(Alende-Castro et al., 2018)
España	1991-1992	94	(Pascual et al., 1996)
Eslovaquia	1993	113	(Kovacova et al., 1998)
Canadá	1999	66	(Hatchette et al., 2001)
Holanda	2007-2010	4026	(van der Hoek et al., 2012) y https://www.rivm.nl/q-koorts
Estados Unidos	2011	21	(Bjork et al., 2014)
Australia	2012-2014	18	(Bond et al., 2016)
España	2016	8	(Hurtado et al., 2017)
Bulgaria	2017	11	(Genova-Kalou et al., 2019)

La importancia de esta zoonosis se refleja además en la evolución del número de artículos publicados a cerca de la prevalencia de la fiebre Q en rumiantes domésticos. Los artículos publicados hasta el año 1990 se dedicaron a estudiar la infección principalmente en el ganado bovino. A partir del año 2002, y en relación con el brote de fiebre Q en Holanda, hubo un incremento importante en el número de publicaciones relacionadas con la fiebre Q en las especies ovina y caprina, sobre todo en Europa (Guatteo et al., 2011). Diversos estudios de seroprevalencia han confirmado la distribución por *C. burnetii* en el ganado ovino y caprino en un amplio número de países. La comparación de los resultados entre los resultados de los diferentes estudios es compleja (Guatteo et al., 2011), ya que tanto las técnicas de diagnóstico utilizadas, como la estrategia de muestreo, el tipo de muestras analizadas (suero sanguíneo o leche), así como el número de animales analizados, varían entre los diferentes estudios (EFSA, 2010; EFSA and ECDC, 2019; Guatteo et al., 2011).

En la Tabla 2 se resumen los resultados de seroprevalencia individual obtenida en algunos estudios realizados en ganado ovino. Si se excluyen los estudios realizados en algunos países que han mostrado prevalencias muy elevadas (Egipto, Eslovaquia, Irán, Italia, México y Paquistán), en general las tasas medias de seroprevalencia se encuentran entre 0,7 y 18,9%. En España hay pocos estudios en los que se ha investigado la seroprevalencia de la fiebre Q en el ganado ovino, y ésta presenta un rango amplio, entre el 8,7 y el 31,7% (Tabla 2), con la tasa más alta en la isla de Gran Canaria (31.7%). Los estudios realizados a nivel individual en la especie caprina se resumen en la Tabla 3, donde se observa que las seroprevalencias encontradas en algunos países son elevadas. En España, las prevalencias halladas presentan un rango mayor que el observado en el ganado ovino, entre el 8,7 y el 76,6% (Tabla 3).

Tabla 2. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia frente a *C. burnetii* en ganado ovino realizados en diversos países.

País	Año	Técnica	Nºanimales analizados	%animales seropositivos	Referencia
Canadá	1982	IFA	329	6,7	(Marrie et al., 1985)
Alemania	1998	ELISA	1346	1,3	(Hellenbrand et al., 2001)
México	-----	ELISA	90	40,0	(Salinas-Meléndez et al., 2002)
Canadá	1997	IFA	293	3,1	(Hatchette et al., 2002)
Chad	1999-2000	ELISA	142	11,0	(Schelling et al., 2003)
Italia	1999-2002	ELISA	7194	9,0	(Masala et al., 2004)
Croacia	-	CFT	182	11,0	(Medic et al., 2005)
Chipre	-----	IFA	481	18,9	(Psaroulaki et al., 2006)
Bulgaria	2002-2006	CFT	8727	11,6	(Martinov, 2007)
Albania	1995-1997	ELISA	350	8,8	(Cekani et al., 2008)
Grecia	-	IFA	554	10,4	(Pape et al., 2009)
Irlanda	-	IFA	1022	12,3	(McCaughey et al., 2010)
India	-	ELISA	43	9,3	(Vaidya et al., 2010)
Eslovaquia	2000	ELISA	180	37,2	(Dorko et al., 2010)
Eslovaquia	2009	ELISA	89	58,4	(Dorko et al., 2010)
Irán	2009	ELISA	85	29,4	(Sakhaee and Khalili, 2010)
Irlanda	2008	ELISA	2197	0,7	(Ryan et al., 2011)
Holanda	2008	ELISA	12052	2,4	(van den Brom et al., 2013)
Kenia	2009	ELISA	159	18,2	(Knobel et al., 2013)
Portugal	2011	ELISA		8,6	(Anastácio et al., 2013)
Holanda	2009-2010		953	18,7	(Schimmer et al., 2014a)
Gambia	2012	ELISA	398	18,5	(Klaasen et al., 2014)
Irán	2011	ELISA	127	33,9	(Ezatkah et al., 2015)
Paquistán	-	ELISA	271	28,4	(Zahid et al., 2016)
Italia	2012	ELISA	2553	15,5	(Rizzo et al., 2016)
Polonia	-	ELISA	89	13,5	(Szymanska-Czerwinska et al., 2017)
Suiza	2011	ELISA	500	1,8	(Magouras et al., 2017)
Italia	2014	ELISA	6641	18,0	(Villari et al., 2018)
Italia	2013-2014	ELISA	2873	37,8	(Barlozzari et al., 2020)
Kenia	2014	ELISA	332	12,2	(Muema et al., 2017)
Grecia	2014-2015	ELISA	800	8,0	(Filioussis et al., 2017)
Portugal	2014	ELISA	1068	11,4	(Cruz et al., 2018a)
Brasil	2016	IFA	403	2,2	(Souza et al., 2018)
Egipto	2015-2016	ELISA	110	22,7	(Selim et al., 2018)

Tabla 2. Cont.

ESPAÑA	Año	Técnica	Nº animales analizados	% animales seropositivos	Referencia
Lanzarote	1991	CFT	23	8,7	(Pascual-Velasco, 2010)
G. Canaria	-	ELISA	369	31,7	(Rodríguez et al., 2010)
País Vasco	2005	ELISA	1011	8,9	(García-Pérez et al., 2009)
País Vasco	2007-08	ELISA	1379	11,8	(Ruiz-Fons et al., 2010)
Cataluña	2010-2014	ELISA	251	12,7	(Fernández-Aguilar et al., 2016)

Diversos estudios han proporcionado información sobre el porcentaje de explotaciones seropositivas frente a *C. burnetii* en diferentes regiones o países. En estos estudios se ha considerado un rebaño positivo cuando al menos uno de los animales ha presentado anticuerpos frente a *C. burnetii*. En la Tabla 4 se resumen los resultados de algunos de estos estudios. Como se observa, la seroprevalencia de los rebaños ovinos y caprinos estudiados en España, más concretamente en la CAPV, es elevada, especialmente en la especie ovina.

La mayor parte de los estudios de seroprevalencia se basan en el análisis de suero sanguíneo, sin embargo, algunos kits de ELISA comerciales también son aptos para el análisis de la presencia de anticuerpos en muestras de leche ya que existe una buena correlación entre los anticuerpos detectados en leche individual con los presentes en el suero sanguíneo (Joulié et al., 2017a). También las muestras de leche de tanque de explotaciones de rumiantes domésticos de aptitud lechera se han utilizado ampliamente para evaluar el estatus de infección frente a *C. burnetii*.

La leche de tanque es una muestra representativa del rebaño, fácil de tomar y que no precisa de la manipulación de animales. En este caso, los niveles de anticuerpos detectados con la técnica ELISA en leche de tanque también presentan una buena correlación con la seroprevalencia observada en los animales de la explotación (Joulié et al., 2017a; Ruiz-Fons et al., 2011), por lo tanto el análisis de estas muestras presenta un gran interés para la realización de estudios epidemiológicos y como técnica de cribado para calificar a las explotaciones como positivas o negativas.

Tabla 3. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia frente a *C. burnetii* en ganado caprino realizados en diversos países.

País	Año	Técnica	Nº animales analizados	% animales seropositivos	Referencia
Canadá	1982	IFA	29	7,0	(Marrie et al., 1985)
Alemania	1998	ELISA	278	2,5	(Hellenbrand et al., 2001)
México	-	ELISA	60	35,0	(Salinas-Meléndez et al., 2002)
Canadá	1999-2000	IFA	64	18,8	(Hatchette et al., 2002)
Chad	1999-2000	ELISA	134	13,0	(Schelling et al., 2003)
Omán	2001	IFA	54	56,0	(Scrimgeour et al., 2003)
Italia	1999-2002	ELISA	2155	13,0	(Masala et al., 2004)
Chipre	-	IFA	417	48,2	(Psaroulaki et al., 2006)
Bulgaria	2002-2006	CFT	3928	13,7	(Martinov, 2007)
Albania	1995-1997	ELISA	443	8,8	(Cekani et al., 2008)
Grecia	-	IFA	61	6,5	(Pape et al., 2009)
Irán	2008	ELISA	76	65,8	(Khalili and Sakhaee, 2009)
Irlanda	-	IFA	54	9,3	(McCaughey et al., 2010)
India	-	ELISA	53	5,7	(Vaidya et al., 2010)
Irlanda	2005-2007	ELISA	590	0,3	(Ryan et al., 2011)
Holanda	2009-10	ELISA	2828	21,4	(Schimmer et al., 2011)
Holanda	2008	ELISA	3134	7,8	(van den Brom et al., 2013)
Kenia	2009	ELISA	378	32,0	(Knobel et al., 2013)
Portugal	2011	ELISA		10,4	(Anastácio et al., 2013)
USA	2010-11	ELISA	1794	8,0	(Sondgeroth et al., 2013)
Gambia	2012	ELISA	490	24,2	(Klaasen et al., 2014)
Canadá	2010-2012	ELISA	1447	43,7	(Meadows et al., 2015)
Irán	2011	ELISA	241	22,4	(Ezatkah et al., 2015)
Paquistán	-	ELISA	271	33,2	(Zahid et al., 2016)
Italia	2012	ELISA	3185	16,2	(Rizzo et al., 2016)
Polonia	-	ELISA	936	6,3	(Szymanska-Czerwinska et al., 2017)
Suiza	2011	ELISA	321	3,4	(Magouras et al., 2017)
Kenia	2014	ELISA	508	26,0	(Muema et al., 2017)
Grecia	2014-2015	ELISA	800	14,4	(Filioussis et al., 2017)
Brasil	2016	IFA	412	2,2	(Souza et al., 2018)
Egipto	2015-2016	ELISA	80	12,5	(Selim et al., 2018)
Costa Rica	2013-2017	ELISA	391	1,8	(Villagra-Blanco et al., 2018)

Tabla 3. Cont.

ESPAÑA	Año	Técnica	Nº animales analizados	% animales seropositivos	Referencia
Madrid	1988-1989	CFT	43	76,6	(Tellez et al., 1989)
Lanzarote	1991	IFA	2285	32,7	(Pascual-Velasco, 2010)
Gomera	1997	IFA	132	21,2	(Pascual-Velasco, 2010)
Gomera	1997	IFA	94	16,0	(Pascual-Velasco, 2010)
G. Canaria	-	ELISA	733	60,4	(Rodríguez et al., 2010)
País Vasco	2007-08	ELISA	115	8,7	(Ruiz-Fons et al., 2010)

Tabla 4. Resultados de algunos estudios de seroprevalencia frente a *C. burnetii* en rebaños caprinos y ovinos de diferentes países.

País	Año	Técnica	Nº rebaños analizados	Ganado	%rebaños seropositivos	Referencia
España	2005	ELISA	34	ovino	67,6	(García-Pérez et al., 2009)
España	2007-2008	ELISA	46	ovino	74	(Ruiz-Fons et al., 2010)
España	2007-2008	ELISA	11	caprino	45	(Ruiz-Fons et al., 2010)
Italia	1999-2002	ELISA	675	ovino	38	(Masala et al., 2004)
Italia	1999-2002	ELISA	82	caprino	47	(Masala et al., 2004)
Italia	2012	ELISA	111	ovino	38,7	(Rizzo et al., 2016)
Italia	2012	ELISA	206	caprino	19,5	(Rizzo et al., 2016)
Italia	2014	ELISA	205	ovino	73,6	(Villari et al., 2018)
Italia	2013-2014	ELISA	94	ovino	87,2	(Barlozzari et al., 2020)
Portugal	2011	ELISA	24	ovino	37,5	(Anastácio et al., 2013)
Portugal	2011	ELISA	52	caprino	28,8	(Anastácio et al., 2013)
Irlanda	2005-2007	ELISA	119	ovino	8,4	(Ryan et al., 2011)
Irlanda	2005-2007	ELISA	66	caprino	1,5	(Ryan et al., 2011)
Turquía	2001-2004	ELISA	42	ovino	81	(Kennerman et al., 2010)
Irán	2011-2012	ELISA	43	ovino y caprino	100	(Asadi et al., 2013)
Irán	2008	ELISA	9	caprino	100	(Khalili and Sakhaee, 2009)
Brasil	2016	IFA	26	ovino y caprino	30,8	(Souza et al., 2018)
Canadá	1984	ELISA	20	caprino	20	(Lang, 1988)
Canadá	1988	ELISA	103	ovino	22	(Lang et al., 1991)
Canadá	1998	CFT	46	ovino	89	(Dolce et al., 2003)

Otra ventaja añadida de trabajar con muestras de leche de tanque es que permite detectar, mediante técnicas moleculares, la presencia de ADN de *C. burnetii*, y, en el caso de obtener un resultado positivo, indicaría que en ese rebaño hay animales excretores de *C. burnetii* en leche, y que el rebaño ha padecido fiebre Q recientemente (Plummer et al., 2018). En la Tabla 5 se resumen algunos de los estudios de prevalencia de fiebre Q en ganado ovino y caprino, utilizando esta estrategia. Tal y como se observa en la tabla, en un estudio llevado a cabo en la CAPV se detectó un 22% de rebaños ovinos con ADN de *C. burnetii* en leche de tanque (García-Pérez et al., 2009). Este resultado fue similar al obtenido en ganado caprino en Holanda durante del brote de fiebre Q (20,5%) (van den Brom et al., 2015b).

Tabla 5. Resultados de algunos estudios de prevalencia de ADN de *C. burnetii* en muestras de leche de rebaños caprinos y ovinos en diferentes países.

País	Año	Nº rebaños analizados	Ganado	% rebaños positivos	Referencia
España	2005	154	ovino	22	(García-Pérez et al., 2009)
Irán	2008	20	caprino	5	(Rahimi et al., 2010)
Holanda	2008	292	caprino	32,9	(van den Brom et al., 2012)
Holanda	2009	401	caprino	20,5	(van den Brom et al., 2015b)
Portugal	2009-2013	39	ovino	5,1	(Anastácio et al., 2016)
Bélgica	2009-2013	123	caprino	6,3-12,1	(Boarbi et al., 2014)

En resumen, tal y como se ha podido observar a lo largo de este capítulo, la infección por *C. burnetii* está ampliamente distribuida por todo el mundo, con unas prevalencias tanto a nivel de rebaño, como a nivel individual, elevadas en algunos países, lo que demanda la necesidad de implantar medidas de control para evitar la aparición de casos y brotes humanos de fiebre Q. En la actualidad son pocos los países que han incluido a la fiebre Q dentro de sus programas de saneamiento ganadero (EFSA, 2010). En la CAPV, tal y como se ha mostrado, la prevalencia de *C. burnetii* es alta en los pequeños rumiantes, lo que supone una preocupación para la Salud Pública. Por ello, los responsables del saneamiento ganadero en la CAPV ya están dando los primeros pasos para el control de esta infección. Para ello es necesario investigar si la infección está activa en las explotaciones utilizando una serie de herramientas laboratoriales, que permitan conocer el estatus de infección en la población animal y la presencia de la bacteria en el entorno medioambiental de la explotación sospechosa, para, finalmente, interpretar de forma correcta los resultados.

II.4 Investigación de la infección por *C. burnetii* en los rebaños de pequeños rumiantes

En este apartado se incluyen diferentes estrategias de trabajo en el campo y de laboratorio para estudiar el estatus de infección en rebaños afectados por fiebre Q.

II.4.1 Investigación de la implicación de *C. burnetii* en los brotes de abortos

Para confirmar que los abortos de una explotación de pequeños rumiantes son a consecuencia de la infección por *C. burnetii* es imprescindible tomar muestras de placenta, ya que es el tejido que presenta las lesiones más relevantes y una mayor carga bacteriana (Agerholm, 2013; EFSA, 2010).

En el laboratorio, el examen microscópico de **frotis o improntas a partir de placentas**, permite visualizar bacterias de morfología compatible con *C. burnetii* mediante diversos métodos de tinción (OIE, 2018; Porter et al., 2011). Existen varios tipos de tinciones como la de Giménez (Giménez, 1964), la tinción de Stamp, que es el método más utilizado en diagnóstico veterinario, y otras como Macchiavello, Giemsa o Koster modificado (OIE, 2018). Este tipo de tinciones presenta una especificidad y sensibilidad bajas y existe el riesgo de confundir la presencia de *C. burnetii* con otras bacterias intracelulares como *Brucella* spp o *Chlamydophila abortus*, por lo que se necesita realizar posteriormente otros métodos de diagnóstico para confirmar la etiología de la enfermedad, como por ejemplo la técnica de PCR. Además *C. burnetii* tiene un tamaño pequeño que a veces hace que sea complicado detectar la infección cuando hay pocas bacterias, aunque esto no suele ser un problema en los casos de aborto por fiebre Q ya que hay millones de bacterias por gramo de placenta (OIE, 2018).

Los abortos causados por *C. burnetii* ocurren hacia el final de la gestación, y los fetos expulsados son aparentemente normales y sin lesiones aparentes, pero, tal y como se ha comentado, la placenta está muy alterada (Agerholm, 2013; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Por lo tanto, las **técnicas histopatológicas** se realizan principalmente con la placenta que es el órgano diana (Roest et al., 2012). La placentitis que tiene lugar tras la infección, parece ser la posible causa de los abortos, ya que se observan lesiones de inflamación severa y extensa, dominada por necrosis en cotiledones o en la zona intercotiledonaria, acompañada de exudado mucopurulento, hemorragia, vasculitis, edema y un gran número de neutrófilos (Agerholm, 2013).

Además de la observación de lesiones compatibles con fiebre Q, la presencia de *C. burnetii* puede ser confirmada en tejidos embebidos en parafina o frotis fijados en acetona mediante **técnicas de inmunohistoquímica**. Otra técnica descrita es la hibridación fluorescente in situ o FISH, que permite la detección de *C. burnetii* en tejidos embebidos en parafina, aplicado en placentas de rumiantes abortados, utilizando una sonda de oligonucleótidos específicos que se unen al ARN ribosomal 16S de *C. burnetii* (OIE, 2018).

II.4.2 Investigación de la infección por *C. burnetii* en un rebaño tras un brote de fiebre Q

Cuando se obtienen evidencias de la existencia de fiebre Q a partir de los resultados de los abortos, el siguiente paso a dar es hacer una evaluación del momento de la infección en el que se encuentra la explotación afectada para poner en práctica de forma rápida las medidas para su control. Es decir, averiguar el grado de distribución de la infección en el rebaño y si se trata de una infección reciente, ya que es importante para considerar las posibles pautas de control a recomendar, tal y como se verá más adelante.

II.4.2.1 Investigación del nivel de excreción de *C. burnetii* en la población animal

Para evaluar el estatus de infección por *C. burnetii* en un rebaño, es conveniente acudir en el momento del inicio de la paridera para tomar muestras a los animales abortados, si los hay, y a los recién paridos con objeto de comprobar el porcentaje de animales infectados que están excretando la bacteria por vía vaginal, por heces y leche. El tomar muestras de fluidos vaginales, heces y leche de 20-40 animales proporcionará una buena estimación del grado de infección en el rebaño. En estas muestras la técnica a aplicar es la PCR o *reacción en cadena de la polimerasa*, que a día de hoy es la técnica de diagnóstico directo por excelencia ya que es específica, sensible y rápida y además permite analizar un gran número de muestras, no solo de los productos de los abortos y otras muestras de origen animal, sino que también posibilita la detección de ADN de *C. burnetii* en muestras ambientales como polvo, suelo, agua y garrapatas (de Bruin, 2011; EFSA, 2010; Mori et al., 2017; OIE, 2018). A continuación se hace un resumen de algunas de las técnicas moleculares utilizadas para la detección y/o cuantificación de ADN de *C. burnetii*.

La PCR es un método desarrollado por Kary B. Mullis en los años 80 del siglo pasado, para la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ácidos nucleicos. Se basa en el uso de una enzima termo estable aislada de *Thermus aquaticus*, *Taq* DNA polymerase, que favorece la síntesis de una hebra de ADN complementaria a partir de una hebra modelo (Karcher, 1995). La reacción consiste en, primeramente, la desnaturalización de la doble cadena de ADN mediante calor (más de 90°C). Después, se baja la temperatura y los cebadores (secuencias de oligonucleótidos complementarios de una parte de las hebras molde) hibridan con las zonas homólogas, y por último se aumenta la temperatura para que la ADN polimerasa lleve a cabo la extensión de la nueva hebra partiendo de los cebadores mediante la adición de dNTPs. Estos 3 pasos se repiten generando por cada ciclo un número exponencial de copias que facilita la detección del agente (Karcher, 1995; Saiki et al., 1988).

Existen diferentes variantes de la técnica PCR. Además de la PCR convencional, descrita en el párrafo anterior, también se ha desarrollado la *touchdown PCR* para la detección de *C. burnetii* (Berri et al., 2000). Esta técnica parte de una temperatura de hibridación en el primer ciclo de PCR por encima de la temperatura de *melting*, en la que la mitad de las moléculas del cebador están unidas al ADN molde. Posteriormente, esa temperatura inicial baja en 4 ciclos sucesivos, 1 grado por ciclo, hasta una temperatura de hibridación más permisiva que es la que se mantiene durante los siguientes ciclos, evitando la amplificación de productos no específicos, y favoreciendo la interacción del cebador-molde (Berri et al., 2000; Korbie and Mattick, 2008). Otra variante es la PCR anidada o en nido (*nested PCR*), que consiste en dos reacciones de PCR, en la que la segunda reamplifica una región del amplicón inicial (Mares-Guia et al., 2018; Zhang et al., 1998). Con este tipo de reacciones hay más riesgo de contaminaciones con el producto amplificado (Fenollar and Raoult, 2004). Esta desventaja podría ser solventada con el uso de un protocolo de PCR anidada en un único tubo evitando de esta forma la apertura de los tubos entre la primera y la segunda amplificación, y que se basaría en el uso de dos pares de cebadores con diferentes temperaturas de hibridación (Fournier and Raoult, 2003; Parisi et al., 2006).

La PCR convencional ha ido sustituyéndose por la PCR a tiempo real, ya que obtiene un mayor rendimiento en menos tiempo, permite la reproducibilidad entre laboratorios, existe menor riesgo de contaminación ya que no se manipula el producto amplificado, y permite la cuantificación de *C. burnetii* en muestras biológicas (EFSA, 2010; Eldin et al., 2017; Fenollar and Raoult, 2004; Mori et al., 2017). La PCR a tiempo real más utilizada para *C. burnetii* ha sido la que se basa en sondas TaqMan, por su sensibilidad y especificidad (Heid et al., 1996; Jia, 2012). La sonda TaqMan, es una sonda que se une de forma específica a la secuencia que se va a amplificar y tiene un marcador fluorescente en el extremo 5' llamado *reporter* y otro en el 3' llamado *quencher*. La PCR necesita en este caso una *Taq* polimerasa con actividad exonucleasa

5'-3'. Durante la amplificación, cuando la polimerasa hidroliza la sonda, hace que se separen el *reporter* del *quencher* y es en ese caso, cuando están separados uno del otro, cuando se detecta la emisión de fluorescencia del *reporter*, siendo la señal proporcional a la cantidad de producto de PCR que se obtiene. En la PCR a tiempo real se dan 4 fases que son representados gráficamente: la fase lineal, fase exponencial temprana, fase exponencial (*log phase*) y fase de meseta. En la primera fase, la señal fluorescente no ha superado a la señal de fondo, pero en la segunda fase es en la que se define el Ct o *Cycle threshold* que es el número de ciclos en los que se detecta una señal fluorescente por encima del umbral de fondo, indicando la positividad de la muestra. El resultado de la PCR, por tanto, viene determinado por este valor de Ct, que es inversamente proporcional a la cantidad de ADN diana. En la tercera fase tiene lugar la amplificación de los productos de PCR, y en la cuarta apenas hay sustrato y la *Taq* polimerasa deja de hacer su función (Heid et al., 1996; Jia, 2012).

Para la detección de *C. burnetii* mediante técnicas de PCR, se han utilizado diferentes genes diana. Los más ampliamente utilizados han sido la secuencia de inserción multicopia *IS1111*, y otros genes de única copia (*sodB*, *comI*, *htpA* y *htpB*, *icd*, *cbmip*, entre otros) que codifican para diferentes proteínas (EFSA, 2010; Mori et al., 2017; OIE, 2018). La utilización, como diana, de genes multicopia como el *IS1111* proporciona una ventaja a la hora de la detección ya que aumenta la sensibilidad del ensayo (de Bruin, 2011), pudiendo detectar bajas cargas bacterianas (Eldin et al., 2017). Pero a la hora de cuantificar la cantidad de *C. burnetii* en muestras problema es mejor utilizar los genes de copia única (OIE, 2018). La secuencia *IS1111* de la cepa Nine Mile tiene 20 copias, pero según el aislado podría haber entre 7 y 110 copias (Klee et al., 2006). Otro elemento repetitivo utilizado es el IS30A, pero resultó ser menos sensible que *IS1111* (Eldin et al., 2013).

La técnica de PCR puede verse afectada por la existencia de posibles inhibidores en las muestras problema, dando lugar a falsos negativos (Berri et al., 2000), por lo que se necesita tener un buen protocolo de extracción de ADN para la eliminación de esas sustancias inhibitoras, además de incluir controles internos para poder controlar la eficiencia de la extracción y, confirmar así que la reacción de PCR se ha llevado a cabo sin problemas (de Bruin, 2011). Además, en el procesado de las muestras pueden ocurrir contaminaciones cruzadas, por lo que la introducción de controles negativos cada 5-10 muestras ayuda a detectar las posibles contaminaciones. Esos controles negativos han de tratarse de forma paralela a las muestras problema (Fenollar and Raoult, 2004). Además se recomienda analizar las muestras lo antes posible (Guatteo et al., 2007), especialmente las que tienen bajas cargas bacterianas, que podrían alterarse durante el almacenaje, evitando de esta forma la obtención de resultados falsos negativos.

Existen diferentes estudios que han estudiado el estatus de infección de los rebaños de pequeños rumiantes afectados por fiebre Q y en los que se han estudiado mediante métodos moleculares el porcentaje de animales excretores y los niveles de excreción de *C. burnetii*, así como la cinética de la excreción bacteriana en el transcurso de la paridera (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b; Astobiza et al., 2013; Berri et al., 2001; Berri et al., 2002; Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007; Canevari et al., 2018; Joulié et al., 2015; Rodolakis et al., 2007).

II.4.2.2 Investigación de la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii*

La detección de anticuerpos frente a *C. burnetii* indica que los animales han estado expuestos a la infección o han tenido contacto previo con bacteria (Plummer et al., 2018). En estudios experimentales realizados en ganado caprino se ha demostrado que a los 21 días post-infección se comienzan a detectar los anticuerpos, con máximos en torno a la semana 5-6 post-infección y con una progresión ascendente hasta el final del experimento (14-15 semanas) (Arricau-Bouvery et al., 2003; Arricau-Bouvery et al., 2005).

En la infección por *C. burnetii* se ha observado que un porcentaje (25-50%) de animales infectados y que han excretado la bacteria por alguna de las vías, no seroconvierten (Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a; de Cremoux et al., 2012a; Reichel et al., 2012; Rousset et al., 2009a). Por lo tanto, la evaluación de la respuesta inmune humoral es compleja en algunos casos, y tiene escaso valor a nivel individual (EFSA, 2010). La ausencia de anticuerpos en animales infectados podría achacarse a un fallo en la respuesta inmune humoral (Berri et al., 2001). También cabría la posibilidad de que sea debido a un problema de sensibilidad de las técnicas utilizadas, o a la naturaleza de los antígenos utilizados en los kits serológicos (Berri et al., 2001).

Coxiella burnetii puede presentar 2 formas antigénicas diferentes, la fase I y la fase II, generándose anticuerpos específicos de fase. La presencia de éstos últimos en rumiantes está poco estudiada debido a que las técnicas serológicas disponibles comercialmente no discriminan entre los anticuerpos de un tipo u otro (OIE, 2018). En una infección experimental realizada por Roest et al. (2013b) se inoculó la cepa de *C. burnetii* causante del brote en Holanda por vía intranasal a un grupo de cabras gestantes y a las 2-3 semanas se detectaron anticuerpos de fase II (IgM e IgG), y en menor medida anticuerpos IgM de fase I. Posteriormente, los anticuerpos IgM de fase II sufrieron un descenso que se mantuvo estable hasta el final del estudio, mientras que los IgG en fase II siguieron subiendo hasta la semana 10 y se mantuvieron estables hasta la semana 13. En el caso de los anticuerpos IgG anti-fase I comenzaron a

detectarse en la semana 6 después de la inoculación y tanto estos como los IgM de fase I se mantuvieron hasta la semana 13 post-inoculación, en que concluyó el estudio (Roest et al., 2013b). La duración total de la respuesta humoral no pudo determinarse ya que el seguimiento de los animales experimentales duró alrededor de 3 meses (Roest et al., 2013b), sin embargo los diferentes estudios realizados en rumiantes indican que la presencia de anticuerpos puede durar varios meses e incluso años (Berri et al., 2002; Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007; Roest et al., 2013b; van den Brom et al., 2015a).

Las técnicas serológicas más utilizadas para la detección de anticuerpos frente a *C. burnetii* son la inmunofluorescencia indirecta (*indirect immunofluorescence assay* o IFA), el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay* o ELISA) y la técnica de Fijación de Complemento (*complement fixation test* o CFT) (OIE, 2018). La técnica IFA se aplica por lo general en el diagnóstico de casos de fiebre Q humanos. Permite distinguir entre anticuerpos en fase I o fase II, que dan idea de la progresión de la infección. Hay kits comerciales que detectan inmunoglobulinas IgM o IgG, en fase I o fase II, y un aumento en el título de los anticuerpos, en dos tomas de muestras realizadas en el intervalo de 2-3 semanas, indicaría seroconversión (EFSA, 2010; Fournier et al., 1998; Herremans et al., 2013; Porter et al., 2011; Tissot-Dupont et al., 1994).

En el campo veterinario se utilizan las técnicas CFT y ELISA, pero ésta última es más sensible y específica (Horigan et al., 2011; Kittelberger et al., 2009; Rousset et al., 2007). Aunque CFT ha sido la técnica de referencia para el diagnóstico de abortos en rumiantes (EFSA, 2010; OIE, 2018), actualmente está en desuso y la técnica ELISA es el método elegido para hacer un diagnóstico tanto a nivel de explotación, como para estudios epidemiológicos (Fournier et al., 1998; OIE, 2018). Algunos kits de ELISA comerciales, contienen antígeno de cepas aisladas de rumiantes y otros contienen antígeno de la cepa de referencia Nine Mile aislada de garrapatas (EFSA, 2010; Porter et al., 2011).

Respecto a la comparación entre ELISA e IFA, se obtienen resultados similares con las dos técnicas, aunque el ELISA muestra una sensibilidad mayor (Field et al., 2000; Rousset et al., 2007). ELISA detecta una mezcla de anticuerpos frente a fase I como a fase II, mientras que la técnica IFA puede diferenciar IgG e IgM en fase I o fase II (EFSA, 2010; Fournier et al., 1998; OIE, 2018; Porter et al., 2011), sin embargo, no hay kits comerciales que permitan distinguir los anticuerpos de ambas fases en rumiantes domésticos.

Tal y como se ha comentado previamente, la serología individual no tiene validez en el diagnóstico de *C. burnetii* ya que como se ha visto, existe un porcentaje de animales infectados que no seroconvierten (EFSA, 2010; Plummer et al., 2018), por ello hay que tomar muestras de suero de un porcentaje de los animales de la explotación y sacar conclusiones sobre el estatus de

infección de *C. burnetii* en función de la tasa de seroprevalencia observada. Así, seroprevalencias entre 30-50% pueden ser indicadoras de una infección activa y reciente (Berri et al., 2001; Berri et al., 2005b; EFSA, 2010).

Por otro lado, tal y como se ha comentado también en el capítulo anterior, se ha observado una buena correlación entre los resultados serológicos obtenidos en suero sanguíneo y los resultados obtenidos en la leche, tanto individual como de tanque (Joulié et al., 2017a; Ruiz-Fons et al., 2011). Por este motivo, algunos kits de ELISA comerciales han sido desarrollados con el fin de poder detectar la presencia de anticuerpos frente a *Coxiella* en leche.

II.4.3 Investigación de los genotipos de *C. burnetii* relacionados con los brotes de fiebre Q y caracterización de cepas

El genotipado de las cepas de *C. burnetii* permite conocer los genotipos que son causantes de enfermedad tanto en animales como en humanos, al mismo tiempo que permite saber qué genotipos están relacionados con una determinada especie animal o si puede haber genotipos compartidos entre diferentes especies. El genotipado nos da la opción de conocer qué cepas están circulando en un momento determinado en una explotación. En estudios recientes realizados en Bélgica, Holanda y Francia, se demostró que puede haber más de un genotipo en una misma explotación, y además, algunos de estos genotipos son compartidos entre diferentes especies de rumiantes domésticos (Boarbi et al., 2014; Dal Pozzo et al., 2016; Huijsmans et al., 2011; Joulié et al., 2015).

El estudio de los genotipos de *Coxiella* permite conocer la posible fuente de infección de los brotes de fiebre Q (Massung et al., 2012; Mori et al., 2017). Las técnicas desarrolladas más recientemente y más ampliamente utilizadas son MST (*Multispacer Sequence Typing*) (Glazunova et al., 2005), MLVA (*Multilocus variable number of tandem repeats - VNTR - analysis*) (Arricau-Bouvery et al., 2006; Svraka et al., 2006), y SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Huijsmans et al., 2011). Estos tres métodos son técnicas basadas en PCR que permiten utilizar directamente el ADN de muestras clínicas y medioambientales sin necesidad de aislamiento previo en medio de cultivo (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011).

La técnica **MST (*Multispacer Sequence Typing*)** se basa en el análisis de secuencias intergénicas (espaciadores) del genoma, situadas entre dos marcos de lectura abiertos (ORF) (Glazunova et al., 2005). Debido a la baja presión selectiva que sufren estas regiones no codificantes, son más variables que los genes codificantes adyacentes, pudiendo sufrir mutaciones (incluso en un único nucleótido), inserciones o deleciones. Las 10 secuencias

analizadas en esta técnica permitieron diferenciar 30 genotipos entre 173 aislados de *C. burnetii*, clasificándolos en 3 grupos monofiléticos. La clasificación permitió apreciar una distribución geográfica de algunos de los aislados de *C. burnetii*, además de la existencia de una correlación parcial entre los 3 grupos y el tipo de plásmido (Glazunova et al., 2005). Existe una base de datos de MST que ha sido creada por el IHD-Méditerranée Infection, y contiene los perfiles obtenidos de las diferentes cepas analizadas, habiendo a día de hoy un total de 72 genotipos (http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/groups.html). Con esta información se han creado mapas de distribución de los genotipos MST de *C. burnetii* (D'Amato et al., 2016; Eldin et al., 2017). En el artículo publicado por Eldin et al. (2017) se puede comprobar cuál es la distribución de los diferentes genotipos MST de *C. burnetii* en diferentes países europeos. En lo que respecta a España, parece que existen genotipos comunes a los identificados en otros países de la cuenca Mediterránea.

Otra técnica utilizada ampliamente es la técnica **MLVA (Multilocus variable number of tandem repeats – VNTR - analysis)** que consiste en el análisis de las variaciones que se dan en el número de repeticiones de secuencias del ADN que se repiten en tándem, y que están localizadas en diferentes *loci* del genoma (Arricau-Bouvery et al., 2006; Svraka et al., 2006). Se ha utilizado sobre todo en Europa y en concreto con muestras de rumiantes, tanto en estudios epidemiológicos como en la investigación de brotes de fiebre Q (Eldin et al., 2017; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). En el trabajo de Svraka et al. (2006), a partir de 21 aislados, se obtuvieron 9 genotipos MLVA mediante el análisis de 7 *loci*, mientras que en el estudio de Arricau-Bouvery et al. (2006), a partir de 42 cepas de *C. burnetii*, y se diferenciaron un total de 36 genotipos MLVA mediante el análisis de 17 *loci*. La técnica MLVA tiene pues un gran poder de discriminación (Arricau-Bouvery et al., 2006; Massung et al., 2012), y además, a diferencia de la técnica MST, es menos laboriosa y no requiere secuenciación (Svraka et al., 2006). Sin embargo, la técnica MLVA, se basa en la electroforesis capilar, lo que da lugar a discrepancias entre laboratorios en el tamaño estimado de los marcadores, lo que afecta al número de repeticiones, y además, los diferentes grupos de investigación utilizan diferentes marcadores y protocolos. Todo ello hace que la reproducibilidad de la técnica entre laboratorios sea complicada, por lo que existe una falta de estandarización y consenso del método (Arricau-Bouvery et al., 2006; Eldin et al., 2017; Massung et al., 2012; Svraka et al., 2006). Además, pueden aparecer problemas debidos al tipo de muestra, la calidad de ésta y a su manipulación, dando lugar a errores en la amplificación y a perfiles incompletos, lo que complica la interpretación de los resultados (Sidi-Boumedine et al., 2015). A pesar de estos inconvenientes, actualmente existe la web *MLVAbank* en la que se van recopilando los resultados obtenidos en

los diferentes estudios realizados hasta el momento (<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/966>).

En un estudio realizado con la técnica MLVA, a partir de muestras recogidas entre los años 2006 y 2015 y procedentes de cabras, ovejas y vacas abortadas, se diferenciaron 3 grupos de genotipos divididos en 12 subgrupos (Joulié et al., 2017b). Salvo algunas excepciones, los genotipos asociados con los pequeños rumiantes se englobaron dentro de los grupos A y B, mientras que casi todos los genotipos del ganado bovino fueron clasificados en un tercer grupo (grupo C) coincidiendo con lo hallado previamente en otros trabajos que sugieren que en el ganado bovino predominan cepas exclusivas de esta especie (Astobiza et al., 2012b; Joulié et al., 2017b; Piñero et al., 2014b; Piñero et al., 2015). Algunos genotipos fueron encontrados solamente en ciertas regiones y se detectó cierta estabilidad con el paso del tiempo en el caso de algunos genotipos. Y aunque se observaron variaciones genotípicas dentro de una misma explotación, esos genotipos siempre estaban dentro del mismo grupo (Joulié et al., 2017b). Esa estabilidad en tiempo y espacio puede ser debida a la resistencia de las diferentes cepas de *Coxiella* en el ambiente (polvo y estiércol), al tipo de manejo de los rebaños, si existe o no movimiento de animales entre diferentes zonas, y a la velocidad de cambio del genoma de la bacteria (Joulié et al., 2017b).

Otra técnica más reciente es el genotipado **SNP (Single Nucleotide Polymorphism)** (Huijsmans et al., 2011), puesta a punto por un grupo holandés. Tras comparar 5 secuencias de genoma completo de *C. burnetii* disponibles en la base de datos GenBank (RSA493, RSA331, CbuG_Q212, Cbuk_Q154, and 5J108 III Dugway) se seleccionaron 10 polimorfismos de una sola base nucleotídica en diferentes *loci* del genoma, lo que permitió diseñar sondas específicas. Así, Huijsmans et al. (2011) diferenciaron 9 genotipos SNP entre 28 cepas de referencia de *C. burnetii*, entre las cuales estaban representados 14 genotipos MLVA diferentes. Tres de los 10 polimorfismos analizados se encontraban en la secuencia de inserción multicopia *ISIII* y los otros siete estaban localizados en diferentes genes de única copia del genoma de la bacteria (Huijsmans et al., 2011). Diversos autores han utilizado la técnica SNP para genotipar *C. burnetii* presente en muestras animales y medioambientales (Dal Pozzo et al., 2016; Hermans et al., 2011; Huijsmans et al., 2011; Hurtado et al., 2017). La técnica SNP es menos discriminatoria que MLVA y MST, pero es sensible, rápida y menos costosa, y la interpretación de los resultados es más sencilla, además de que hay menor riesgo de contaminación ya que no se requiere la manipulación de producto amplificado (Huijsmans et al., 2011; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011).

La técnica de MST (Glazunova et al., 2005) modificada por Hornstra et al. (2011), ha dado lugar a un ensayo más robusto, menos caro, más rápido, y útil cuando existe escasa

cantidad de ADN, además de poder comparar sus resultados entre laboratorios con facilidad. El ensayo se basa en el análisis de 14 SNPs mediante PCR a tiempo real, y ha clasificado 70 aislados en 35 genotipos MST y en 6 grupos genómicos (Hornstra et al., 2011) previamente descritos por Hendrix et al. (1991).

Otro método de genotipado incluido en los denominados “de alta resolución” (Massung et al., 2012), es el *ISIII typing*. Según la cepa de *C. burnetii* de que se trate, en su genoma existe un número diferente de copias del elemento de inserción *ISIII* (Klee et al., 2006), y partiendo de la base que hay diferencias entre algunos de esos elementos (Hoover et al., 1992), esta técnica permitió clasificar 14 aislados de *C. burnetii* en 5 grupos genómicos, encontrando una buena correlación con los grupos genómicos diferenciados por Hendrix et al. (1991) (Denison et al., 2007).

Otros métodos, como la técnica IRS-PCR (*Infrequent Restriction Site-PCR*), se basan en la digestión del genoma con enzimas de restricción y en la posterior amplificación de regiones de los fragmentos resultantes, obteniendo un patrón de bandas determinado (Arricau-Bouvery et al., 2006; Mazurek et al., 1996). A pesar de presentar concordancia con la técnica MLVA, la técnica IRS-PCR resultó ser menos discriminatoria, diferenciando 14 aislados de *C. burnetii* en 6 grupos, frente a los 11 genotipos obtenidos en MLVA (Arricau-Bouvery et al., 2006). Por otro lado, la técnica RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) consiste en el análisis de fragmentos de ADN amplificados al azar (Sidi-Boumedine et al., 2009). Sin embargo, la dificultad de interpretar los resultados, y la falta de reproducibilidad entre laboratorios, así como el hecho de ser técnicas menos discriminatorias que las ya existentes, hace que no sean utilizadas.

En España existen pocos trabajos en los que se hayan genotipado muestras de rumiantes domésticos (Astobiza et al., 2012b; González-Barrío et al., 2016; Hurtado et al., 2017; Jado et al., 2012; Piñero et al., 2014b; Piñero et al., 2015). En un primer estudio se analizó el genotipo de diferentes tipos de muestras obtenidas en explotaciones de rumiantes (muestras animales y ambientales) mediante las técnicas MLVA y MST (Astobiza et al., 2012b) y se obtuvo una alta variabilidad ya que se identificaron 11 genotipos MLVA que correspondieron a 4 genotipos MST. El genotipo MST13 lo compartían las 3 especies de rumiantes domésticos, los pequeños rumiantes el MST8, mientras que otros genotipos fueron solamente detectados en ganado caprino (MST18) o vacuno (MST20). En este estudio también se detectaron genotipos diferentes en una misma explotación (Astobiza et al., 2012b).

Paralelamente, en el trabajo realizado por Jado et al. (2012) para la caracterización molecular de *C. burnetii* mediante la técnica de PCR y RLB (*Reverse Line Blot hybridization assay*) a partir de muestras humanas, animales o ambientales procedentes de diversas zonas de

España, se identificó un total de 10 genotipos diferentes. La técnica clasificó los 16 genotipos diferentes de *Coxiella* disponibles en el estudio, en 8 grupos genómicos (GG I al GG VIII). Las muestras problema de origen ovino se englobaron dentro de los grupos GG I, II, III, IV and VIII y las de caprino en los GG III, IV y VIII. Las muestras humanas se englobaron en los grupos GG I, IV, VII y VIII. En el GG III, se incluían las muestras de origen bovino, y algunas ovinas y caprinas, pero no muestras humanas. Estos resultados sugieren que el ganado ovino y caprino serían principalmente los responsables de la transmisión de *C. burnetii* a humanos en España (Jado et al., 2012).

En lo que respecta a otros países, durante el brote de Holanda, se detectaron 13 genotipos MLVA a partir de muestras de rumiantes domésticos que habían sufrido abortos. El genotipo CbNL01 fue el genotipo asociado al brote humano de fiebre Q, y fue detectado de forma mayoritaria en el ganado caprino y de forma puntual en el ovino, seguido en frecuencia por el genotipo CbNL10 aislado en ambas especies (Roest et al., 2011b). El genotipo CbNL01 MLVA de Roest et al. (2011b), correspondió con el SNPI (Mori et al., 2013) y el MST33 (Tilburg et al., 2012). Este genotipo fue detectado también en un estudio de prevalencia de *C. burnetii* en leche de tanque de explotaciones caprinas de Bélgica (Boarbi et al., 2014). El genotipo MST33 ha sido además aislado en ganado ovino en Alemania y en muestras clínicas humanas en Francia (https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html), pudiendo haberse extendido desde Alemania a los Países Bajos a través de Francia (D'Amato et al., 2014). Recientemente, el genotipo MST33 ha sido detectado también en el ganado caprino en el Reino Unido (Hemsley et al., 2019). De momento este genotipo no se ha detectado en España.

Por otro lado, Pearson et al. (2014) infirieron una relación entre los genotipos hallados por Huijsmans et al. (2011) y Tilburg et al. (2012), que indicaba que los genotipos SNP 1, 2, 4, 5 y 8 corresponderían a los genotipos MST ST33, ST20, ST20, ST8 y ST18, respectivamente.

En otros brotes de fiebre Q humana relacionados con pequeños rumiantes, se identificaron los genotipos MST8 y MST18. El MST8 fue detectado en el brote ocurrido en Estados Unidos relacionado con ganado caprino y que afectó a 21 personas (Kersh et al., 2013), y el MST18 en un brote relacionado con el ganado ovino en Hungría, y que afectó a 70 personas (Gyuranecz et al., 2014).

En el brote que ocurrió en el País Vasco en 2014 entre los trabajadores de una planta de tratamiento de basuras, el estudio de genotipado (genotipo MLVA AE) sugería que la fuente más probable de infección había sido el ganado caprino (Alonso et al., 2015). Posteriormente, también el País Vasco, mediante el análisis de genotipado se pudo determinar que la fuente de infección de un brote de fiebre Q en trabajadores de una fábrica de polipastos y cadenas tuvo también su origen en el ganado caprino (SNP8 y MST18) (Hurtado et al., 2017). Recientemente,

en el último brote ocurrido entre los trabajadores de una empresa de transportes en el País Vasco, se sospechó que la fuente de infección pudo ser el ganado caprino, y el genotipo detectado fue el SNP1/MST13 (Alonso et al., 2019).

Las diferentes técnicas de caracterización y tipado de *Coxiella burnetii* desarrolladas a lo largo de los últimos años han servido para el mejor conocimiento de la fiebre Q. Tal y como se ha detallado, estas técnicas han generado diferentes clasificaciones de los genotipos, han mostrado la variabilidad genética de las diferentes cepas de *Coxiella* circulantes, además de proporcionar información sobre la diversidad existente en una región o país, sobre las cepas que infectan a humanos y animales y sobre las cepas que son compartidas entre especies (Adzitey et al., 2013; Eldin et al., 2017; González-Barrío et al., 2016; Jado et al., 2012; Massung et al., 2012). No obstante, lo ideal sería realizar la secuenciación del genoma completo (Hemsley et al., 2019; Kuley et al., 2016; Millar et al., 2017; Seshadri et al., 2003; Walter et al., 2014), lo que permitiría poder comparar las diferentes cepas de *Coxiella* con técnicas como la hibridación genómica comparativa (CGH) basada en microarrays de genoma completo, y así poder explicar las diferencias biológicas existentes entre cepas, e incluso las diferencias existentes con otras bacterias (Beare et al., 2006; Beare et al., 2009; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). De momento la secuenciación masiva no se hace de forma rutinaria debido al conocimiento especializado que precisa, el coste económico que conlleva, y la dificultad en la obtención de ADN de alta calidad y libre de células hospedadoras (Mori et al., 2017). Solamente hay 14 genomas completos descritos hasta la fecha para *C. burnetii* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/543>), y del resto de cepas existentes, de las cuales no está disponible todo el genoma, se va recopilando la información parcial que se va obteniendo (Mori et al., 2017).

También existen otros métodos de caracterización de las cepas de *Coxiella*, como el estudio de los plásmidos. Se han descrito 4 plásmidos diferentes en *C. burnetii* (QpHI, QpRS, QpDV y QpDG) y una secuencia homóloga a un plásmido integrado en el cromosoma (cepas *plasmidless*) (Jager et al., 2002; Samuel et al., 1985; Valkova and Kazar, 1995; Willems et al., 1997), lo que ha permitido clasificar los aislados de *C. burnetii* en 5 grupos genómicos. Al inicio, se creía que existía una correlación entre el tipo de plásmido y las manifestaciones clínicas (asociando el plásmido QpHI a la fiebre Q aguda y el QpRS a la crónica) (Hendrix et al., 1991; Samuel et al., 1985). Sin embargo, esa idea no ha sido apoyada en estudios posteriores, ya que, tras analizar nuevas muestras no siempre se ha detectado el plásmido QpHI en las formas agudas de la enfermedad, si no que se ha detectado también en casos crónicos (Stein and Raoult, 1993; Thiele and Willems, 1994). También se han identificado nuevos plásmidos, como el QpDV, asociado a ambas formas de enfermedad (Valkova and Kazar, 1995).

Años más tarde, en 2005, la presencia del gen *adaA* (*acute disease antigen A*), que codifica a una proteína de membrana externa de *C. burnetii* (Zhang et al., 2005a), fue asociada a las formas agudas de fiebre Q y su ausencia a las formas crónicas. Sin embargo, recientemente se ha visto que existen 5 variantes genómicas del gen *adaA*: gen “wild-type”, una variante con repetición en tándem, otra con la presencia de un SNP y dos con diferentes deleciones, que se han detectado tanto en aislados de casos agudos como de casos crónicos poniendo en duda la asociación (Frangoulidis et al., 2013), además de haber detectado la ausencia del gen en aislados de casos agudos (Frangoulidis et al., 2013; Jado et al., 2012). La presencia de este gen, *adaA*, sí que mostró una correlación con la presencia de determinados plásmidos, así, toda cepa positiva al gen *adaA* tenía presente el plásmido QpHI, exceptuando el caso de la cepa Dugway positiva a *adaA*, pero con el plásmido QpDG. Mientras que las cepas con plásmido QpRS fueron *adaA* negativo, y coincidían con casos crónicos de enfermedad (Frangoulidis et al., 2013).

Entre otras técnicas para caracterizar las diferentes cepas de *C. burnetii*, se encuentra la técnica PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*), que se basa en la digestión del genoma de *C. burnetii* con las enzimas de restricción *EcoR* y *Bam*HI, para el estudio de polimorfismos, visualizados mediante la técnica de electroforesis SDS-PAGE. En función de la longitud de los fragmentos generados las cepas se clasifican en 6 grupos con plásmidos diferentes (los aislados de los grupos I, II y III mostraban el plásmido QpHI, los aislados del grupo IV tenían el QpRS, el V era “plasmidless” y el VI el plásmido QpDG) (Hendrix et al., 1991). Posteriormente, la implementación de la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE), y el uso de otras enzimas de restricción, como *Not*I, generaron mapas del genoma de *C. burnetii* obteniendo un mayor número de patrones de restricción cuando se incluyeron en el estudio aislados de animales y humanos de todo el mundo (Heinzen et al., 1990; Jager et al., 1998; Thiele et al., 1993). Estas clasificaciones están actualmente en desuso debido a varios motivos: la necesidad de realizar cultivo previo de las cepas de *C. burnetii*, la dificultad de comparar los perfiles generados con cientos de fragmentos obtenidos, la falta de reproducibilidad entre laboratorios, y por su escaso poder de discriminación (D'Amato et al., 2016; Massung et al., 2012; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011).

La secuenciación de genes como *comI*, *mucZ* (*djlA*) o *icd*, ha permitido también diferenciar los aislados de *C. burnetii*. En el caso de *comI*, tras el análisis de 21 aislados, se identificaron 4 grupos de cepas (Zhang et al., 1997), y más tarde en un estudio realizado con el análisis conjunto de *comI/mucZ*, a partir de 37 aislados se describieron 5 grupos (Sekeyova et al., 1999). En esta última clasificación no se observó correlación alguna entre los grupos hallados y el origen geográfico o el curso de la enfermedad (fiebre Q aguda o crónica), a diferencia de lo que ocurría con el análisis de *comI*, en el que los grupos establecidos parecían estar

relacionados con la patogenicidad de los aislados (Zhang et al., 1997). Respecto al gen *icd*, se analizaron 19 aislados que se clasificaron en 3 grupos, el primero constituido por aislados de casos agudos, y los otros dos con aislados de fiebre Q crónica (Nguyen and Hirai, 1999). Sin embargo, para considerar la secuenciación de estos genes como una técnica robusta y útil para el diagnóstico y caracterización de la infección por *C. burnetii*, y para la clasificación de los diferentes aislados de *C. burnetii*, sería necesario analizar un mayor número de muestras.

II.4.4 Investigación de la infección por *C. burnetii* en el entorno medioambiental de la explotación

Debido a la importancia de la vía aerógena en la transmisión de la fiebre Q en humanos, el estudio de la presencia de esta bacteria en el medio ambiente (polvo y aerosoles) es fundamental para conocer el riesgo de infección (Clark and Soares Magalhaes, 2018). En explotaciones afectadas por fiebre Q, se ha detectado ADN de *C. burnetii* en muestras ambientales durante largos periodos de tiempo (Astobiza et al., 2011a; Joulié et al., 2015; Kersh et al., 2013), existiendo una buena correlación de la carga bacteriana ambiental con el número de ovejas excretoras de *C. burnetii* (Astobiza et al., 2011b; Joulié et al., 2015). La positividad obtenida en el análisis de estas muestras ambientales mediante la técnica de PCR indica la presencia de ADN de *C. burnetii*, pero es difícil interpretar el significado de estos hallazgos y saber si la detección de ADN va pareja a la viabilidad de la bacteria (Kersh et al., 2010b; Kersh et al., 2013). Así, en un estudio realizado en Estados Unidos sobre la presencia de *C. burnetii* en el medio ambiente (Kersh et al., 2010b), se detectó ADN de *Coxiella* en el polvo recogido en diferentes localizaciones donde había ganado (granjas, hospitales veterinarios,...), así como en zonas urbanas (bancos, comercios, colegios), confirmándose en varios casos la viabilidad de la bacteria.

Durante el brote de fiebre Q que padecieron en Holanda en el periodo 2007-2010, los estudios medioambientales realizados hallaron una alta prevalencia de *C. burnetii* en aerosoles y polvo, llegando a detectar en algunos casos el 100% de positividad en zonas y periodos de mayor actividad ganadera. También se detectó una mayor positividad dentro de las instalaciones que en el exterior de las mismas (de Bruin et al., 2011; de Bruin et al., 2012; de Bruin et al., 2013; de Rooij et al., 2016; Hogerwerf et al., 2012; Whelan et al., 2012). Así mismo, se detectó ADN de *C. burnetii* en muestras ambientales de explotaciones en las que no se habían registrado abortos por fiebre Q y que no habían mostrado positividad ni en los análisis serológicos, ni en los análisis moleculares realizados en la leche de tanque (de Bruin et al., 2012).

Un estudio reciente realizado en Francia (Carrié et al., 2019) demostró que el ADN de *C. burnetii* estaba presente en el polvo del 75% de las explotaciones ovinas y del 68% de las explotaciones caprinas estudiadas, mientras que únicamente el 18% de las explotaciones de ganado bovino eran positivas a la presencia de *Coxiella*. Lo más interesante de este estudio es que, tras cuantificar los GE de *C. burnetii* en las muestras positivas, se observó que un 15% de las explotaciones (11 rebaños ovinos y 5 caprinos) mostraron elevadas cargas bacterianas ($>10^8$ GE), y de éstas, el 75% eran sospechosas de haber pasado un brote reciente de fiebre Q. Por lo tanto, la toma de muestras ambientales es extremadamente interesante para tener una idea, en primer lugar, de la distribución de *Coxiella* en las explotaciones de rumiantes domésticos, y en segundo lugar, para identificar los rebaños en los que puede existir una infección activa por fiebre Q.

II.4.5 Investigación de la viabilidad de *C. burnetii*

El aislamiento de *C. burnetii* a partir de muestras problema es la mejor opción para demostrar que la infección está activa, y que la bacteria es viable. No obstante el **cultivo y aislamiento de *C. burnetii*** no se realiza de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico debido a la complejidad de la técnica, y a que precisa de instalaciones con nivel de bioseguridad 3. Además, el éxito de estas técnicas depende de la calidad de la muestra, ya que las muestras tomadas de animales abortados (placentas, fluidos, etc), a pesar de albergar una elevada carga de *C. burnetii*, están altamente contaminadas (Fournier et al., 1998; Mori et al., 2017).

Existen varias opciones para el aislamiento de *C. burnetii* como son el uso de huevos embrionados y los cultivos celulares convencionales (OIE, 2018). En el caso de disponer de muestras con poca carga bacteriana, o de tejidos muy contaminados, se puede hacer un pase previo en animales de laboratorio, que de alguna manera actúan como un sistema de filtración eliminando el resto de microorganismos presentes, y permitiendo la multiplicación de *C. burnetii* en sus tejidos (Mori et al., 2017; OIE, 2018; Roest et al., 2013a). Cuando se precisa el uso de animales de laboratorio, las cobayas y los ratones son los más apropiados (Lagier et al., 2015; Mori et al., 2017; OIE, 2018). Tras la inoculación de la muestra problema, *C. burnetii* se puede multiplicar en bazo, hígado y pulmón dependiendo de la ruta de infección elegida (intraperitoneal o intranasal) (Maurin and Raoult, 1999; Mori et al., 2017; OIE, 2018; Oyston and Davies, 2011). En el caso de los ratones, la susceptibilidad a la infección dependerá de la cepa de ratón elegida (Oyston and Davies, 2011). Así, las cepas A/J y SCID muestran una mayor sensibilidad a la infección, y pueden desarrollar signos severos de enfermedad, o incluso puede ocasionarles la muerte. Sin embargo, los ratones BALB/c y C57BL/6 muestran signos más leves

tras la infección y no se mueren (Eldin et al., 2017; Lockhart et al., 2012), por lo que los ratones BALB/c han sido la cepa de elección en diversos estudios de viabilidad de *C. burnetii* en muestras medioambientales (Kersh et al., 2010b; Kersh et al., 2013; Kersh et al., 2016) así como en productos lácteos (Eldin et al., 2013; Hirai et al., 2012; Loftis et al., 2010). Las cepas de ratón más susceptibles a la infección (SCID o A/J) o las cobayas (éstas últimas son en general más proclives a desarrollar fiebre Q), son normalmente utilizadas como modelos de infección y en estudios de patogenicidad y virulencia de cepas de *C. burnetii*, así como en pruebas de eficacia de antibióticos y vacunas (Eldin et al., 2017; Long et al., 2019; Maurin and Raoult, 1999; Melenotte et al., 2019; Oyston and Davies, 2011).

La inoculación de muestras problema en huevos embrionados ha sido uno de los métodos clásicos de cultivo de *C. burnetii*. La inoculación ha de realizarse en huevos libres de patógenos de 5-7 días de edad e incubados a 35°C, comprobando la ausencia de contaminación y la presencia de *C. burnetii* a los 10-15 días post-infección, mediante tinción o PCR de los sacos vitelinos (Lagier et al., 2015; Mori et al., 2017; OIE, 2018). Este método de cultivo muestra una alta susceptibilidad a la contaminación, falta de sensibilidad, y además tiene la dificultad añadida de poder disponer de huevos embrionados libres de antibióticos, por lo que es un procedimiento que se ha ido sustituyendo por otros protocolos *in vitro* u otras técnicas *in vivo* (Lagier et al., 2015).

En cuanto a los cultivos celulares, existen diferentes líneas celulares eucariotas, basadas en macrófagos, fibroblastos o células epiteliales, por ejemplo, y en las que *C. burnetii* puede multiplicarse (células Vero, DH82, L929, XTC-2, P388D1, J774). Sin embargo, las diferentes líneas pueden mostrar diferente sensibilidad y susceptibilidad para la infección según la cepa de *C. burnetii* (Lagier et al., 2015; Lockhart et al., 2012; Lockhart et al., 2013). Los fibroblastos pulmonares embrionarios humanos (células HEL) se han utilizado por su fácil mantenimiento y por presentar una susceptibilidad alta a la infección por *C. burnetii* que se inocule (Lagier et al., 2015; Raoult et al., 1990). Las células L929 (fibroblastos murinos) y las células Vero (células epiteliales del riñón de mono) también son dos líneas celulares muy utilizadas (OIE, 2018). Las células Vero han sido descritas junto a las HEL como las líneas celulares de mamíferos más susceptibles para el cultivo de *C. burnetii* (Lagier et al., 2015).

Una versión del cultivo celular es el sistema de microcultivo celular conocido como *Shell-vial cell culture* que en un inicio fue propuesto para cultivo de virus y más tarde se adaptó para el aislamiento de bacterias intracelulares (Gouriet et al., 2005; Lagier et al., 2015; OIE, 2018). Se ha utilizado para el aislamiento de cepas de *C. burnetii* provenientes de muestras humanas (Raoult et al., 1990), animales (Gouriet et al., 2005), y de garrapatas (Psaroulaki et al., 2006; Spyridaki et al., 2002).

El medio axénico ACCM (*acidified citrate cysteine medium*) ha sido desarrollado recientemente (Omsland et al., 2009), y se ha ido mejorando con el paso de los años hacia el medio ACCM-2 (Omsland et al., 2011). Esta nueva técnica de cultivo de *C. burnetii* se basa en el crecimiento de la bacteria en un medio libre de células hospedadoras, bajo condiciones microaerófilas, imitando el ambiente ácido existente en el fagolisosoma de la célula donde se replica *C. burnetii* (Omsland et al., 2011; Omsland, 2012). Entre los inconvenientes que presenta la técnica es que necesita un incubador especial para las condiciones que se requieren (37°C, 2,5% O₂ y 5% CO₂), y que algunas cepas de *C. burnetii* crecen poco o incluso no crecen en este medio (Kersh et al., 2011; Kersh et al., 2016). En el caso de que las cepas crezcan poco en este medio, la solución sería combinar esta técnica con la inoculación en modelo murino donde se multiplique previamente la bacteria (Kersh et al., 2011). Otra alternativa es hacer un pase previo en huevos embrionados. De esta forma se logró aislar *C. burnetii* en cultivo axénico ACCM-2 a partir de tejido de válvula cardiaca de un paciente (Boden et al., 2015). En un estudio publicado recientemente, se ha estudiado con éxito la multiplicación de *C. burnetii* en placas de agarosa con medio ACCM-2 (Hartley et al., 2019) a partir de homogeneizados de órganos (bazo y pulmón) y sangre de ratones infectados con la cepa Nine Mile de *Coxiella burnetii*.

Los pases sucesivos de *C. burnetii* en huevos embrionados, en cultivos celulares o en medio axénico, pueden dar lugar a que *C. burnetii* pase de la fase I a la fase II, que es la forma avirulenta (Kersh et al., 2011; Oyston and Davies, 2011), por lo que es necesario no perder la capacidad de virulencia de los aislados, manteniendo *Coxiella* en fase I a través de pases en modelo animal (Mori et al., 2017; OIE, 2018).

Recientemente, se han desarrollado técnicas que utilizan los métodos citados anteriormente, como son la técnica ICC-PCR (*Integrated cell culture-PCR assay*) (Stewart et al., 2015) que combina cultivo celular y PCR aplicadas a estudios de viabilidad de *Coxiella* en leche, y otros que han combinado el medio axénico y la técnica MPN-PCR (*Most probable number-PCR assay*) (Shi et al., 2018). Ambas técnicas permiten analizar la viabilidad de *C. burnetii* directamente de muestras clínicas, en este caso leche, sin necesidad de infectar animales de laboratorio.

Para el estudio de la viabilidad también se han aplicado técnicas moleculares, como el análisis de ARN mensajero o técnicas basadas en la integridad de la membrana de la bacteria (Cangelosi and Meschke, 2014; Zeng et al., 2016). La detección de ARN mensajero mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcriptasa inversa es una de las técnicas utilizadas para la detección de viabilidad ya que los transcriptos bacterianos son lábiles y se degradan fácilmente, y desaparecen de forma rápida tras la muerte celular, por lo que su detección se limitaría a las células vivas (Cangelosi and Meschke, 2014; Zeng et al., 2016). Sin

embargo, esta técnica no es robusta debido a que la expresión de los genes puede variar bajo diferentes situaciones de estrés, además, el manejo del ARN es tedioso y complicado debido su naturaleza lábil, hay muchas probabilidades de contaminación, y en ocasiones se detecta después de haber muerto la bacteria (Cangelosi and Meschke, 2014; Keer and Birch, 2003; Zeng et al., 2016).

Respecto a las técnicas basadas en la integridad de la membrana, se han utilizado dos compuestos químicos, EMA (ethidium monoazide) y PMA (propidium monoazide). Ambos son agentes intercalantes que se unen al ADN de doble cadena de las células muertas (las cuales tienen dañada su membrana) de forma covalente tras la fotoactivación e impiden que la PCR realizada posteriormente amplifique el ADN de las células donde se unen los compuestos, haciendo que solamente se detecte la señal de las células vivas (Nocker et al., 2006). El uso de estos compuestos combinado con la PCR cuantitativa se le denomina *viability PCR* o *v-PCR* y ha sido utilizado con otras bacterias intracelulares como *Legionella pneumophila*, además de otros patógenos (Cangelosi and Meschke, 2014; Zeng et al., 2016). En el caso de *C. burnetii* su aplicación ha sido limitada (Kuley et al., 2015; Mori et al., 2013). Entre estos dos compuestos es preferible el uso de PMA, ya que se ha visto que EMA genera falsos negativos (Kuley et al., 2015; Zeng et al., 2016). Esta técnica requiere de una optimización compleja por lo que ya se están buscando nuevas alternativas químicas tales como compuestos con actividad lábil o el uso de compuestos con platino que no dependen de la luz para actuar y no son caros, y que además de suprimir completamente la señal de las células muertas, evitarían el tratamiento con protocolos laboriosos como ocurre con el PMA (Cangelosi and Meschke, 2014; Kuley et al., 2015; Mori et al., 2013; Zeng et al., 2016).

II.5 Control de la fiebre Q en explotaciones de pequeños rumiantes

Una vez que se ha confirmado la existencia de la infección por *C. burnetii* en una explotación, se han de implementar diferentes medidas para prevenir y controlar la infección lo antes posible. Además de considerar la posible aplicación de tratamiento antibiótico y de la vacunación, han de llevarse a cabo medidas de higiene y de bioseguridad, para así evitar la expansión y dispersión de la bacteria dentro de la explotación y también para evitar que salga al exterior de la misma.

II.5.1 Tratamiento antibiótico

La aplicación de tratamiento antibiótico ha sido una de las estrategias utilizada en rumiantes para intentar reducir tanto los abortos asociados con la infección como la excreción de *C. burnetii*. No obstante, son escasos los estudios realizados sobre la eficacia del tratamiento, todos ellos con compuestos y diseños diferentes, que han dado lugar a resultados contradictorios, y difícilmente comparables (Taurel et al., 2014).

El tratamiento antibiótico se ha basado principalmente en el uso de tetraciclinas. En un inicio, se realizaron estudios aplicando clortetraciclina en ganado vacuno infectado de forma natural (Behymer et al., 1977; Luoto et al., 1951). Sin embargo, tras el tratamiento, y mediante inoculación de leche de animales tratados en cobayas, se seguía detectando la presencia de *C. burnetii* (Luoto et al., 1951). En la misma línea, Behymer et al. (1977) analizaron diversos tipos de muestras (leche, calostro, placenta, tejidos y fluidos mamarios) recogidas de vacas que habían sido tratadas con antibiótico por vía oral, y las inocularon en ratones. Se detectó la presencia de *C. burnetii* en ratones inoculados con muestras de una vaca a los 7 días después del tratamiento y en otro animal 28 días después. Por lo tanto, en ninguno de los dos estudios mencionados se obtuvo la supresión total de la bacteria tras el tratamiento con clortetraciclina.

En los últimos años, el antibiótico utilizado de forma rutinaria para tratamiento de fiebre Q en rumiantes ha sido la oxitetraciclina (OTC). El tratamiento antibiótico con OTC no ha mostrado eficacia en ovino ya que no ha logrado reducir el periodo de excreción de *Coxiella*, ni la carga bacteriana excretada a través de fluidos vaginales, leche y heces (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2013; Berri et al., 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios para comprobar si las bacterias excretadas por diferentes vías tras el tratamiento con OTC son viables. Respecto al efecto del tratamiento antibiótico en la reducción de la tasa de abortos, algunos estudios citan cierta mejora tras el tratamiento (Astobiza et al., 2010; Berri et al., 2001)

En el caso del ganado caprino, no existen ensayos de campo bien controlados donde se haya podido demostrar el beneficio de este tipo de tratamiento (Plummer et al., 2018). En ganado vacuno se han llevado a cabo diferentes estrategias para el control de la fiebre Q administrando OTC en el periodo de secado, con objeto de reducir la excreción de *C. burnetii* tras el parto. Sin embargo, el tratamiento no tuvo efecto significativo en la reducción de la excreción de *C. burnetii* a través de los fluidos uterinos en animales infectados, independientemente del número de dosis aplicadas (Taurel et al., 2012). En un estudio posterior estos autores comprobaron la falta de eficacia del tratamiento antibiótico en la reducción de la excreción de *C. burnetii* a través de la leche (Taurel et al., 2014).

En resumen, hasta no disponer de evidencias claras sobre la eficacia del tratamiento antibiótico, ha de hacerse un uso racional y controlado de éste en los casos de fiebre Q (EFSA, 2010; Plummer et al., 2018; Roest et al., 2013a; Taurel et al., 2012; Taurel et al., 2014). De esta forma, se evitará agravar el problema actual de las resistencias a los antibióticos.

II.5.2 Vacunación

Otra estrategia aplicada para la prevención de los abortos y para minimizar de forma más rápida la excreción de *C. burnetii* en los rebaños infectados, es la vacunación (Eldin et al., 2017; OIE, 2018). Las vacunas compuestas de *C. burnetii* purificada en fase I (forma virulenta) mostraron una protección entre 100 y 300 veces mayor que las preparadas con la bacteria en fase II (forma avirulenta), según un estudio realizado con cobayas (Ormsbee et al., 1964). Posteriormente, en una infección experimental realizada en ganado caprino gestante y que había sido vacunado antes de la inseminación, se comprobó que la vacuna inactivada compuesta por *C. burnetii* en fase I era más efectiva que la vacuna inactivada compuesta por *C. burnetii* en fase II, que no mostró ningún efecto protector (Arricau-Bouvery et al., 2005). Los animales vacunados con la vacuna inactivada en fase I mostraron una reducción significativa de los abortos y de la excreción bacteriana. Esta vacuna contiene la cepa Nine Mile en fase I, y es la que se comercializa desde el 2010 para uso veterinario en Europa (Coxevac®, CEVA Santé Animale, Francia). Se recomienda su uso de forma preventiva en rebaños no infectados, y al ser una vacuna inactivada requiere la aplicación anual de una dosis de recuerdo (EFSA, 2010).

Esta vacuna se ha ensayado en rebaños naturalmente infectados y ha mostrado buenos resultados cuando se ha aplicado en animales no infectados, y no gestantes (Guatteo et al., 2008; Hogerwerf et al., 2011; Piñero et al., 2014b), si bien no hay efectos negativos de la vacuna si se aplica durante la gestación. En ganado vacuno, la vacunación reduce en 5 veces la probabilidad de excreción de *Coxiella* en los animales vacunados en comparación con los no vacunados (Guatteo et al., 2008). En el caso de que la infección por *C. burnetii* esté ampliamente extendida en el rebaño, la vacunación ha de concentrarse exclusivamente en la reposición, vacunando y revacunando a los animales jóvenes susceptibles a los 3 meses de edad (Guatteo et al., 2008; Plummer et al., 2018).

En algunos estudios realizados en ganado caprino, la vacuna no pudo prevenir la infección de animales vacunados a los 3-4 meses de edad (de Cremoux et al., 2012b; Rousset et al., 2009b), si bien el nivel de excreción respecto a los animales no vacunados, fue sensiblemente menor (de Cremoux et al., 2012b; Rousset et al., 2009b). Por ello se ha sugerido

que sería conveniente adelantar la vacunación a la octava semana de vida, para evitar así forma infecciones tempranas, pero para ello habría que realizar ensayos experimentales para analizar la eficacia y viabilidad de esta estrategia (Muleme et al., 2017).

En general, la aplicación de esta vacuna conlleva una reducción del número de abortos y de la excreción de *C. burnetii*, aunque, su aplicación a corto plazo no suprime la excreción de *C. burnetii* en los rebaños infectados (Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b; Astobiza et al., 2013; de Cremoux et al., 2012b; Hogerwerf et al., 2011; Piñero et al., 2014b; Rousset et al., 2009b; Taurel et al., 2014). La vacunación, por tanto, se considera una opción de control a medio-largo plazo (EFSA, 2010), ya que, aunque la infección en la población animal se reduce hasta niveles mínimos tras la aplicación de la vacuna durante varios años consecutivos, las formas de resistencia de *C. burnetii* podría persistir durante largos periodos de tiempo, en el entorno de la explotación (Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b). Una excelente estrategia es combinar la vacunación con el desvieje selectivo de los animales infectados (Camuset and Remmy, 2008; Piñero et al., 2014b), ya que la excreción de *Coxiella* a nivel de rebaño se suprime más rápidamente. Un estudio realizado mediante el uso de modelos matemáticos para comparar diferentes estrategias de vacunación en un rebaño bovino, predijo que la opción más efectiva de control era la vacunación del rebaño completo durante al menos 10 años (Courcoul et al., 2011). La vacunación de al menos el 80% de los animales resultó ser la estrategia que obtuvo un mayor efecto en la reducción de la excreción de *C. burnetii* en leche (Taurel et al., 2014). Otro modelo, desarrollado en Holanda, para evaluar el efecto de las diferentes medidas de control aplicadas en el brote de fiebre Q según el manejo de los rebaños (Bontje et al., 2016), mostró que la estrategia más eficaz para la disminución de la prevalencia de fiebre Q y/o la erradicación de la enfermedad en las explotaciones sería la vacunación preventiva anual de los rebaños, en segundo lugar estaría la vacunación de los rebaños infectados y con abortos por fiebre Q, y en tercer lugar, la vacunación de aquellas explotaciones cuya leche de tanque es positiva a la presencia de ADN de *C. burnetii*. Aunque el sacrificio de animales gestantes durante un brote de fiebre Q puede reducir de forma drástica la excreción de *C. burnetii* al medio ambiente, no se evita totalmente la excreción en el rebaño, ya que puede haber otros animales no gestantes en la explotación que excreten *Coxiella* de forma intermitente (Bontje et al., 2016).

Tras la vacunación se observa en general una reducción importante de la excreción de *C. burnetii* tras 2-4 años de vacunación, pero se puede seguir detectando ADN de *Coxiella* en muestras ambientales (aerosoles, polvo y estiércol) (Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b; Piñero et al., 2014b). Sin embargo, no hay estudios que hayan interpretado el significado de la detección de ADN de *C. burnetii* en muestras ambientales, es decir, si *C. burnetii* permanece viable o no en el transcurso de las parideras. A pesar de ello, se recomienda mantener la

vacunación durante varios años en los rebaños infectados al menos hasta la renovación completa del rebaño con individuos no infectados y vacunados (de Cremoux et al., 2012b), a la par que se aplican medidas de limpieza y desinfección, junto con otras medidas de bioseguridad que se comentarán en el siguiente apartado, evitando de esta forma la reinfección de los animales y reduciendo el riesgo de infección en personas (EFSA, 2010; OIE, 2018).

Uno de los inconvenientes de la vacunación de *C. burnetii* en fase I es que las técnicas de diagnóstico serológico no permiten distinguir entre animales vacunados de los infectados de forma natural (Porter et al., 2011). Y por otro lado, tras la vacunación, se puede detectar ADN de la vacuna en leche durante al menos 9 días, por lo que es necesario establecer un periodo mínimo de al menos 15 días entre la administración de la vacuna y el análisis de la leche de tanque para poder determinar el estatus de infección de un rebaño en relación a *Coxiella* (Hermans et al., 2011).

II.5.3 Otras medidas de control y profilaxis

En los últimos años, a raíz del brote de Holanda, se ha hecho énfasis en una serie de medidas de higiene y bioseguridad para la prevención y control de la fiebre Q en las explotaciones, desde la perspectiva de la sanidad animal, medioambiental y humana (*One health approach*) (Mori and Roest, 2018; Rahaman et al., 2019).

En primer lugar, y debido al riesgo de infección que existe en el momento que ocurren los partos/abortos, hay que **confinar a los animales abortados** separándolos de los animales gestantes y de los de menor edad para evitar así la diseminación de la infección en el resto del rebaño (Angelakis and Raoult, 2010; EFSA, 2010; Plummer et al., 2018). Así mismo, es importante **evitar que los partos tengan lugar en el exterior de la cuadra** ya que la contaminación ambiental y dispersión de la bacteria por el viento podría ser mayor (Angelakis and Raoult, 2010; EFSA, 2010; Vranakis et al., 2020).

En un estudio realizado en explotaciones caprinas de Estados Unidos que habían sufrido brote de fiebre Q, se encontraron las mayores concentraciones de *C. burnetii* en el polvo del interior de las cuadras, y en concreto, en los cubículos de los partos, mientras que en zonas de la explotación alejadas de estos lugares se detectó menos cantidad de bacterias (Kersh et al., 2013). Por ello es importante **retirar las placentas** de la forma más rápida posible, con las medidas de protección oportunas ya que éstas albergan millones de bacterias (entre 10^9 y 10^{12} *C. burnetii* por gramo de tejido)(EFSA, 2010; Plummer et al., 2018). Las placentas y **fetos** hay que destruirlos

mediante incineración o enterramiento (EFSA, 2010; Plummer et al., 2018). También pueden congelarse hasta que sean recogidos por empresas autorizadas para la gestión de residuos con riesgo biológico. La mala gestión de placentas o productos de los abortos pudo ser el origen de un brote de fiebre Q que afectó a un gran número de trabajadores de una empresa de separación de residuos urbanos y rurales (Alonso et al., 2015).

La **desinfección de forma periódica** de las instalaciones con productos eficaces es otra de las medidas a tomar. En explotaciones afectadas se puede aplicar Virkon®S (peróxido 1%) e hipoclorito 1:100, que han mostrado más de un 90% de reducción tras 30 minutos de exposición. MicroChem-Plus™ (amonio cuaternario/detergente) proporciona una inactivación completa tras 30 minutos de actuación (Plummer et al., 2018). Además, hay que tener en cuenta que la temperatura y el pH durante el proceso afectan en la eficacia del desinfectante. Asimismo si el material a desinfectar está muy contaminado o tiene mucha materia orgánica es más difícil de esterilizar (Frentzel et al., 2013; Scott and Williams, 1990).

Dentro de la explotación es necesario el **uso de ropa y calzado exclusivo** para el trabajo con el rebaño (mono, calzas, mascarillas, guantes...). Existen estudios que han evidenciado que si no se siguen estas normas básicas, se pueden arrastrar restos infecciosos con el calzado a lugares ajenos a la explotación, dando lugar a brotes de fiebre Q en personas que no han tenido contacto con ganado (Hurtado et al., 2017).

Tal y como se ha visto anteriormente, en los pequeños rumiantes se excreta una gran cantidad de *C. burnetii* a través de las heces, por lo que el **manejo del estiércol** procedente de una cuadra infectada es clave para evitar la difusión de *C. burnetii*. Hay que evitar su uso como abono ya que puede ser una fuente potencial de infección (Berri et al., 2003; Clark and Soares Magalhaes, 2018; Plummer et al., 2018). Es aconsejable no sacarlo fuera de la cuadra antes de transcurridos 3 meses desde el último parto, para que la temperatura que se alcanza en el interior de la pila del estiércol, actúe durante un tiempo suficiente para que se pueda inactivar a la bacteria (EFSA, 2010; Plummer et al., 2018; van den Brom et al., 2015c). Si por problemas de espacio ha de sacarse al exterior de la cuadra, esta operación ha de realizarse en días sin viento, y tapar la pila de estiércol de la forma más segura posible. También existen tratamientos químicos del estiércol con cal (CaO) o cianamida cálcica, Ca (CN)₂ 0,4% (Angelakis and Raoult, 2010; EFSA, 2010).

Mantener el suelo húmedo, cambiar el tipo de pavimento para no generar polvo, así como disponer de vegetación alta como **barrera en torno a las explotaciones**, son otras medidas propuestas para evitar la contaminación ambiental y la dispersión de *C. burnetii* (Clark and Soares Magalhaes, 2018).

La **ventilación** deficiente en las explotaciones, y que éstas tengan una disposición que dificulte la limpieza y desinfección, conlleva a una mayor prevalencia y un mayor riesgo de infección por *C. burnetii* (Plummer et al., 2018; Schimmer et al., 2011; Schimmer et al., 2012). La filtración del aire es un punto de mejora para las instalaciones ganaderas, manteniendo presión negativa en las zonas con animales respecto a las que no supongan un riesgo biológico (Anderson et al., 2013).

También es de interés incidir en la **calidad del agua** por la posible dispersión de *C. burnetii* a través de este medio, ya que se conoce que *C. burnetii* puede permanecer viable en agua corriente durante 30 meses (van Woerden et al., 2004). De hecho, en el brote de Holanda se detectó ADN de *C. burnetii* en plantas de tratamiento de aguas que recibían vertidos procedentes de explotaciones positivas (Schets et al., 2013).

Debería evitarse el **acceso de visitas** a las explotaciones afectadas por fiebre Q, sobre todo en la época de la paridera, por el riesgo de inhalación de aerosoles contaminados con la bacteria (Clark and Soares Magalhaes, 2018; EFSA, 2010; Georgiev et al., 2013).

Impedir el **acceso de los vehículos** a las explotaciones (Clark and Soares Magalhaes, 2018) evitaría el desplazamiento de *C. burnetii* desde explotaciones positivas y la introducción de la infección en las no infectadas. En consecuencia, la limpieza y desinfección de los vehículos sería otro punto de mejora en la bioseguridad de las explotaciones. Además, como se ha podido comprobar recientemente en una empresa de transportes (Alonso et al., 2019), el transporte de animales infectados supondría también un riesgo de infección.

En el caso de la **compra o incorporación de nuevos animales** en un rebaño infectado por fiebre Q, éstos deberían de introducirse ya vacunados, ya que de otra manera podrían volver a reactivar la infección en el rebaño. Igualmente, si se quiere vender animales de una explotación que ha pasado la fiebre Q, solo se podrían vender animales no infectados y que desde los 3 meses de edad hayan seguido la pauta de vacunación recomendada. Existen ejemplos claros de diseminación de la infección entre rebaños debido a la compra de animales y asociado a brotes humanos de fiebre Q (Anderson et al., 2015; Kersh et al., 2013).

El **pastoreo conjunto** con otros rebaños de rumiantes puede suponer también una posible fuente de infección, especialmente si a esta zona de pastoreo comunal accede algún rebaño con un brote activo de fiebre Q (Barlozzari et al., 2020; Bok et al., 2017; Cardinale et al., 2014; Muema et al., 2017; Obaidat and Kersh, 2017; Rizzo et al., 2016). Por ello aquellos rebaños que tengan este tipo de manejo semi-extensivo deberían de ser vacunados antes de acceder a la zona de pastoreo. A estas zonas también pueden acceder **especies silvestres** que pueden ser reservorios de *C. burnetii*, pero el control de la infección en estas especies es difícil. Así mismo, también es imposible el evitar la interacción entre las especies domésticas y las silvestres.

Lo que sí es posible, es controlar las poblaciones de **garrapatas** mediante el uso de acaricidas, ya que pueden ser reservorios de *C. burnetii* (Clark and Soares Magalhaes, 2018; EFSA, 2010; Plummer et al., 2018). Estos compuestos hay que aplicarlos en los momentos estratégicos en los que las especies de garrapatas de estén más activas.

Otro factor importante a tener en cuenta, es el posible papel de los **roedores** como reservorios de *C. burnetii* (Barandika et al., 2007) por lo que es necesario controlar la presencia de éstos en el entorno de explotaciones, así como en zonas urbanas y periurbanas, tal y como sugieren los resultados obtenidos en otros estudios (Abdel-Moein and Hamza, 2018; Reusken et al., 2011), ya que pueden representar un factor añadido a la dispersión y mantenimiento de la fiebre Q (Schimmer et al., 2014b).

Aunque la vía oral no es la ruta principal de infección para las personas (Eldin et al., 2017), el consumo regular de leche cruda y productos derivados (queso) se han relacionado con seroconversión, así como con casos clínicos de fiebre Q (Benson et al., 1963; Fishbein and Raoult, 1992; Signs et al., 2012), pero todavía no hay evidencias concluyentes (Gale et al., 2015). Por lo que otra medida a tener en cuenta en las explotaciones de rumiantes de aptitud lechera afectadas por fiebre Q, es la **pasteurización** de la leche, ya que *C. burnetii* puede permanecer viable en leche cruda durante periodos de tiempo prolongados (EFSA, 2010). Muy recientemente, se ha comprobado que la inoculación de diferentes cepas de *C. burnetii* por vía oral en modelo murino, dio lugar a la multiplicación de *Coxiella* en los tejidos de los ratones, y éstos también presentaron seroconversión. Dependiendo de la cepa inoculada se obtenía diferente grado de infección, lo que sugiere que la ruta oral podría ser también un modo de transmisión de la fiebre Q (Miller et al., 2020).

Finalmente, existen **otras medidas** más drásticas para erradicar la infección activa por *C. burnetii*, como son los sacrificios de animales gestantes y de machos infectados, y la prohibición de cualquier actividad de inseminación y reproducción del ganado, que fueron puestas en práctica en Holanda en el gran brote de fiebre Q que padecieron durante 2007-2010. También se restringió el movimiento de animales, y se impuso la vacunación obligatoria, financiada por los propios ganaderos. Las explotaciones lecheras también estuvieron obligadas a realizar de forma regular análisis de leche de tanque para conocer su estatus de infección, en función del cual se tomaban las medidas citadas (EFSA, 2010; Roest et al., 2011a; van den Brom et al., 2015a). Así, tras varios años aplicando estas medidas, se logró reducir la incidencia de *C. burnetii* en los rebaños caprinos de Holanda de manera significativa (Dijkstra et al., 2012; van den Brom et al., 2015a).

Debido al problema que la fiebre Q causa en la Salud Pública, algunos países europeos como Finlandia, Bulgaria, Noruega, Bélgica, Dinamarca y Rumanía están llevando a cabo planes

de vigilancia de esta enfermedad mediante muestreos periódicos de muestras de sangre y/o leches de tanque, para investigar la presencia de anticuerpos frente a *Coxiella burnetii* en las explotaciones de rumiantes. Italia ha reportado que además de realizar análisis serológicos en muestras de sangre mediante la técnica ELISA, también llevan a cabo análisis microbiológicos para la detección de *C. burnetii* en muestras de órganos/tejidos de animales domésticos y silvestres (EFSA and ECDC, 2019).

En lo que respecta a la Comunidad Autónoma Vasca, se ha publicado recientemente (BOPV nº 42, 2 de marzo de 2020) el *Plan de Vigilancia y Control de la Fiebre Q en Euskadi*, elaborado por el Gobierno Vasco, las Diputaciones Forales de Álava, Guipúzcoa y Vizcaya, y las instituciones ELIKA-Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria) y NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario) (<http://www.euskadi.eus/plan/plan-de-vigilancia-y-control-de-la-fiebre-q-en-euskadi/web01-a2nekabe/es/>). Dicho plan tiene como objetivo realizar el seguimiento de la enfermedad en el ganado ovino y caprino del País Vasco, y establecer acciones que permitan reducir la prevalencia de la fiebre Q, además de la formación y sensibilización del personal en contacto con los animales. Dentro del programa se describe la vigilancia pasiva, en la cual se investigará sistemáticamente la presencia de *Coxiella burnetii* cuando se declaren problemas de abortos en las explotaciones, y así como la vigilancia activa, que servirá para investigar la presencia de *Coxiella* en explotaciones no sospechosas, a través del examen de muestras de sueros animales y de leche de tanque.

En 25 países europeos es obligatoria la declaración de los casos humanos de fiebre Q. En concreto, y en lo que se refiere a España, la enfermedad pasó de ser de declaración voluntaria a obligatoria en el año 2015. Esta mejora en la detección y vigilancia de casos humanos a nivel estatal y europeo será útil para conocer la prevalencia, y la distribución temporal y geográfica de la enfermedad, según indica el último informe disponible de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2016) (<https://publicaciones.isciii.es/unit.jsp?unitId=cne>) y el último informe de las organizaciones EFSA y ECDC (EFSA and ECDC, 2019). La información generada permitirá realizar una investigación de las posibles fuentes de infección de los brotes y actuar de forma rápida para controlar la diseminación de *Coxiella*. Además, el hecho de conocer las regiones y periodos del año con mayor incidencia de la enfermedad, ayudará a poder dirigir y aplicar de forma más adecuada las medidas de vigilancia, prevención y control.

III. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

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

Estudio I: Estudio de la prevalencia y genotipos de *Coxiella burnetii* en explotaciones ovinas lecheras y cambios observados en un periodo de 10 años.

La raza Latxa es la raza ovina predominante en el País Vasco, es de aptitud lechera y tiene un parto al año. Los partos tienen lugar principalmente durante los meses de invierno (diciembre-febrero). Los corderos se destetan cuando tienen aproximadamente 1 mes de edad, y a partir de ese momento las ovejas se ordeñan durante 3-4 meses. La leche producida está principalmente destinada a la elaboración de queso.

Entre los meses de marzo y abril de 2015, meses en los que la mayoría de ovejas y primiparas se encuentran en ordeño, se tomaron muestras de leche de tanque (LT) en un total de 81 rebaños ovinos pertenecientes a la Asociación de Criadores de Raza Latxa. La toma de muestras fue organizada por la entidad Artzai Gazta, que realizó 3 envíos diferentes de muestras de LT de explotaciones de Álava, Guipúzcoa y Vizcaya, cuyos ganaderos quisieron participar de forma voluntaria en el estudio porque estaban interesados en conocer el estatus de infección de fiebre Q de su rebaño. En cada explotación se tomaron 50-100 ml de LT en un bote estéril y convenientemente identificado. Las muestras se acompañaban de una sencilla encuesta sobre los datos de la explotación, censo y manejo. Tras su llegada a NEIKER, un volumen de la muestra se congelaba a -80°C para realización de estudios moleculares (extracción de ADN, PCR a tiempo real y genotipado de las cepas). El resto se sometía a centrifugación para extraer el suero lácteo, para poder llevar a cabo la investigación de la presencia de anticuerpos mediante la técnica ELISA. Los sueros lácteos se mantuvieron a -20°C hasta el momento de su análisis. Estas técnicas se detallarán en el apartado III.2.1 y III.2.2.

Para evaluar posibles cambios, tanto en la prevalencia como en los genotipos de *C. burnetii* en el plazo de 10 años, periodo de tiempo transcurrido desde que se había realizado un estudio similar en 154 rebaños ovinos (García-Pérez et al., 2009; Ruiz-Fons et al., 2011), se recuperaron, tanto la base de datos de los resultados obtenidos en 2005 con las técnicas PCR y ELISA, como las muestras de ADN disponibles, que se mantenían conservadas -20°C.

Estudio 2: Cinética de la infección por *C. burnetii* y estudio de su viabilidad en rebaños ovinos lecheros naturalmente infectados a lo largo de cuatro parideras consecutivas.

En los rebaños del Estudio I que habían mostrado un resultado positivo a la presencia de ADN de *C. burnetii* en LT en la campaña 2014/2015 se tomaron muestras de sueros (15 sueros de primaras y 15 sueros de ovejas) (datos no incluidos en esta tesis doctoral). Los resultados positivos en LT junto con una seroprevalencia alta en el grupo de primaras sugerían que la infección por *C. burnetii* era reciente en esos rebaños. Con esta información, la entidad Artzai Gazta nos ayudó a identificar cuatro rebaños, cuyos propietarios estuvieron interesados en colaborar y estudiar la evolución de la infección a lo largo de las parideras 2015/16, 2016/17, 2017/18 y 2018/19. Cabe destacar que en el inicio de este estudio había rotura de *stock* en la producción de la vacuna en fase I Coxevac (CEVA), por lo que no se pudo contemplar la inclusión de la vacunación en el programa de control de *C. burnetii*. Al inicio del estudio se realizó una encuesta para recopilar datos sobre censo, características de la explotación, manejo, historial de abortos y medidas de higiene y bioseguridad llevadas a cabo en la explotación. En cuanto a la percepción que tenían del problema que supone la fiebre Q, ninguno de los ganaderos reportó una alta incidencia de abortos durante los años previos. Sin embargo, uno de ellos sí que informó que un miembro de la familia había padecido neumonía la temporada productiva 2014/15, pero al no ser necesaria la hospitalización, no hubo un diagnóstico confirmado.

Para la correcta gestión de las placentas, y en su caso, fetos, se ofreció a los ganaderos la disponibilidad de un arcón congelador con contenedores en su interior, que, una vez llenos, se retiraban para su incineración. El objetivo era eliminar de la cuadra de forma rápida el material potencialmente infectivo, y reducir así, la posible contaminación ambiental. Tres de los 4 ganaderos realizaron este procedimiento. El cuarto (rebaño 2) tenía un tipo de emparrillado que hacía que las placentas cayeran directamente al foso de purines.

Así pues, durante 4 parideras consecutivas, se hicieron una serie de visitas a los rebaños. Las visitas claves se realizaron en plena paridera de las ovejas, y semanas más tarde, durante la paridera de las primaras. En estas dos visitas se tomaban muestras de un máximo de 40 ovejas y 40 primaras. Durante la cuarta paridera, solamente se recogieron muestras de las primaras. Las muestras consistían en la toma de exudados vaginales (con hisopos sin medio), leche y heces, que se analizaron mediante PCR a tiempo real para verificar tanto el porcentaje de animales excretadores, como la carga bacteriana excretada. En estas visitas también se tomaron 8-10 muestras de polvo de diferentes superficies de las instalaciones ganaderas. El objetivo de esta acción fue comprobar la presencia de *C. burnetii* en el ambiente. Las muestras de polvo se

tomaron por duplicado, una para el estudio molecular por PCR a tiempo real, y la segunda para el estudio de la viabilidad de *Coxiella*.

Además, mensualmente y hasta finalizar el ordeño, se tomaba una muestra de LT para comprobar el periodo de excreción de *C. burnetii* en el rebaño, así como otras muestras medioambientales consistentes en muestras de aerosoles internos y externos (dentro y fuera de la explotación), mediante el muestreador de aire “MD8” Sartorius (Goettingen, Germany), realizando una aspiración de 100 litros aire/minuto durante 10 minutos. El aire aspirado, pasa a través de un filtro de gelatina que se encuentra adaptado al equipo, y que es el material que posteriormente se analiza en el laboratorio por PCR a tiempo real, con objeto de detectar la presencia de ADN de *C. burnetii* en los aerosoles generados en la explotación.

En resumen, se realizaron una serie de muestreos en la población animal y en el entorno de la explotación con objeto de conocer la cinética de la infección en rebaños no vacunados y la persistencia de la viabilidad de *Coxiella* en el ambiente. En el laboratorio, tras analizar las muestras mediante PCR a tiempo real, se hizo una selección de las muestras que tenían una mayor carga bacteriana para analizar el genotipo, tal y como se detallará en el apartado III.2.1.3. Por otro lado, las muestras de leche individual se centrifugaron, y los sueros lácteos obtenidos se analizaron mediante la técnica ELISA, para comprobar la cinética de anticuerpos frente a *C. burnetii* tras la infección. En cuanto al estudio de viabilidad de *C. burnetii* en muestras ambientales, se realizó mediante el uso de modelo animal y cultivo celular, que se detallarán en el apartado III.2.3.

Estudio 3: Estudio de un brote de abortos por fiebre Q en una explotación caprina, seguimiento de la infección en la población animal y estudio de la viabilidad de *C. burnetii* en el entorno de la explotación.

En enero de 2017 se recibieron en el laboratorio de diagnóstico de Sanidad Animal de NEIKER muestras de abortos (sueros, exudados vaginales y placenta) procedentes de un rebaño caprino, que había ocasionado un brote de fiebre Q en los trabajadores de la explotación. En contacto con Salud Pública, OSALAN (Instituto Vasco de Seguridad y Salud Laboral) y el Servicio de Ganadería se organizó un plan de control que incluía varias medidas, incluida la vacunación. Para conocer mejor la cinética de la infección por *C. burnetii* en la población caprina, a lo largo de 7 meses y con periodicidad mensual, se tomaron muestras de exudados vaginales, leche y heces de 35 cabras recién abortadas para el estudio de la excreción de *C. burnetii* por PCR a tiempo real. También se tomaron mensualmente muestras de LT para

comprobar el nivel de excreción de *C. burnetii* a nivel de rebaño y muestras medioambientales consistentes en muestras de aerosoles internos y externos (dentro y fuera de la explotación), tal y como se ha explicado en el Estudio 2. Además de aerosoles, también se tomaron muestras de polvo en diferentes superficies del interior de las instalaciones, utilizando hisopos estériles y haciendo la toma por duplicado. Esta toma de muestras se realizó en 4 ocasiones: en el momento álgido del brote, cuando se registró el mayor número de abortos, y a los 2, 3 y 4 meses desde que tuvo lugar el último parto. El objeto de tomar las muestras por duplicado era para, al igual que en el Estudio 2, dedicar una muestra al estudio de detección de ADN de *C. burnetii*, y la segunda, conservada a -80° hasta su procesado, para realizar la investigación de la viabilidad de *C. burnetii* en el ambiente, tal y como se detallará en el apartado III.2.3.

Todas las muestras (exudados vaginales, leche, heces, filtros de gelatina y polvo) se analizaron mediante PCR a tiempo real para la detección de *C. burnetii*. Las muestras de leche individual se centrifugaron y los sueros lácteos obtenidos se analizaron mediante la técnica ELISA. El estudio del genotipo de *Coxiella* responsable del brote se llevó a cabo mediante las técnicas de genotipado descritas en el apartado III.2.1.3.

Esta parte del estudio de la infección por *C. burnetii* en el rebaño caprino se complementó con los datos del brote humano de fiebre Q, facilitados por Salud Pública y OSALAN. Estos resultados aparecerán en detalle en el capítulo correspondiente.

Estudio 4: Estudio de la viabilidad de *Coxiella burnetii* en quesos de oveja elaborados con leche cruda sin pasteurizar.

En este trabajo se realizó un análisis de prevalencia de *C. burnetii* en 67 quesos elaborados de forma artesanal con leche de oveja sin pasteurizar, comprados en mercados y supermercados, y que procedían de diferentes Comunidades Autónomas. La presencia de ADN de *Coxiella* se analizó mediante PCR a tiempo real. Para el estudio de la viabilidad de *C. burnetii* se seleccionaron 5 quesos positivos con un grado de maduración entre 2 y 3,1 meses. En una segunda fase, y con objeto de comprobar la viabilidad de la bacteria a lo largo del proceso de maduración, se incluyeron 12 quesos (de 2,2 a 10,1 meses) procedentes de una explotación ovina que había padecido de forma reciente un brote de fiebre Q.

Además, a los quesos incluidos en el estudio de la viabilidad de *C. burnetii* se les analizó el pH y la actividad de agua (a_w). Los análisis fueron realizados por una empresa externa (AENOR), con el objetivo de conocer mejor las características de resistencia de *C. burnetii* durante el periodo de maduración del queso.

III.2 Procesado y análisis de las muestras

III.2.1 Técnicas moleculares

III.2.1.1 Extracción de ADN

Para la obtención de ADN de las diferentes muestras (LT, exudados vaginales, leches individuales, heces, filtros de gelatina, polvo y quesos) se utilizó el kit comercial de QIAGEN “QIAmp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen Hilden, Germany) utilizando las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones, detalladas a continuación.

III.2.1.1.a Leche: Tanto para las muestras de leche de tanque como para las muestras de leche individual, se procesó una alícuota de 200 µl. A esos 200 µl de muestra se le añadían 180 µl de tampón ATL y 20 µl de proteinasa K (8 mg/ml). Tras su homogeneización mediante el uso de un agitador tipo vórtex, la mezcla se sometía a una incubación de 30 minutos a 70°C. Después se añadían 200 µl de tampón AL, se homogeneizaba y se incubaba de nuevo a 70°C durante 10 minutos. Tras esta segunda incubación se añadían 200 µl de etanol absoluto, y se transfería la mezcla a las columnas de extracción del kit, siguiendo a continuación con las recomendaciones del fabricante.

III.2.1.1.b Heces: Se pesaba 1 gramo de heces y se mezclaba con 4 ml de tampón TE (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Se homogeneizaba la mezcla con el agitador tipo vórtex y se centrifugaba a 3000 x g durante 3 minutos. Se recogían 200 µl del sobrenadante y se mezclaban con 180 µl del tampón ATL y 20 µl de proteinasa K (8 mg/ml). Tras homogeneizar la mezcla, se incubaba 30 minutos a 70°C, y se continuaba con el procesado y la extracción de ADN tal y como se ha explicado en el punto anterior.

III.2.1.1.c Hisopos (exudados vaginales y muestras de polvo): Los hisopos vaginales se cortaban por la mitad, y se usaba una parte para la extracción de ADN y la otra se conservaba a -80°C, por si fuera necesaria la realización de estudios complementarios. En el caso de los hisopos de polvo se procesaban enteros ya que se disponía de un duplicado. Al hisopo se le añadían 300 µl de tampón TE (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), 180 µl del tampón ATL y 20 µl de proteinasa K (8 mg/ml). La muestra se homogeneizaba mediante el uso de un agitador tipo vórtex y se incubaba a 56°C durante 1 hora, agitando ocasionalmente. Posteriormente se añadían 200 µl de tampón AL, se homogeneizaba de nuevo y se incubaba la mezcla 10 minutos, a 70°C. Después, se añadían 200 µl de etanol absoluto y la mezcla (retirando el algodón del

hisopo) se pasaba a las columnas de extracción del kit, para continuar el proceso según las instrucciones del fabricante.

III.2.1.1.d Filtros de gelatina (muestras de aerosoles): Los filtros de gelatina se colocaban en una placa de Petri estéril y se añadían 2 ml de tampón ATL hasta conseguir una masa gelatinosa que se transfería a un tubo de 15 ml. A la mezcla se le daba un pulso en la centrífuga para que sedimentara, y se colocaba en un baño con agua caliente unos minutos para licuar la gelatina. Una vez líquido, se transfería 1 ml a un tubo eppendorf que se conservaba a -20°C . Al mililitro restante se le añadían 500 μl de tampón ATL y 50 μl de proteinasa K (8 mg/ml) agitando bien la mezcla en el vórtex. Posteriormente se incubaba a 56°C durante 1 hora, agitando ocasionalmente. Tras estos pasos se añadían 500 μl de tampón AL, y tras agitar se incubaba la mezcla a 70°C durante 10 minutos. Tras esta segunda incubación se añadían 500 μl de etanol absoluto, y una vez agitada la mezcla, era transferida a las columnas del kit. En este caso, la transferencia tenía que hacerse en dos veces, por el exceso de volumen final. A continuación se seguían los pasos indicados por el fabricante.

III.2.1.1.e Queso: Para el queso se siguió el procedimiento publicado por Hirai et al. (2012) aunque con unas pequeñas modificaciones. Se cortaban 10 gramos del queso y se incubaban con 15 ml de tampón fosfato salino (PBS) a 56°C durante 30 minutos. Tras la incubación, se homogeneizaba en un homogeneizador Stomacher® durante 1 minuto y se transfería la mezcla a un tubo de 50 ml que se centrifugaba a $900 \times g$ a 4°C durante 20 minutos. Tras la centrifugación los componentes del queso eran separados en varias fases, tal y como se puede observar en la Figura 4.

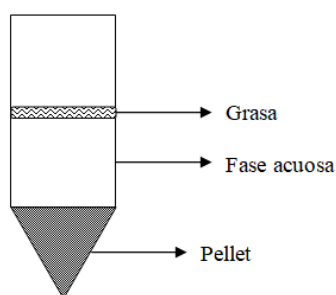


Figura 4. Separación de las distintas fases del queso tras la centrifugación.

Tras la centrifugación, se transfería la fase acuosa a un tubo nuevo y al volumen remanente se le añadían 10 ml de PBS, y la mezcla se incubaba a 45°C durante 20 minutos. Tras esta segunda incubación, la mezcla se homogeneizaba vigorosamente y se centrifugaba de nuevo a $900 \times g$ a 4°C durante 20 minutos. De nuevo, la fase acuosa se recogía y se mezclaba

con la recogida previamente. Por último, esta mezcla se centrifugaba a 11.000 *rpm* a 4°C durante 30 minutos para concentrar la *Coxiella* presente. Una vez eliminado el sobrenadante, el *pellet* se resuspendía en 300 µl de PBS para iniciar el proceso de extracción de ADN. Se añadía 180 µl de tampón ATL y 20 µl de proteinasa K (8 mg/ml), y tras homogeneizar la muestra, se incubaba 30 minutos a 70°C, y posteriormente se continuaba con el proceso de extracción de ADN tal y como se ha explicado para las muestras de leche.

El pretratamiento de todas las muestras y los pasos hasta la primera incubación previa a la extracción del ADN se realizaron en una cabina de flujo laminar de bioseguridad nivel 2. Por otro lado, para el control de posibles contaminaciones, se incluyó un control negativo de extracción cada 5-10 muestras. En este control negativo se añadían todos los reactivos utilizados en el proceso de extracción de ADN excepto la muestra, que se sustituía por tampón TE o PBS.

III.2.1.2 PCR a tiempo real

La diana utilizada para la detección del ADN de *Coxiella burnetii* mediante PCR a tiempo real fue la secuencia de inserción que codifica para la transposasa *ISIII* de *Coxiella*. Se utilizó un cebador *forward* y otro *reverse* y una sonda marcada en el extremo 5' con FAM (Schets et al., 2013). Esta diana también se usó para la cuantificación de la carga bacteriana en las muestras de interés.

Para detectar la presencia de posibles inhibidores de la reacción, la PCR a tiempo real también contenía un control interno de amplificación (TaqMan[®] Exogenous Internal Positive Control, Thermo Fisher Scientific) que incluía cebadores y sonda específicos. El volumen final de la PCR era de 20 µl (Tabla 6), de los cuales 5 µl eran de ADN problema (o H₂O estéril libre de DNAasas y RNAasas (Sigma-Aldrich) en el caso del control negativo de PCR). El *master mix* utilizado para la PCR fue el Universal Master Mix (Applied Biosystems). El proceso de amplificación era llevado a cabo en un termociclador ABI PRISM 7500 FAST (Applied Biosystems) y el programa de PCR constaba de una fase digestión a 50°C 2 minutos, seguida de una fase de activación de la *Taq* polimerasa a 95°C 10 minutos, y una última fase con un paso de desnaturalización 15 segundos a 95°C seguido del paso de la unión de cebadores y extensión de 1 minuto a 60°C, ambos repetidos 40 ciclos. En general, las muestras se consideraron positivas cuando el valor de Ct (*Cycle threshold*) en PCR era menor de 40. Es decir, el resultado se expresa en Cts, que es el número de ciclos de la PCR en los que la muestra se revela como positiva. Un Ct bajo indica una carga bacteriana alta en la muestra problema. En el caso de usar el gen de

múltiple copia (ISIII), hay autores que consideran el resultado como no concluyente en el caso de que ese valor de Ct sea mayor de 35 (Mori et al., 2017), ya que estas muestras, cuando se analizan con una PCR que tiene como diana un gen de única copia (*comI*, por ejemplo), son negativas.

En el caso de no obtener amplificación en la muestra, pero sí del control interno, la muestra se considera negativa. Y si no hay amplificación de ningún tipo, indica la presencia de inhibidores, por lo que hay que diluir la muestra y repetir la PCR, y si se mantiene la inhibición se recomienda repetir la extracción de ADN.

Tabla 6. Reacción de la PCR para la detección de *C. burnetii*.

Reactivo (concentración)	Concentración final	Volumen (µl) para 20 µl reacción
Master MIX control interno (10x)	1x	2
Control interno (50x)	1x	0,4
Universal Master Mix (2x)	1x	10
Cebador sISpri_f (20 µM)	0,6 µM	0,6
Cebador sISpri_r (20 µM)	0,6 µM	0,6
Sonda Tqpro_sIS1 (10 µM)	0,2 µM	0,4
BSA (20 mg/ml)	0,5 µM	0,5
H ₂ O estéril libre de DNAasas y RNAasas	-	0,5
ADN muestra (o control +, o control -)	-	5

En el caso de tener que estimar la cantidad de *C. burnetii* presente en una muestra positiva, se repetía el mismo ensayo de PCR, pero sin el control interno y su *master mix*. En cada ensayo de qPCR se incluían diluciones seriadas por triplicado de un control positivo con concentraciones conocidas para elaborar de esta forma una recta patrón y así poder estimar la cantidad de bacteria presente en las muestras problema.

III.2.1.3 Técnicas de genotipado

Las muestras animales y medioambientales seleccionadas para el estudio de los genotipos (Estudios 1, 2 y 3) tenían que tener valores de Ct <31 en PCR a tiempo real, ya que, de lo contrario, no se obtenían resultados óptimos.

Las técnicas de genotipado utilizadas para conocer los genotipos de *C. burnetii* presentes en la CAPV fueron las técnicas SNP y MST:

III.2.1.3.a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping: Esta técnica consiste en la clasificación de las diferentes cepas de *Coxiella burnetii* mediante el análisis de la presencia o ausencia de alelos determinados para una serie de polimorfismos de nucleótido simple (SNP). Siete de ellos están localizados en genes de una única copia (SNP 769, 2287, 4439, 4557, 4844, 5423 y 6025) y 3 (SNP 7087, 7726 y 7974) en el gen multicopia *IS1111*. De esta forma se pueden identificar hasta 9 genotipos diferentes (Huijsmans et al., 2011). Cada uno de los SNP se analizó mediante la tecnología Taqman PCR a tiempo real utilizando un cebador *forward* y otro *reverse* y dos sondas MGB®Taqman marcadas con VIC/6FAM en el extremo 5', específico para cada marcador a analizar. La utilización de 2 sondas diferentes permite distinguir entre un alelo u otro según la señal detectada en el termociclador.

Se siguió el protocolo de Huijsmans et al., (2011) con algunas modificaciones descritas a continuación. La PCR se realizó a un volumen final de 20 µl, en los que 5 µl eran de la muestra problema. Las concentraciones de los primers fueron de 625 mM y de las sondas 125 nM, y se utilizó 1xTaq Mix Absolute (Thermo Scientific). El programa de PCR utilizado en un termociclador BioRad (CFX96™ RTi-PCR Detection System) fue de 1 ciclo de 15 minutos a 95°C y 45 ciclos de 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C.

III.2.1.3.b Multispacer Sequence Typing (MST): Esta técnica se basa en el análisis de las secuencias de 10 espaciadores del genoma de *Coxiella burnetii* que muestran variaciones en su secuencia entre las distintas cepas de la bacteria (Glazunova et al., 2005). Los espaciadores analizados en el Estudio 3 fueron Cox 2, Cox5, Cox18, Cox 22, Cox 37, Cox 51, Cox 56 y Cox 61. En el Estudio 2 se incluyó además el Cox 57. La amplificación del ADN fue realizada mediante PCR convencional con un cebador *forward* y otro *reverse* específicos para cada una de las secuencias (Glazunova et al., 2005), y posteriormente los productos fueron purificados en geles de agarosa y secuenciados. Las secuencias una vez analizadas fueron lanzadas a la base de datos de MST existente en la página web del IHU (Institut Hospital-Universitaire) Méditerranée Infection de Marsella (https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/blast.html) que permite saber si las secuencias obtenidas coinciden con las ya conocidas, y disponibles en la base de datos. A día de hoy se conocen 72 genotipos diferentes obtenidos tanto a partir de muestras humanas como animales.

III.2.2 Técnicas serológicas

Para detectar la presencia de anticuerpos frente a *Coxiella burnetii* en suero lácteo, tanto de las muestras de LT del Estudio 1, como en leches individuales procedentes de los Estudios 2 y 3, la técnica utilizada fue el kit de ELISA comercial “PrioCHECK™ Ruminant Q Fever Ab Plate ELISA Kit” (Thermo Fisher Scientific), antes comercializado bajo la denominación “LSIVet™ Ruminant Q fever Serum/Milk ELISA Kit” (Thermo Fisher Scientific). En estos kits, los pocillos de las placas contienen una mezcla de antígenos fase I y fase II de una cepa de *Coxiella burnetii* obtenida a partir de muestras de abortos ovinos, aislada en el INRA (French National Institute for Agricultural Research) en Nouzilly (Francia).

La valoración de los resultados de ELISA se hace en función del ratio S/P obtenido, que es calculado con la siguiente fórmula:

$$S/P = (DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{CN}}) / (DO_{\text{CP}} - DO_{\text{CN}})$$

En la que: “DO muestra” es la densidad óptica de la muestra problema, “DO CN” es la densidad óptica del control negativo (CN) y “DO CP”, la densidad óptica del control positivo (CP).

$$\text{Título} = S/P \times 100$$

En el suero de leche de tanque el título límite entre muestras negativas y positivas es el valor de 30. Si el título es ≤ 30 la muestra se considera negativa, y con valores > 30 , positiva. Y lo mismo ocurre para el suero de leches individuales, pero el límite es el valor de 40. Además, según el título $S/P \times 100$, se pueden clasificar las muestras positivas, como débilmente positivas (+), positivas (++) o muy positivas (+++) (Tabla 7).

Tabla 7. Categorías establecidas por el fabricante de los kits comerciales de ELISA en función del título ($S/P \times 100$) y según el tipo de muestra.

RESULTADO		INTERPRETACIÓN
LECHE TANQUE	LECHE INDIVIDUAL	
Título ≤ 30	Título ≤ 40	Negativo
$30 < \text{Título} \leq 100$	$40 < \text{Título} \leq 100$	Positivo +
$100 < \text{Título} \leq 200$	$100 < \text{Título} \leq 200$	Positivo ++
Título > 200	Título > 200	Positivo +++

III.2.3 Estudio de la viabilidad de *C. burnetii*

Para el estudio de viabilidad de *C. burnetii* en muestras de polvo y quesos correspondientes a los Estudios 2, 3 y 4, se optó por la infección experimental de las muestras problema en modelo murino BALB/c seguida del cultivo en la línea celular Vero. Ambos desarrollos se realizaron en laboratorios con nivel de contención de bioseguridad 3. La infección experimental se realizó en NEIKER, y los cultivos celulares a partir de muestras de bazo de ratones positivos a PCR, se realizaron en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Patógenos Especiales en el Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección de la Dra. Isabel Jado. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes: 1) Selección de las muestras; 2) Preparación de inóculos para la infección experimental en ratones; 3) Infección experimental y seguimiento de la misma; 4) Sacrificio de los animales experimentales y análisis de las muestras de bazo por PCR a tiempo real; y 5) Cultivo celular de los bazos positivos y confirmación de la viabilidad de *C. burnetii*.

Todos estos experimentos tuvieron el visto bueno y aceptación, primero por el Comité de Ética y Experimentación de NEIKER, y posteriormente por el Órgano Competente en materia de Experimentación Animal (Bizkaiko Foru Aldundia- Diputación Foral de Vizcaya, documento NEIKER-OEBA 2017-001, número de autorización 15.328 del 22 de febrero de 2017, y NEIKER-OEBA 2017-001 v02, número de autorización 32243 del 25 de junio de 2018).

1) Selección de las muestras:

En lo que respecta al Estudio 2 se partía de 15 “pooles” de polvo (cada pool consistía en una mezcla de 8-10 hisopos) recogidos tras las cuatro parideras de las primalas (3 rebaños x 4 años; 1 rebaños x 3 años). En el Estudio 3, el número de “pooles” de polvo a investigar fueron 4, uno tomado en el periodo de los abortos, y el resto a los 2, 3 y 4 meses desde que tuvo lugar el último parto. En el Estudio 4 se seleccionaron 17 quesos positivos a PCR, con cargas bacterianas altas y de diferentes estados de maduración (entre 2 y 10 meses).

2) Preparación inóculos para la infección experimental en ratones:

El tratamiento de las muestras para la preparación de los inóculos de polvo y queso se ha explicado en parte en el apartado III.2.1.1 (donde se detalla el diferente tratamiento de las muestras previo a la extracción de ADN), sin embargo en el caso del **queso** hubo que hacer ligeras modificaciones, como la supresión de los periodos de incubación de 56°C y 45°C, con objeto de evitar la pérdida de posible *Coxiella* viable existente en las muestras de queso. Otra

modificación fue la adición de mayor volumen de PBS al *pellet* final para la preparación de los inóculos.

En cuanto a las muestras de **polvo** se prepararon “pooles” con los 8-10 hisopos de polvo recogidos en cada rebaño y muestreo (duplicados que se mantenían conservados a -80°C). Se siguió el protocolo publicado por Kersh et al. (2010b) con algunas modificaciones. En un tubo de 50 ml se añadían 15 ml de PBS y se introducían los hisopos de polvo (solo el algodón). Tras agitar varias veces, se daba un pulso en la centrífuga y se retiraban los algodones con unas pinzas. Se centrifugaba de nuevo la mezcla durante 5 minutos a $200 \times g$, para la sedimentación de las partículas de mayor tamaño, y se recogía el sobrenadante con cuidado, transfiriéndolo a un tubo de 15 ml. El sobrenadante se centrifugaba durante 30 minutos a 10.000 rpm para concentrar el *pellet* de *C. burnetii* y se descartaba el sobrenadante. El *pellet* se resuspendía en PBS y ya se tenía listo el material para los inóculos.

Seguidamente, se tomaban 200 μl de inóculo (polvo o queso) para realizar la extracción de ADN para cuantificar el número de equivalentes genómicos (EG) de *C. burnetii* presentes por inóculo. Y en función de estos resultados y de lo que se pretendía inocular en ratón, se ajustaba el número de EG por inóculo modificando el volumen de PBS.

3) Infección experimental y seguimiento de la misma:

La infección experimental realizada en los Estudios 2, 3 y 4 fue realizada en ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad. La inoculación en los ratones fue realizada por vía intraperitoneal, inoculando volúmenes entre 200 y 500 μl . Se inocularon entre 4 y 6 ratones por muestra problema, dos por cada día de sacrificio. A los ratones control negativo se les inoculaba el mismo volumen con PBS.

4) Sacrificio de los animales experimentales y análisis de las muestras de bazo por PCR a tiempo real:

Los ratones se sacrificaron los días +14 y +21 p.i. (Estudio 2), los días +7 y + 21 p.i. (Estudio 3) y los días +7, +14 y +21 p.i. (Estudio 4). Una vez sacrificados los animales, se pesaban y se les extraía el bazo, el cual también se pesaba, ya que el cociente “peso bazo/peso ratón” permite valorar la existencia de esplenomegalia. El bazo era cortado por la mitad, y una mitad se procesaba por qPCR y el resto se congelaba a -80°C para, en el caso de ser positivo por qPCR, realizar cultivo celular para confirmar la viabilidad de *C. burnetii*.

En lo que respecta a la extracción de ADN a partir de muestras de bazo, presenta ligeras diferencias respecto a los otros tipos de muestras mencionadas en el apartado III.2.1.1. El bazo se pesaba y se homogeneizaba con 1000 µl de tampón TE (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) en un TissueLyser (Qiagen). Se tomaba una alícuota de 200 µl para la extracción de ADN y el resto se guardaba a -20°C. A los 200 µl del homogeneizado se les añadían 180 µl de tampón ATL y 20 µl de proteinasa K (8 mg/ml) y tras agitarlo se ponía 3 horas a incubar a 55°C, homogeneizando la mezcla ocasionalmente. Tras esa primera incubación, se le añadían 200 µl de tampón AL, se incubaba a 70°C durante 10 minutos, y posteriormente se añadían 200 µl de etanol absoluto. El protocolo de extracción finalizaba continuando los pasos recomendados por el fabricante.

5) Cultivo celular de los bazos positivos y confirmación de la viabilidad de *C. burnetii*:

Para confirmar los resultados positivos obtenidos en la qPCR de los bazos de los ratones, se procedió al cultivo celular con la segunda mitad de los bazos que se mantenía conservada a -80°C.

La técnica utilizada fue la denominada *Shell vial*. En primer lugar se propagó la línea celular Vero C1008 (Vero 76, clone E6, Vero E6 ATCC CRL-1586), que son células epiteliales de mono verde africano, en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium; Lonza Biologics Porriño S.L., Pontevedra) suplementado con 1% de L-glutamina Lonza Biologics Porriño S.L., Pontevedra), 0,4% de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich Quimica, S.L., Madrid) y un 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich Quimica, S.L., Madrid) a 37°C al 5% de CO₂. Tras obtener crecimiento, las células se pasaron a los viales *shell vial*. Se homogeneizó el bazo con 700 µl de medio DMEM y 2% de suero fetal bovino mediante el TissueLyser LT (Qiagen). Se añadieron 100 µl del homogeneizado de bazo al *shell vial*, ya tapizado con las células Vero, y el resto se preservó para realizar extracción de ADN y qPCR y para guardar *stock* a -80°C en caso de necesitar repetir el cultivo. Los *shell vial* inoculados se centrifugaban 1 hora a 600 x g a 20°C para favorecer la infección de las células. Tras esa centrifugación se añadían 700 µl medio DMEM y 2% de suero fetal bovino y se incubaban a 37°C con 5% de CO₂ durante 6 días. Transcurrido este periodo, se recogían las células del *shell vial* y se hacían pases semanales de 1 ml (3 pases en total), a matraces de cultivo T25 tapizados con células Vero. Antes de realizar cada pase se recogían alícuotas de 200 µl para extracción de ADN y qPCR, y así poder valorar si había habido crecimiento de *Coxiella* en los sucesivos pases. Se confirmó la viabilidad de *C. burnetii*, cuando hubo multiplicación de la bacteria en el segundo o tercer pase.

III.3 Análisis estadísticos

Para realizar los diferentes análisis estadísticos que se detallan en los capítulos de los Estudios 1, 2 y 4, se utilizó el programa SAS Enterprise Guide 7.1 o el software libre R (versión 3.6.2).

IV. ARTÍCULOS /ESTUDIOS

ARTÍCULO / ESTUDIO 1

Stable levels of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy sheep flocks but changes in genotype distribution after a 10-year period in northern Spain

**Álvarez-Alonso, R., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Ortega-Araiztegi, I., Jado, I., Hurtado, A.,
García-Pérez, A.L.**

Acta Vet. Scand., 60(1):75. 2018.

ABSTRACT

Bulk-tank milk (BTM) samples were collected from 81 sheep flocks in the Basque Country, Spain, in 2015 and were analysed for antibodies against *Coxiella burnetii* by ELISA and for *C. burnetii* DNA by real-time PCR. Thirty-two percent of the flocks had BTM antibodies against *C. burnetii*. Presence of *C. burnetii* DNA in BTM was detected in 23% of the flocks, suggesting recent *C. burnetii* infections. Retrospective data of BTM samples obtained from 154 sheep flocks investigated in 2005 in the same geographic area were compiled to assess temporal changes in *C. burnetii* infection. The overall percentage of infected sheep flocks did not significantly change after the 10-year period. Among the 46 flocks sampled in both periods, 11 flocks that were negative in 2005 were positive in 2015, 18 maintained their initial status (positive or negative), and 17 positive flocks were negative in 2015. These findings indicate that *C. burnetii* infection is a dynamic process in dairy sheep in northern Spain. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping of positive samples identified three genotypes, SNP1 being the most prevalent in 2015 and SNP8 in 2005; SNP4 was only detected once in 2005. These results suggest possible changes in the pattern of genotype infection over time.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Dairy sheep, Bulk-tank milk, SNP genotyping

FINDINGS

Q fever is a worldwide distributed zoonosis caused by *Coxiella burnetii*. Domestic ruminants are the main reservoir and source of infection for humans (Eldin et al., 2017). *C. burnetii* can produce abortion in domestic ruminants such as cattle, sheep and goats (Agerholm, 2013). To prevent Q fever outbreaks both in animals and in people, it is important to monitor the presence and prevalence of *C. burnetii* in livestock farms to establish effective control measures. Serological tests on bulk-tank milk (BTM) samples are very useful for the epidemiological surveillance of some infections in dairy livestock. In the case of *C. burnetii*, detection of antibodies in BTM is indicative of previous contact of the herd with the pathogen, whereas detection of the pathogen would be indicative of a current and active infection. The evolution of infection can be also monitored by periodic analyses of BTM samples, as shown for dairy cattle (Piñero et al., 2014c) and goats (van den Brom et al., 2015b). *C. burnetii* DNA obtained from positive BTM samples can be genotyped to determine strains present (Dal Pozzo et al., 2016; Roest et al., 2011b).

In the Basque Country, northern Spain, dairy sheep attains both the highest *C. burnetii* flock seroprevalence (74%) and the highest within-flock seroprevalence (11.8%) compared to other domestic ruminants (Ruiz-Fons et al., 2010), suggesting that sheep could be the main reservoir of infection in this area. Lambing in Latxa sheep flocks occurs once a year with an early peak between November and February for ewes in their second and subsequent lactations and a second peak in March-April for yearlings. Lambing is followed by a milking period of 3-4 months. Once milking finishes, many flocks have access to communal mountain pastures during summer and autumn where they widely interact with other grazing sheep flocks, goats, cattle and wildlife. According to the last census (2015) there were 259,569 Latxa breed sheep in northern Spain, showing a reduction of 30% in the last 10 years (354,445 sheep in 2005) (http://www.eustat.eus/banku/id_4017/indexLista.html). A survey carried out in 2005 in 154 dairy sheep flocks indicated that *C. burnetii* was actively circulating in the region (García-Pérez et al., 2009). In this context, 10 years later, this study was aimed at i) identifying changes in the prevalence of *C. burnetii* in dairy sheep after a period of 10 years in the area, and ii) characterizing the genotypes infecting dairy sheep in the region in both time points to evaluate changes over time. No compulsory control actions against Q fever had been taken during the 10-year period.

BTM samples were collected from 81 sheep farms in March-April 2015, when both, ewes and yearlings, were being milked. Serological analyses were performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (PrioCHECK™ Ruminant Q Fever Ab Plate ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA was extracted using the QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany), with modifications already described (Piñero et al., 2014c), and presence of *C. burnetii* DNA was investigated by real-time PCR, targeting the transposon-like repetitive region *IS1111* of *C. burnetii* (Schets et al., 2013), including a commercial internal amplification control (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, Thermo Fisher Scientific) to monitor for PCR inhibitors.

The percentage of flocks with antibodies against *C. burnetii* in BTM samples was 32.1% (26/81) and the percentage of flocks with *C. burnetii* DNA in milk was 23.5% (19/81). Three flocks were BTM negative by ELISA but low levels of bacterial shedding were detected by real-time PCR (Ct 33-35).

In order to assess changes in *C. burnetii* infection after a 10-year period, BTM ELISA and PCR results from 154 sheep flocks sampled in March-April 2005 (García-Pérez et al., 2009; Ruiz-Fons et al., 2010), were compiled and Chi-square tests were used to compare infection prevalence (2015 vs. 2005). The ELISA test used in both studies was the same (commercialized

by LSI, France in 2015), but the PCR method differed (conventional PCR was used in 2005, real-time PCR in 2015). The number of sheep flocks surveyed in both studies represented 30% of the professionally managed flocks with over 100 reproductive ewes in the study region. ELISA and PCR results obtained in 2015 did not significantly differ from those obtained in 2005 (Table 8). However, a slight decrease in the prevalence of flocks with antibodies against *C. burnetii* (40.3% in 2005 vs. 32.1% in 2015; $\chi^2= 1.51$, $df=1$, $p >0.05$) and a slight increase in the percentage of flocks with *C. burnetii* DNA in the BTM were observed (22.1% in 2005 vs. 23.5% in 2015; $\chi^2= 0.06$, $df=1$, $p >0.05$).

Table 8. Percentage of *C. burnetii* positive flocks and SNP genotypes identified in bulk-tank milk samples collected in 2005 and 2015 in northern Spain.

Year	N	BTM analyses		Ref.	Single Nucleotide Polymorphism (SNP)				Ref.
		ELISA Positive (%)	PCR Positive (%)		N	SNP1 Positive (%)	SNP4 Positive (%)	SNP8 Positive (%)	
2005	154	62 (40.3)	34 (22.1)	García-Pérez et al., 2009; Ruiz-Fons et al., 2011	16	3 (18.8)	1 (6.3)	12 (75.0)	this study
2015	81	26 (32.1)	19 (23.5)	this study	12	10 (83.3)	0 (0.0)	2 (16.7)	this study

Comparison of both series of data identified 46 flocks which were sampled in both surveys. Again, non-significant differences similar to those described for the whole dataset of farms were observed when considering seroprevalence (43.5% in 2005 vs. 37.0% in 2015; $\chi^2= 0.41$, $df=1$, $p >0.05$) or bacterial (DNA) shedding (21.7% in 2005 vs. 28.3% in 2015; $\chi^2= 0.47$, $df=1$, $p >0.05$). The different molecular techniques used in both periods, conventional PCR vs. real-time PCR, the latter being more sensitive (Galiero et al., 2016), could have contributed to the slight but non-significant increase in shedding. Unfortunately, the small amount of DNA available from BTM samples collected in 2005 prevented us from reanalysing them with real-time PCR. Changes in the *C. burnetii* status of some flocks were observed between samplings when considering a flock as “negative” when BTM was negative by ELISA and PCR, and as “positive” when positive by ELISA or PCR, (Table 9). Thus, 11 flocks that were negative in 2005 were positive in 2015, 18 maintained their initial status (positive or negative), and 17 positive flocks were negative in 2015. Interestingly, 8 of the 25 positive flocks in 2005 were still positive in 2015. Had vaccination been implemented, the prevalence of *C. burnetii* might have decreased significantly as happened in The Netherlands (van den Brom et al., 2015b). In the region of the

current study, an inactivated vaccine has only been used at an individual basis by a scarce number of sheep breeders and no specific collective control actions were implemented from 2015 to 2015. The results may suggest that infectious stages of *C. burnetii* persisted in the farm environments during this period in the 8 flocks that remained positive. Alternatively, reinfections could have also occurred during this 10-year period e.g., due purchase of infected animals, contact with other infected flocks, wildlife, etc., with an unnoticed period of infection clearance between samplings.

Table 9. *C. burnetii* infection status in 2005 and 2015 of the 46 sheep flocks from northern Spain analysed in both periods.

Number of examined sheep flocks	<i>C. burnetii</i> status in 2005	<i>C. burnetii</i> status in 2015
11	negative	positive
10	negative	negative
17	positive	negative
8	positive	positive

Geographical coordinates of the 46 farms sampled in 2005 and 2015 were recorded using a global positioning system (GPS) device. Data on Q-fever status of each flock (positive/negative) were geographically represented using QGIS Las Palmas 2.18.16 Geographical Information System to visualize changes in the spatial distribution of *C. burnetii* overtime (Figure 5). Considering that *C. burnetii* can be dispersed by the wind, flocks in the vicinity of a positive flock would be expected to be also positive. However, in 2005, negative and positive farms were homogeneously located throughout the sampled territory. Conversely, in 2015, infection seemed to have cleared in some flocks from the eastern part of the region. Mapping the epidemiological status of *C. burnetii* in the studied flocks showed that in some areas the infection seemed to clear out without specific control measures while in other areas it seemed to persist for years. The analysis of more than one BTM sample per lactation period and additional intermediate controls during the 10-year time-frame should have been performed to get more accurate data on *C. burnetii* persistence over time. However, this was a first approach using this methodology that will be further developed for the evaluation of the efficacy of vaccination-based control measures that will be soon implemented in the Basque Country, Spain.

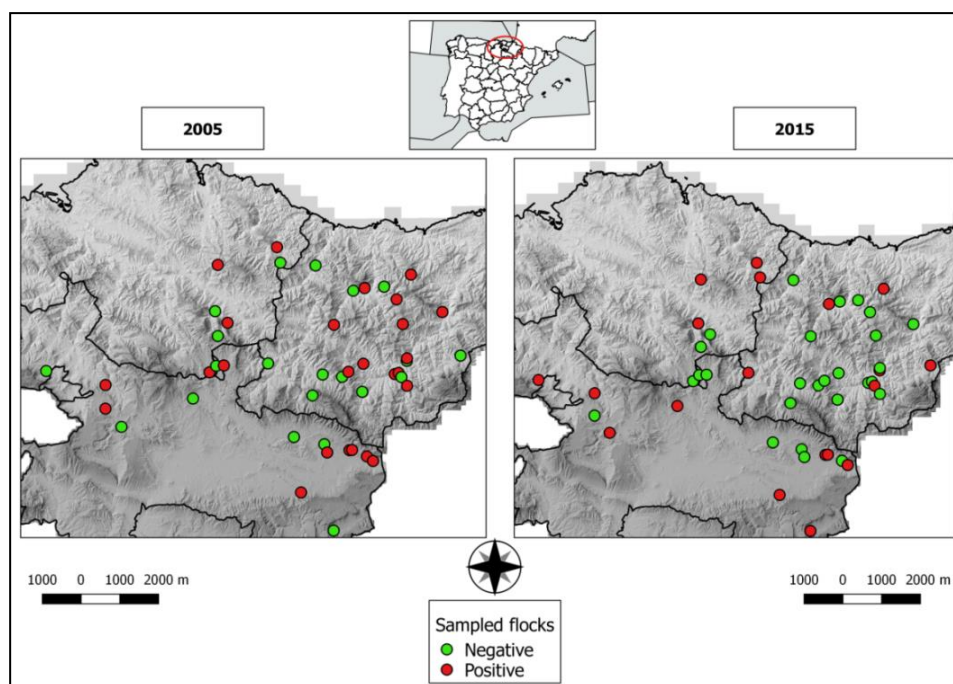


Figure 5. Spatial geographical location of 46 sheep farms in northern Spain sampled in 2005 and 2015 and their *C. burnetii* status. Negative flocks (ELISA and PCR negative on bulk-tank milk) are represented as green dots, where as positive flocks (ELISA and/or PCR BTM-positive) are shown as red dots.

A subset of real-time PCR positive samples with a Ct <31 was selected and genotyped by single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, implementing the 10 SNP determination already described (Huijsmans et al., 2011), a highly discriminatory technique that has demonstrated to be valuable for direct genotyping of field samples with low bacterial burdens, such as milk samples (Huijsmans et al., 2011). A total of 28 real-time PCR positive samples were genotyped, 16 from 2005 and 12 from 2015, all from different flocks. Three SNP genotypes were identified: SNP1 and SNP8, found both in 2005 and 2015, and SNP4, found only once in 2005 (Table 8). Genotype SNP1 has been detected in goats, sheep, or cattle in several countries such as France, Belgium and The Netherlands (Boarbi et al., 2014; Dal Pozzo et al., 2016; Huijsmans et al., 2011), and in human patients in the Q fever outbreak from the Netherlands (Huijsmans et al., 2011). SNP8 has been described in human infections in Italy and Slovakia, and has been also found in ticks from Russia, and in ticks and small mammals from Slovakia (Huijsmans et al., 2011). Recently, we found SNP1 (MST13) and SNP8 (MST18) in Spanish goat farms identified as the most probable sources of two outbreaks of Q fever infections in humans experiencing fever and pneumonia (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Hurtado et al., 2017). Therefore, sheep carrying *C. burnetii* genotypes SNP1 and SNP8 could also pose a risk for human infections in the study area.

Comparison of frequencies of genotypes by Chi-square tests revealed that distribution of SNP genotypes changed significantly in the two periods. Hence, whereas in 2005 SNP8 was the predominant type (12/16), in 2015 SNP1 was the most prevalent (10/12) (Fisher exact test, $p < 0.01$), indicating changes in the pattern of genotype infection over time, possibly due to the infection by co-circulating *C. burnetii* strains, and/or the evolution of previously detected strains (Gurtler et al., 2014). In fact, the presence of multiple *C. burnetii* strains within a single sheep flock has been reported previously (Joulié et al., 2015). Also, SNP1 dominance in 2015 might be the result of a recent adaptation of this genotype in sheep and a rapid dispersal within the sheep population. However, this hypothesis should be confirmed in further studies. Interestingly, SNP4, recovered from human blood in Slovakia (Huijsmans et al., 2011), was also identified in one flock in 2005 and was not detected thereafter. These results show the importance of understanding the natural dynamics of this zoonotic pathogen in its major reservoirs to efficiently prevent the negative effects caused by Q fever to animal production and public health.

In conclusion, *C. burnetii* infection presents a dynamic pattern in the studied sheep population. However, the observed trend indicated a stability in the overall percentage of infected sheep flocks in a region where no collective intervention measures have been yet implemented. The analysis of BTM samples in dairy ruminants is an easy strategy to identify infected flocks. Antibody levels in BTM are consistent with findings in serum of dairy ewes over time (Joulié et al., 2017a). In addition, PCR analysis of BTM allows identification of animal shedders in the flock (García-Pérez et al., 2009), but only if BTM samples are collected soon after the start of the milking period of ewes and yearlings since *C. burnetii* shedding through milk in small ruminants is shorter compared to other excretion routes (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Joulié et al., 2017a).

ARTÍCULO / ESTUDIO 2

Monitoring *Coxiella burnetii* infection in naturally-infected dairy sheep flocks throughout four lambing seasons and investigation of viable bacteria

Álvarez-Alonso, R., Zendoia, I.I., Barandika, J.F., Jado, I., Hurtado, A., López, C.M.,

García-Pérez, A.L.

Front. Vet. Sci. (Submitted, 29 March 2020, see Anexo I)

ABSTRACT

Progression of *Coxiella burnetii* infection in four naturally-infected sheep flocks, and in their farm environment, was monitored throughout four lambing seasons. Flocks with an active infection were selected based on the presence of *C. burnetii* DNA in bulk-tank milk (BTM) during the previous milking-period (Spring 2015) and a high seroprevalence in yearlings. During four consecutive lambing seasons (2015/16-2018/19), samples were collected within one week after each lambing period from animals (vaginal swabs, milk and feces from ewes and yearlings) and the environment (dust inside farm premises). BTM samples and aerosols (outdoors and indoors) were monthly collected between lambing and the end of milking. Real-time PCR analyses showed different trends in *C. burnetii* shedding in the flocks, with a general progressive decrease in bacterial shedding throughout the years, interrupted in three flocks by peaks of infection reactivation associated to specific management practices. A significant relationship was found between *C. burnetii* fecal shedding and the bacterial burden detected in dust, whereas shedding by vaginal route affected the detection of *C. burnetii* in indoors aerosols. Three genotypes were identified; SNP8 (3 flocks, 52.9% of the samples), SNPI (2 flocks, 44.8% samples), and SNP5 (1 flock, two environmental samples). *C. burnetii* viability in dust measured by culture in Vero cells was demonstrated in two of the flocks, even during the fourth lambing season. The results showed that infection can remain active for over 5 years if effective control and biosafety measures are not correctly implemented.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Q fever, sheep, goats, genotypes, viability, environment

INTRODUCTION

Q fever is a widespread zoonosis caused by the intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. Goats and sheep are considered the main reservoir of *C. burnetii*, and both have a significant role as human infection sources (EFSA, 2010; van den Brom et al., 2015a). Q fever causes abortions in small ruminants (Agerholm, 2013), and once *C. burnetii* enters into a flock infection spreads rapidly. Infected animals shed *C. burnetii* through birth products, vaginal fluids, feces, milk and urine for several weeks after abortion or normal parturition (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Astobiza et al., 2010; Berri et al., 2001; Berri et al., 2005b; Berri et al., 2007; Joulié et al., 2015; Rodolakis et al., 2007), but the bacterial load shed by aborted animals is higher than that shed by those that deliver normally (Joulié et al., 2015). Abortion rates due to *C. burnetii* are especially high in goats (up to 70-90%) (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Rousset et

al., 2009b), but lower in sheep (usually below 6%) (Dijkstra et al., 2012). These low rates can be considered normal by the farmer, and consequently, samples of aborted animals are not submitted to the laboratory. Therefore, Q fever is not diagnosed, control measures are not implemented, and the infection can be maintained in a sheep flock throughout consecutive lambings. In a recent study carried out in dairy sheep flocks, *C. burnetii* shedding through milk was still observed in several flocks 10 years after first detection (Álvarez-Alonso et al., 2018a). This suggests that flock management practices together with lack of control measures implemented can cause periodical reactivation of *C. burnetii* infection (Barlozzari et al., 2020; Muema et al., 2017; Plummer et al., 2018; Rizzo et al., 2016).

C. burnetii shedding by infected animals together with their movements inside animal premises, promote the formation of contaminated aerosols. Bacterial load in aerosols is the highest at the peak of abortions (Álvarez-Alonso et al., 2018b) and also correlates with the number of shedders in the flock (Astobiza et al., 2011b). The progression of natural infection by *C. burnetii* in sheep flocks during several breeding seasons has not been fully investigated, thus, the length of time the infection remains active in the flock is unknown. It is known that in the breeding seasons that follow an outbreak of abortion by Q fever, abortions are rare in sheep, and *C. burnetii* shedding naturally decreases (Berri et al., 2002). Vaccination with phase I vaccine helped to decrease bacterial shedding in ewes and yearlings from infected flocks in the two first years, giving a complete clearance of the infection after four years of vaccine implementation (Astobiza et al., 2011a). However, *C. burnetii* DNA was still detected in dust samples in the fourth season after vaccination (Astobiza et al., 2011a). Presence of *Coxiella* DNA in dust collected in farm premises has been reported in several studies (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Astobiza et al., 2011a; Joulié et al., 2015; Kersh et al., 2013), but the time *Coxiella* remains viable has been scarcely investigated (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Kersh et al., 2013). In fact, the small-cell variant (SCV) is a spore-like form of *C. burnetii* which can survive during long periods of time in the environment (Angelakis and Raoult, 2010). Results pointed out that loads of viable *C. burnetii* are at the highest level during lambing/abortion period, and progressively decrease thereafter until no viable bacteria are detected two months after the last parturition (Álvarez-Alonso et al., 2018b). However, (Kersh et al., 2013) still found viable *Coxiella* in a goat farm in the kidding season that followed an abortion outbreak.

The genotype of *C. burnetii* could affect the course of infection (Eldin et al., 2017; Melenotte et al., 2019). In Spain, there is no much information about genotypes of *C. burnetii* involved in Q fever cases, neither in humans nor in animals. Recent studies carried out in Northern Spain identified goats rather than sheep as the main source of Q fever for humans,

with pneumonia as the main symptom (Alonso et al., 2015; Alonso et al., 2019; Álvarez-Alonso et al., 2018b; Hurtado et al., 2017), but, interestingly, sheep and goats share the same *C. burnetii* genotypes in this area (Álvarez-Alonso et al., 2018a; Álvarez-Alonso et al., 2018b; Hurtado et al., 2017). Therefore, further studies are needed to better understand the epidemiological features of *C. burnetii* infection in sheep. This work was aimed at studying the progress of *Coxiella* infection throughout four lambing seasons in four dairy sheep flocks in semi-extensive management systems in which no vaccination program was implemented. Genotyping of the strains involved and the investigation of *C. burnetii* viability in consecutive breeding seasons would help to better understand Q fever infection in sheep.

MATERIAL AND METHODS

Selection of flocks and sampling approach

Latxa breed is the dairy breed of sheep in the Basque Country. Lambing takes place once per year, between November and January in ewes, and between March and April in yearlings. Animals are housed permanently in winter and at night and in rainy weather during the milking season, which ends in June-July. After that period, flocks are moved to communal mountain pastures where animals share grazing areas with livestock and wildlife.

Four sheep flocks that tested real-time PCR positive to *C. burnetii* on bulk-tank milk (BTM) samples collected in March-April 2015 were selected. These flocks also showed a high seroprevalence against *C. burnetii* by ELISA in yearlings (Table 10). Both results suggested that *C. burnetii* infection was recent. Farmers were interested in collaborating and studying the evolution of the infection throughout four lambing seasons: 2015/16, 2016/17, 2017/18 and 2018/19. It should be noted that at the beginning of this study there was a stock rupture in the production of the Phase I inactivated vaccine, so vaccination could not be considered. A questionnaire was conducted to collect data on census, farm characteristics, management system, abortion history, and hygiene and biosecurity measures implemented in each farm. According to farmers' perception, significant abortions were not reported in the years prior to the study. However, one of them reported that a family member had suffered from pneumonia in the 2014/15 productive season, but since hospitalization was not needed, the etiological agent was not identified. For the correct management of the placentas, farmers were offered a freezer and biohazardous waste disposal containers, which, once filled, would be removed for incineration of infectious material. The goal was to quickly remove potentially infective material from the farm environment, thereby reducing possible environmental contamination. Three of

the farmers performed this procedure, while the fourth (Flock 2) had a type of slatted floor that favored placentas to fall directly into the slurry pit. Table 10 summarizes information about selected flocks. Two of the flocks (Flock 2 and Flock 3) used to buy animals from other flocks. Flock 4 had old animal premises and moved to a new farm in the lambing season 2018/19.

Table 10. General information of the sheep flocks included in the study: management practices, characteristics of animal premises, biosecurity measures implemented in the farms, and Q fever status prior to the study started.

	Flock 1	Flock 2	Flock 3	Flock 4
Census				
Ewes	416	250	543	411
Yearlings	80	50	87	83
Communal pastures	Ewes	Ewes & Yearlings	Ewes	Ewes & Yearlings
Cattle in the farm	Yes	No	No	No
Goats in the farm	Yes	No	No	No
Purchase of animals	No	Yes	Yes	No
Abortions >3%	No	No	No	No
Characteristics of the farm premises				
Year of construction	1995	2009	2007	1975*
Ventilation	Regular	Bad	Regular	Bad
Slatted floor	Yes	Yes	No	No
Straw bedding	Yearlings	No	Yes	Yes
Water source	Well	Well	Tap water	Tap water
Frequency of manure removal	Daily	1/year	2/year	2/year
Biosecurity measures				
Management of placentas	Cremation	Manure	Cremation	Cremation
Exclusive cloth	No	No	No	No
Access of visits	Yes	Yes	Yes	Yes
Other measures	No	No	No	No
Q fever status (2014/15)				
Seroprevalence (%)				
Ewes	26.7	40.0	13.3	26.7
Yearlings	66.7	46.7	46.7	53.3
BTM ELISA	Positive	Positive	Positive	Positive
BTM PCR	Positive	Positive	Positive	Positive

*new farm premises for the period 2018/19

Flocks were visited at lambing time during the 4 consecutive lambing seasons. During the first 3 seasons samples were collected from ewes and yearlings, and purchased animals (if any). During the last lambing season only yearlings were sampled. Vaginal exudates (collected with swabs without medium), milk and feces were taken from a maximum of 40 ewes and/or 40 yearlings to evaluate *C. burnetii* shedding. During these visits, environmental samples consisting on duplicates of 8-10 dust samples were also taken from different surfaces of the animal

premises to detect the presence of *C. burnetii* DNA, and for further viability studies (one duplicate kept at -80°C). In addition, monthly visits were made until the end of the milking period, and a BTM sample was collected to monitor *C. burnetii* shedding at the flock level, as well as aerosols collected inside and outside the farm premises. The air sampler "MD8" Sartorius (Goettingen, Germany) was used, performing an aspiration of 100 liters/minute air for 10 minutes. The air passed through a gelatin filter adapted to the equipment, which was analyzed in the laboratory by real-time PCR in order to detect the presence of *C. burnetii* DNA in the aerosols generated at the farm.

Molecular analyses

DNA extraction and real-time PCR

DNA was extracted using the QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Hilden, Germany) with some modifications. Briefly, milk and feces were mixed with 180 µl of ATL buffer (Qiagen, Hilden, Germany) and digested with 20 µl of proteinase K (8 mg/ml) for 30 minutes at 70°C before DNA extraction. Vaginal and dust swabs were treated with 300 µl of TE buffer (Tris Base 10 mM, EDTA 1 mM, pH8) before being mixed with ATL and proteinase K for 1 hour at 56°C. The initial treatment of the gelatin filters from the air sampler was done as previously described (Astobiza et al., 2011b). Negative extraction controls were included every 10 samples to rule out DNA contamination. Presence of *C. burnetii* DNA was investigated by a real-time PCR procedure targeting the transposon-like repetitive region *ISIII* of *C. burnetii* genome (Schets et al., 2013). A commercial internal amplification control (IAC) (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, Thermo Fisher Scientific) was included in the assay to monitor for PCR inhibitors.

Genotyping

A selection of animal and environmental samples positive in real-time PCR with Ct < 31 were analyzed by Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) discrimination using real-time PCR (Huijsmans et al., 2011), and by Multispacer Sequence Typing (MST) (Glazunova et al., 2005) with some modifications described elsewhere (Hurtado et al., 2017).

Serological analyses: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

In order to evaluate seroprevalence against *C. burnetii*, individual milk samples were centrifuged and milk sera were tested for Q fever antibodies using ELISA test (LSIVET Ruminant Serum/Milk Q Fever kit; Thermo Fisher Scientific). An index (S/P) of the tested milk serum optical density to optical density of the positive control ratio was calculated according to the manufacturer's instructions. Individual milk samples with S/P indices ≤ 0.4 were considered negative, while samples with S/P > 0.4 were considered positive.

Viability studies

Ethics

Experimental studies were carried out in BSL3 building facilities, and consisted on experimental inoculations in 6 week-old BALB/c male mice combined with culture in Vero cells. Permissions were obtained from the Ethical & Animal Welfare Committee (Bizkaiko Foru Aldundia, document 3/2017 v02, Reg. 32243 25 June 2018).

Isolation

Viability studies of *C. burnetii* in environmental samples were carried out by passage through mice and culture on Vero cell line. Dust samples collected at lambing of yearlings were homogenized and prepared as detailed elsewhere (Álvarez-Alonso et al., 2018b). Quantification of *C. burnetii* genome equivalents (GE) in each homogenate was carried out by quantitative real-time PCR (qPCR) using 5 μ l of DNA (in triplicates) and specific primers and a probe targeting the *ISIII* gene as described elsewhere (Schets et al., 2013). In each qPCR run, a standard curve was generated using 10-fold serial dilutions of a known concentration of Nine Mile (RSA439) phase II strain of *C. burnetii* DNA. After quantification, aliquots of 200-500 μ l were prepared from each homogenate of dust, containing approximately 10^2 - 10^3 *C. burnetii* GE. These aliquots were inoculated intraperitoneally in 4 mice each; a homogenate of dust with viable *C. burnetii* (Álvarez-Alonso et al., 2018b), collected in a goat farm in 2017 and kept at -80°C , was used as positive control. According to results obtained in previous studies (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Barandika et al., 2019), mice were euthanized on days +14 and +21 p.i., and the spleens were removed. The level of splenomegaly was determined from the ratio of the spleen weight to the body weight. Half of the spleen from each mouse was processed for DNA extraction and real-time PCR amplification as fully detailed elsewhere (Álvarez-Alonso et al., 2018b). Positive samples were subjected to qPCR to quantify the number of *C. burnetii* GE detected in spleen in order to compare it with the number of GE inoculated; when the number of *C. burnetii* GE

recovered from the spleen was equal or higher than the GE inoculated, *C. burnetii* was considered to be multiplied *in vivo*.

For qPCR-positive samples, the second half of the spleen was homogenized with 700 μ l DMEM medium and 2% FBS in a TissueLyser. A hundred microliters of each homogenate were placed on shell vials containing Vero cells [African green monkey epithelial cells VERO C1008 (Vero 76, clone E6, Vero E6 ATCC[®] CRL-1586[™])], as fully detailed elsewhere (Álvarez-Alonso et al., 2018b). Briefly, after harvesting *C. burnetii* from shell vial on day 6 p.i., three passages of 1,000 μ l of harvested cells were transferred at weekly intervals into T25 culture flasks containing a Vero layer. At day 6 p.i. and before each passage, 200 μ l were collected for DNA extraction and qPCR, following procedures described above. Cultures that maintained *C. burnetii* growth during the second or third passage were considered to be positive. Uninfected control cells were kept close to infected cells to rule out possible cross-contaminations.

Statistical analyses

The possible influence of the different factors studied, *i.e.*, flock (categorical; Flock 1, Flock 2, Flock 3, Flock 4), period of lambing (categorical; ewes/yearlings) and lambing season (categorical; 2015-16, 2016-17, 2017-18, 2018-19) over positive or negative *C. burnetii* animals shedding through vaginal fluids, feces or milk was analyzed using a logistic regression. The final model was selected as the one with the lowest AIC value from all of the models performed. Odds ratio values were computed by raising 'e' to the power of the logistic coefficient over the reference category.

Cohen Kappa statistics were used for assessing agreement between shedding by different excretion routes and ELISA results. The symmetry of disagreement between them was evaluated with McNemar's Chi square test.

The risk of environment (dust, indoors/outdoors aerosols) contamination by *C. burnetii* was evaluated with a data mining classification tree using 'rpart' package (Therneau and Atkinson, 2019); dust, indoor aerosols and outdoor aerosols were continuous dependent variables (expressed in Ct values in real time PCR). Classification and regression tree (CRT) identifies variables that divide environmental (dust/aerosols) results in homogeneous subgroups with distinct patterns of *C. burnetii* contamination. The CRT model provides a way to identify main factors. CRT evaluates all the values of the potential factor using as a criterion the significance of a statistical ANOVA test and split maximizing the between-groups sum-of-squares, selecting the best predictor variable to form the branch in a classification tree;

successively splitting in data set makes increasingly homogeneous nodes in relation to the dependent variable. This process continues until the classification tree is fully grown. Figures for CRT were performed by 'rpart.plot' package (Milborrow, 2019).

The degree of splenomegaly in experimental mice was evaluated with a Welch two sample t-test to correct homoscedasticity. Linear regression was performed with the purpose of analysing any relationship between *C. burnetii* GE load present in the inoculum injected to mice and the GE of *C. burnetii* recovered from the spleen of experimental animals. Log-transformed data were used in both analyses. All statistical analyses were performed using the statistical software R version 3.6.2 (R Core Team, 2019).

RESULTS

C. burnetii shedding and serological response in ewes and yearlings

Real-time PCR results showed different trends in *Coxiella* shedding throughout the four-year study in the studied flocks (Figure 6). Overall, the percentage of *C. burnetii* shedders was significantly higher in the first lambing season (2015/16) (Table II). In the first lambing season, Flock 1 showed a high-moderate percentage of ewes shedding *C. burnetii* by different routes (vaginal fluids>feces>milk), but no shedders were detected in the group of yearlings. The following lambing seasons (2016/17 and 2017/18) ewes did not shed *C. burnetii* whereas yearlings showed a reactivation of the infection in the second and fourth lambing seasons. Situation in Flock 2 was affected by the reported purchase of a group of 30 pregnant ewes in December 2015. These animals became infected when they entered into the contaminated animal premises and shed high *C. burnetii* loads at lambing. This caused the reactivation of infection in the flock, which mainly affected the yearlings while the proportion of ewe shedders that season was low (Figure 6). Afterwards, in the following seasons, Flock 2 showed a decrease in the percentage of animal shedders. Patterns of infection in Flock 3 were the opposite, with a low proportion or absence of *C. burnetii* shedders during the first two lambing seasons, and reactivation of infection in yearlings in the last two seasons. Flock 3 introduced a new group of pregnant ewes (N=62) on the 20th March 2017, one week before the lambing of yearlings. Later on, purchased animals showed to be infected at lambing (7 % animal shedders, 2/28, in samplings carried out between 27th March and 19th April). Flock 4 showed a high percentage of shedders during the first lambing season, in both ewes and yearlings, but a significant decrease occurred in the following lambings and no shedders were detected in the last two seasons (Figure 6).

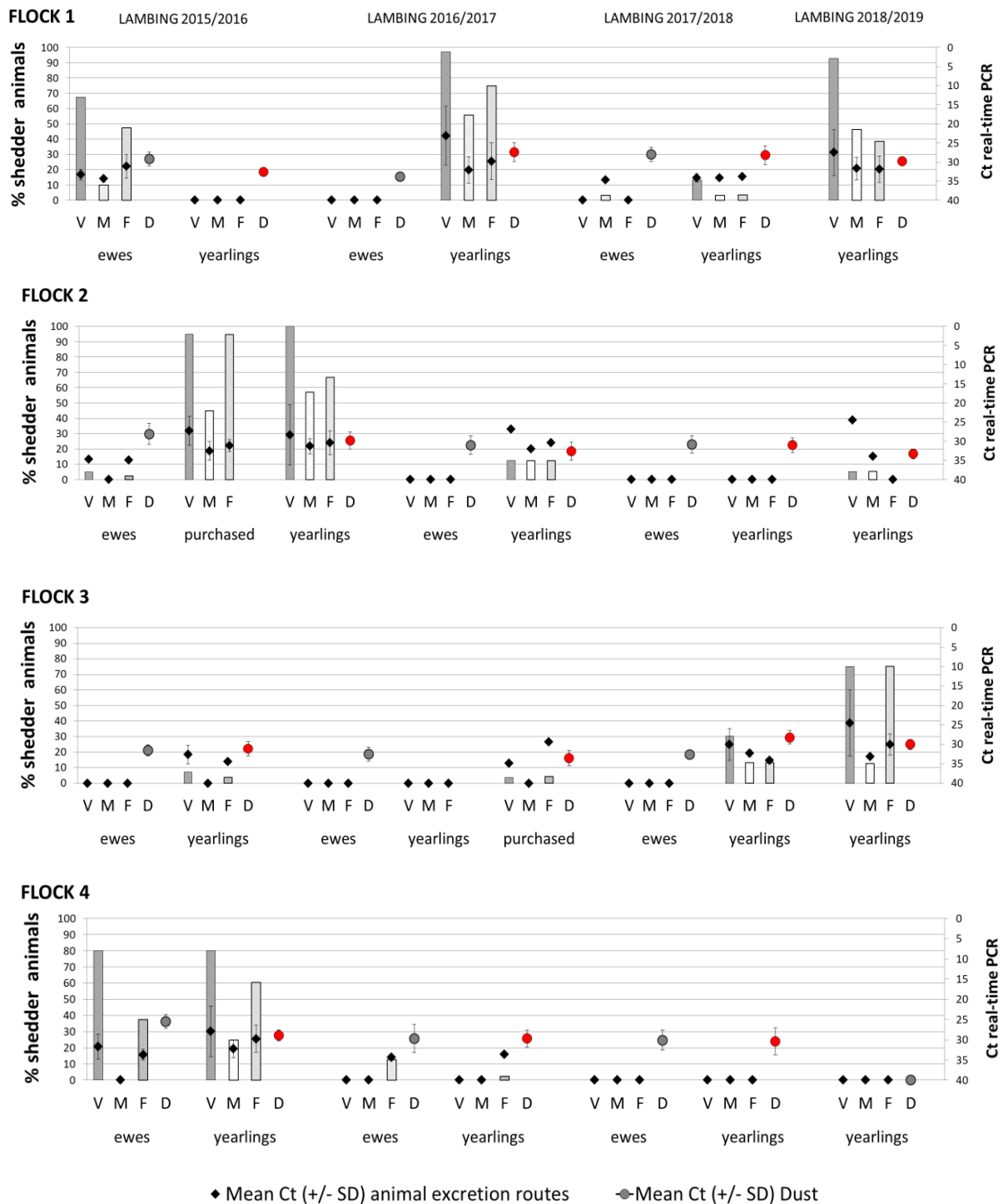


Figure 6. Percentage of *C. burnetii* shedders (ewes, yearlings and, if applicable, purchased animals) throughout the four lambing seasons in the four studied flocks, through vaginal fluids (V), milk (M) and faeces (F) with mean Ct values \pm SD, represented with diamonds. The circles represent the mean of the Ct values \pm SD obtained in real-time PCR from dust samples taken during ewes lambings (grey circles) and yearlings lambings (red circles). Ewes were not sampled in the fourth lambing season and are not represented.

Overall, Flock 4 had a significantly higher number of animal shedders than Flocks 2 and Flock 3, but lower than Flock 1 (Table II). Shedders were more frequently found among yearlings than among ewes, but to a lesser extent than among newly introduced animals (purchased group) (Table II). Regarding *C. burnetii* shedding loads expressed as Ct values in real-time PCR, the highest excretion levels (lowest Ct) were detected in yearlings, especially through vaginal fluids (Figure 6).

Table II. Logistic regression model for the prevalence of shedders.

	Estimate	Z-value	Pr (> t)	OR	CI 95%
Intercept	0.4718	2.233	0.0255	1.60	1.06-2.43
Flock 4 (Ref.)					
Flock 1	0.6048	2.816	0.0050	1.83	1.20-2.80
Flock 2	-1.1090	-3.775	0.0001	0.33	0.18-0.58
Flock 3	-1.7177	-5.553	0.0001	0.18	0.10-0.32
Yearlings (Ref.)					
Ewes	-0.7806	-3.762	0.0001	0.46	0.30-0.68
Purchased	1.2847	4.353	0.0001	6.20	2.74-14.26
Lambing.season 2015-2016 (Ref.)					
Lambing.season 2016-2017	-1.7405	-7.708	0.0001	0.18	0.11-0.27
Lambing.season 2017-2018	-2.4730	-8.327	0.0001	0.08	0.05-0.15
Lambing.season 2018-2019	-0.6371	-2.166	0.0303	0.52	0.30-0.93

Comparison of seroprevalence in ewes throughout the lambing seasons showed marked differences between flocks (Figure 7). Thus, in Flock 1 seroprevalence in ewes ranged between 58-80%, in Flock 2 and Flock 4 between 30-60%, and the lowest seroprevalences were found in Flock 3 (35-40%). Thirty two percent of the recently purchased ewes (9/28) in Flock 3 had antibodies against *C. burnetii*, suggesting that ewes were already infected when introduced into the flock.

In yearlings, seroprevalence increased or decreased according to the trends of *C. burnetii* infection in each flock, showing in general lower seroprevalences than ewes. In Flock 4, yearlings showed an increase of seroprevalence in the third lambing season. Only Flock 2 showed a progressive decrease in seroprevalence during the study period, with yearlings being seronegative in the last lambing season (Figure 7). Independently of the shedding route (vaginal, feces or milk), a high percentage of *C. burnetii* shedders was not always positively correlated with seroprevalence (Figure 7). Cohen Kappa (Kappa=0.114) and McNemar's test (McNemar's Chi-squared=17.45, df=1, p=0.0001) statistics showed a poor relationship between *C. burnetii* shedding and ELISA results.

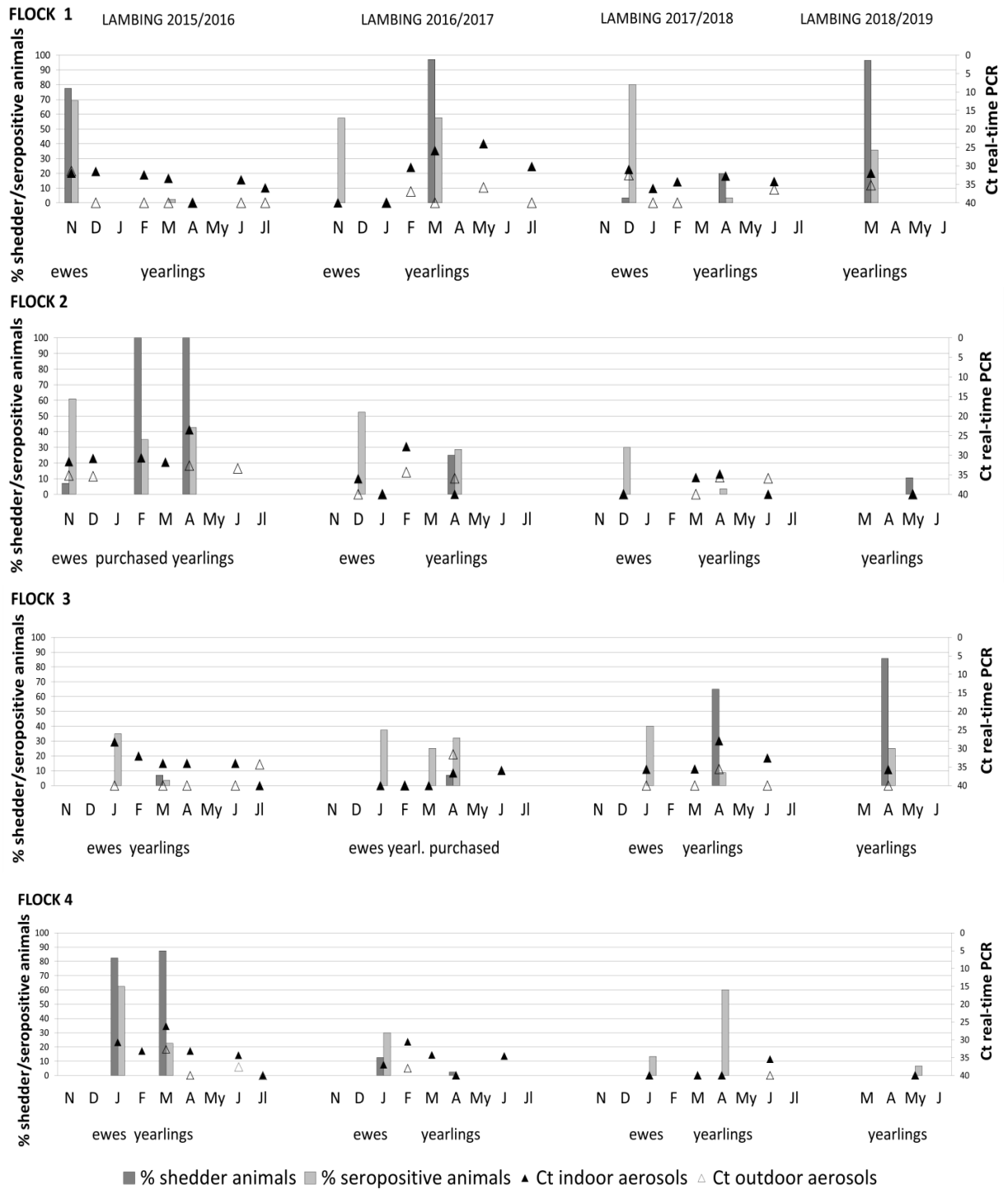


Figure 7. Percentage of shedder animals by at least one excretion route (vaginal fluids, faeces or milk), and seroprevalence observed corresponding to ewes and yearlings of the four studied flocks during four lambing season (bars). *C. burnetii* DNA present in aerosols taken outside (empty triangles) and inside (black triangles) animal premises from lambing to the end of milking season are also represented. Ewes were not sampled in the fourth lambing season and are not represented.

The evolution of *C. burnetii* DNA presence in BTM samples during the four milking seasons is shown in Figure 8. In the first lambing season bacterial shedding was very low in the four herds, always with Ct >30. In all milking seasons, bacterial load in BTM was higher after yearlings were included in milking (from February onwards). The highest bacterial load (Ct = 30) was found in Flock 1 in the second lambing season. The reactivation of *C. burnetii* infection observed in yearlings from Flock 1 and Flock 3 (see above) was also reflected in the bacterial load detected in BTM samples (Figure 8).

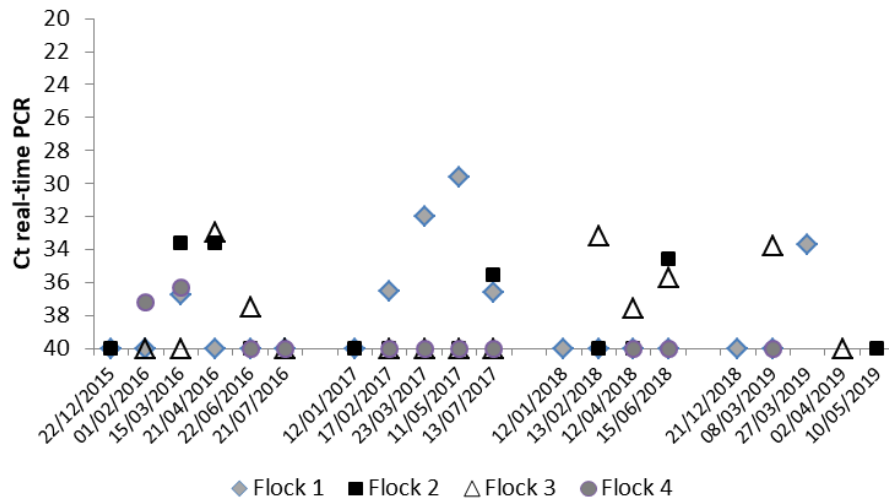
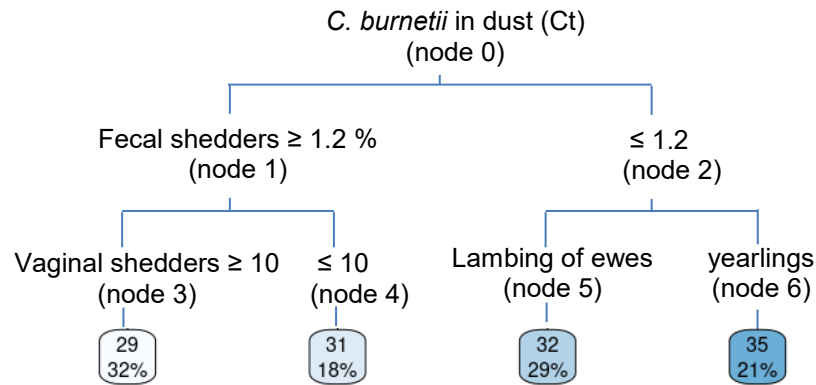


Figure 8. Evolution of *C. burnetii* shedding through milk measured by BTM real-time PCR analyses throughout the four milking periods.

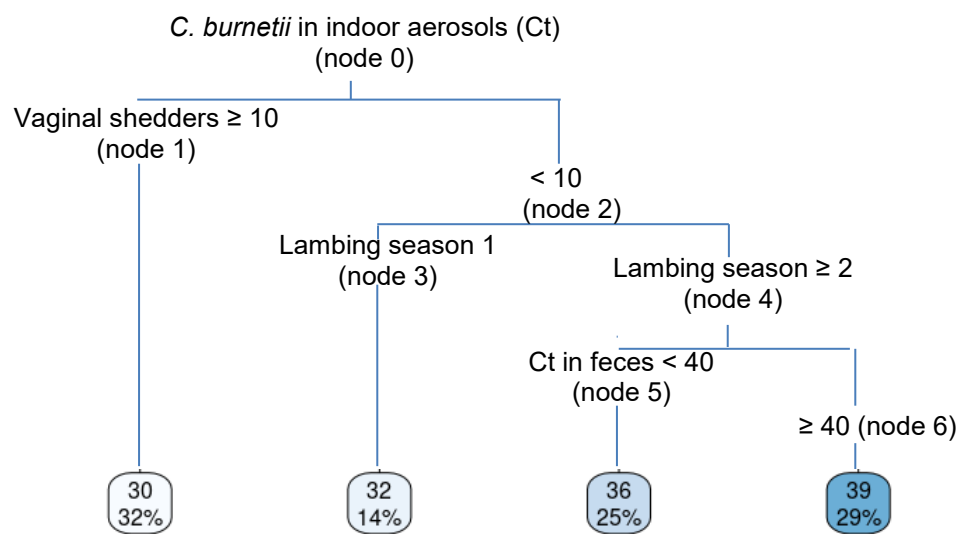
C. burnetii in environmental samples

Dust samples taken from different surfaces of animal premises at ewes and yearlings lambings were *C. burnetii* DNA-positive throughout the four years of the study (ranges of Ct 26-33), the only exception being Flock 4, which became negative in the fourth lambing season. This flock had moved to new animal premises before lambing season 2018/2019 started, and *C. burnetii* DNA was not detected in dust thereafter. In the other three flocks, sporadic increases in dust bacterial load with respect to previous years were associated to increases in the number of shedders (Figure 6). The CRT algorithm stratified variables that played an important role in the amount of *C. burnetii* in dust (Figure 9A) and identified two determining factors for higher amounts of *C. burnetii* in dust (Ct 29, 32% samplings), *i.e.*, a percentage of fecal shedders higher than 1.2% (node 1), followed by the presence in the flock of more than 10% of shedders by vaginal route (node 3). When presence of fecal shedders was low (node 2), presence of *C. burnetii* in dust was determined by the lambing of ewes rather than yearlings (Figure 9A).

A



B



C

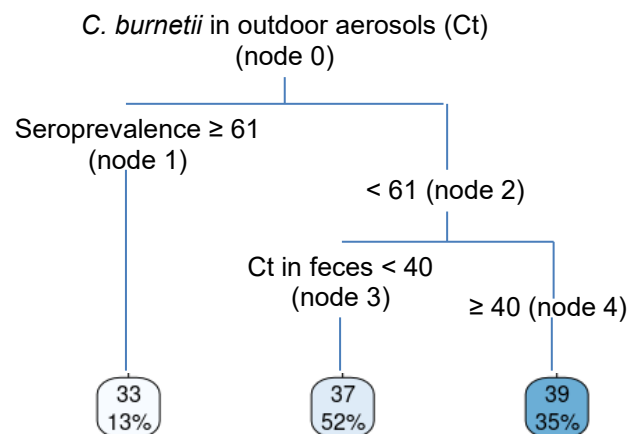


Figure 9. Classification and regression tree (CRT) showing determining risk-factors for *C. burnetii* detection in dust (A), indoor aerosols (B) and outdoor aerosols (C).

Results for the aerosols taken monthly inside and outside the farm from lambing until the end of the milking period are shown in Figure 7. Flocks 2 and 4 showed a progressive decrease in environmental contamination inside the farm in the course of the study, and in the fourth season aerosols taken at yearlings lambing were negative. On the contrary, Flocks 1 and 3 showed sporadic increases of bacterial loads in aerosols due to the reactivation of the infection in the flocks, and in the last lambing season positive aerosols were still detected inside the farm. Presence of *C. burnetii* in indoors aerosols was determined by the percentage of vaginal shedders (node 1) (Figure 9B), and when the percentage of shedders was below 10% (node 2), lambing season was pointed out as a determining factor (node 3); in the first lambing season, mean Ct value in dust was higher than in the following seasons. From the second lambing period onwards, Ct values in dust were determined by *C. burnetii* load shed through feces (node 5). Contamination of outdoors aerosols was less frequent, and when positive, the bacterial load was always lower ($Ct > 32$) than in aerosols taken inside the farm (Figure 7). Based on CRT algorithm results, rates of seroprevalence higher than 61% (node 1) determined the presence of positive aerosols outside animal premises (Figure 9C), and when seroprevalence in the flock was lower, a higher excretion of *C. burnetii* through feces ($Ct < 40$) (node 3) was the determining factor.

Genotypes of *C. burnetii*

A selection of samples (vaginal fluids, feces, milk, dust and aerosols), with low Ct values in real-time PCR, were analyzed by SNP genotyping. The number of genotyped samples in each flock depended on the infection status shown in the course of the study. Thus, a total of 87 DNA samples could be genotyped (Flock 1, 27 samples; Flock 2, 25 samples; Flock 3, 18 samples; Flock 4, 17 samples), mainly from animals (61%) and dust (28%), and to a lesser extent, aerosols (11%). In Flocks 1 and 4 only one genotype was identified (SNP8 in Flock 1 and SNP1 in Flock 4). In Flock 2 three genotypes were identified (SNP1, SNP5, SNP8), but SNP1 was the predominant genotype. In Flock 3, two genotypes were identified (SNP1 and SNP8), but SNP8 was the predominant in both, animals and environmental samples (Table 12). Overall, SNP8 was the most widespread genotype, found in three flocks and accounting for 52.9% of the samples; SNP1 was found in 2 flocks and 44.8% of the samples. For a selection of DNA samples (N=4) the MST genotype was also determined. Two SNP1 samples from Flock 2 and Flock 4 belonged to the MST13 genotype, while two SNP8 samples from Flock 1 and Flock 2 corresponded with MST18. Unfortunately, no complete MST results were obtained from the only sample (dust) with SNP5 genotype.

Table 12. SNP genotyping results from selected DNA samples obtained in each flock from animals and the environment (dust and aerosols) during the four lambing seasons.

Lambing season	Origin of samples	Flock1	Flock 2			Flock 3		Flock 4
		SNP8	SNP1	SNP5	SNP8	SNP1	SNP8	SNP1
2015-2016	Ewes/yearlings*	5	13	-	1	1	-	12
	Dust	-	3	-	-	-	3	3
	Aerosols	-	1	1	-	-	1	1
2016-2017	Ewes/yearlings*	6	1	-	-	-	1	-
	Dust	2	1	1	-	-	1	1
	Aerosols	3	1	-	-	-	-	-
2017-2018	Ewes/yearlings*	-	-	-	-	-	2	-
	Dust	2	-	-	1	-	2	-
	Aerosols	1	-	-	-	-	1	-
2018-2019	Ewes/yearlings*	6	1	-	-	-	4	-
	Dust	2	-	-	-	-	2	-
	Aerosols	-	-	-	-	-	-	-

*vaginal fluids / milk / faeces

Viability of *C. burnetii* in dust

The duplicates of dust samples collected at each yearling lambing were pooled and processed to study *C. burnetii* viability using mouse model and cell line culture. Ct values of dust homogenates in real-time PCR ranged between 28.7 and 35.5 (Table 13). Each dust homogenate was inoculated in four 6 week-old BALB/c mice. *C. burnetii* DNA was detected in the spleen of 13 of the 16 mice inoculated with dust collected in Flock 1 (3 mice with lower GE than inoculated) corresponding to dust collected in the four lambing seasons. In Flock 2, only the spleen of one mouse inoculated with a dust sample taken in the second lambing season was real-time PCR positive. In Flock 3, six mice inoculated with dust collected in the first and fourth lambing seasons were positive in real-time PCR. Mice inoculated with dust homogenates from Flock 4, were all negative. The four mice of the positive control were all positive (1 mouse with lower GE than inoculated).

SNP genotypes were analyzed in positive spleens, and SNP8 was identified in mice inoculated with dust samples from Flock 1 and Flock 3, whereas SNP1 was identified in the only mouse positive from Flock 2. Interestingly, SNP5 detected in two environmental samples in Flock 2, was not recovered from mice.

A significant correlation was observed between the *C. burnetii* GE inoculated and the *C. burnetii* GE recovered from spleen (adjusted R-squared=0.4398, $p=0.0042$). To assess splenomegaly the ratio spleen weight / live weight of mice was compared between positive mice (*C. burnetii* DNA detected in spleen by real-time PCR) and negative mice. Significant differences

were observed ($t=-3.6449$; $df=29.512$; $p=0.0010$) and positive mice showed a ratio 1.53 times greater than negative mice.

Cultures in Vero cells of homogenates of spleens from the 20 real-time PCR positive mice resulted in growth in seven mice (Table 13). Only when the number of *C. burnetii* GE inoculated into shell vials was 9.5×10^5 or above was growth in cell cultures observed for at least two passages. *C. burnetii* isolates were successfully cultured from dust collected in Flock 1 in the second and fourth lambing season, whereas in Flock 3, viable *C. burnetii* was only recovered in dust collected in the fourth lambing seasons.

DISCUSSION

This study showed the patterns of *C. burnetii* infection in 4 naturally infected dairy sheep flocks throughout four lambing seasons. Presence of animal shedders in the previous milking season, and high seroprevalence in yearlings suggested at the beginning of the study that infection was active in all flocks (EFSA, 2010; Plummer et al., 2018). It is known that shedding of *C. burnetii* by vaginal fluids, feces and milk can persist in the breeding season that follows infection onset in small ruminant farms, even when vaccination has been implemented (Astobiza et al., 2011a). In this study, the low percentage or even absence of shedders among ewes (Flock 2, Flock 3) and yearlings (Flock 1) during the first lambing season supported the suspicion that *C. burnetii* infection had been present in these flocks before the 2014/15 season. Besides, infection was still active in some flocks in the fourth lambing season (Flocks 1 and Flock 3), leading to think that *C. burnetii* infection can remain in a flock for more than 5 years, probably due to periodical reactivations. In fact, a previous study hypothesized that infection could be maintained for ten years (Álvarez-Alonso et al., 2018a). The outcome of infection showed the most desirable progression in Flock 4, which started with the highest percentage of animal shedders and the highest bacterial shedding in ewes and yearlings during the first lambing season, followed by a significant decrease in the following years until the infection disappeared in the fourth lambing season. Movement of the flock to new uncontaminated farm premises before lambing season 2018/2019 undoubtedly helped to keep the flock free of infection.

The fact that the bacterial load shed throughout the 4-years of the study was lower in ewes than in yearlings also supports the idea that infection had established in the flocks some time before the study started. Had the infection onset occurred before, ewes would have had time to develop immunity whereas yearlings would have been more susceptible to the infection (Joulié et al., 2015).

Table B. Investigation of viable *C. burnetii* in dust collected at yearling lambings in the studied flocks throughout the study using Balb/c mice and culture in Vero cell lines.

Flock	Lambing period	Ct real-time PCR (mean)	Balb/c mice inoculation					Culture in cell lines (Vero E6) (GE/ml)					
			No. of GE ^a injected	No. of mice inoculated at day +14 p.i.	No. of mice inoculated at day +21p.i.	No. of positive mice (day p.i.)	No. of GE in spleen	Inoculated	Day 6 p.i.	1 st passage	2 nd passage	3 th passage	Viable <i>C. burnetii</i>
1	2015-2016	32.9	3.8 x10 ²	2	2	2 (+14)	1.7x10 ³	1.00 ×10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No
							1.0 x10 ³	1.00 ×10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No
						1 (+21)	1.3 x10 ⁴	1.00 ×10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No
	2016-2017	28.8	5.8 x10 ³	2	2	2 (+14)	3.4 x10 ⁴	1.54 ×10 ²	3.44 ×10 ²	0.0	0.0	0.0	No
							1.2 x10 ⁵	1.42 ×10 ³	3.71 ×10 ³	5.80 ×10 ²	0.0	0.0	No
						2 (+21)	1.1 x10 ³	1.00 ×10 ²	2.01 ×10 ³	0.0	0.0	0.0	No
	2017-2018	29.6	3.4 x10 ³	2	2	2 (+14)	9.8 x10 ⁶	9.50 ×10 ⁵	8.16 ×10 ⁵	1.43 ×10 ⁶	2.88 ×10 ⁵	2.26 ×10 ⁵	Yes
							2.5 x10 ²	1.00 ×10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No
							4.1 x10 ²	1.00 ×10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No
	2018-2019	28.7	6.2 x10 ³	2	2	2 (+14)	7.0x10 ⁵	1.20 ×10 ⁴	1.11 ×10 ⁴	9.10 ×10 ³	0.0	0.0	No
							4.5x10 ⁷	9.45 ×10 ⁵	4.23 ×10 ⁵	1.94 ×10 ⁵	2.22 ×10 ⁵	0.0	Yes
						2 (+21)	2.7x10 ⁶	3.82×10 ⁶	2.18×10 ⁶	4.70×10 ⁵	5.24×10 ⁵	1.00×10 ⁵	Yes
					5.5x10 ⁶	9.49 ×10 ⁵	2.76×10 ⁶	3.65×10 ⁵	3.65×10 ⁵	0.0	Yes		
2	2015-2016	29.8	2.9 x10 ³	2	2	0	0						
	2016-2017	31.9	7.5 x10 ²	2	2	1 (+21)	8.8x10 ³	2.52 ×10 ³	2.10 ×10 ³	0.0	0.0	0.0	No
	2017-2018	34.2	1.7 x10 ²	2	2	0	0						
	2018-2019	34.7	1.2 x10 ²	2	2	0	0						
3	2015-2016	30.5	2.0 x10 ³	2	2	1 (+14)	8.5 x10 ⁴	1.00 ×10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No
							7.1 x10 ⁵	4.51 ×10 ³	9.86 ×10 ³	1.89 ×10 ³	0.0	0.0	No
						2 (+21)	1.2 x10 ⁴	5.19 ×10 ³	1.42 ×10 ⁴	1.85 ×10 ⁴	0.0	0.0	No
	2016-2017	35.5	9.4 x10 ¹	2	2	0	0						
	2017-2018	32.9	3.9 x10 ²	2	2	0	0						
	2018-2019	29.4	3.9 x10 ³	2	2	1 (+14)	7.1 x10 ⁷	4.45 ×10 ⁶	1.11 ×10 ⁶	4.63 ×10 ⁵	4.46 ×10 ⁵	1.00 ×10 ⁵	Yes
							1.5 x10 ⁷	3.79 ×10 ⁶	1.25 ×10 ⁶	1.99 ×10 ⁶	3.30 ×10 ⁶	1.32 ×10 ⁶	Yes
						2 (+21)	5.4 x10 ⁷	9.03 ×10 ⁶	1.95 ×10 ⁷	1.19 ×10 ⁷	6.92 ×10 ⁶	6.03 ×10 ⁶	Yes

Table B. Cont.

Flock	Lambing period	Ct real-time PCR (mean)	Balb/c mice inoculation					Culture in cell lines (Vero E6) (GE/ml)						
			No. of GE ^a injected	No. of mice inoculated at day +14 p.i.	No. of mice inoculated at day +21p.i.	No. of positive mice (day p.i.)	No. of GE in spleen	Inoculated	Day 6 p.i.	1 st passage	2 nd passage	3 th passage	Viable <i>C. burnetii</i>	
4	2015-2016	31.9	7.4 x10 ²	2	2	0	0							
	2016-2017	30.8	1.6 x10 ³	2	2	0	0							
	2017-2018	33.2	3.2 x10 ²	2	2	0	0							
Positive Control (goats)	2017	20.9	10.7x10 ⁵	2	2	2 (+14)	3.0 x10 ⁷	1.82 x10 ⁴	4.88 x10 ⁴	5.33 x10 ⁴	8.53 x10 ⁴	0.0	Yes	
							9.1 x10 ⁶	2.88 x10 ⁶	6.90 x10 ⁵	8.37 x10 ⁵	2.76 x10 ⁵	6.91 x10 ⁵	Yes	
						2 (+21)	4.8 x10 ⁶	2.30 x10 ⁴	2.05 x10 ⁴	2.86 x10 ⁴	0.0	0.0	No	
							5.0 x10 ⁴	3.00 x10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No	

^aGE, genome equivalents of *C. burnetii* determined by quantitative real-time PCR targeting *IS1111*; ^bp.i., post-inoculation; NA, not applicable; ND, not done

This study also highlighted the risk of introducing naïve animals into an infected flock, which as shown in Flock 2, can cause a re-activation of the infection. Purchasing infected animals also poses a risk when introduced into a negative flock (Anderson et al., 2015; Pandit et al., 2016). This was probably the situation in Flock 3, where purchased pregnant ewes could have been the source of a new infection. After lambing, one week after purchase, presence of shedders was detected and moderate seroprevalence was recorded, suggesting that those animals could have been infected previously and be the source of the infection reactivation observed in yearlings during the third and fourth lambing seasons.

The four flocks were managed under a semi-extensive system where animals are housed during lambing and milking, and afterwards graze on communal mountain pastures in contact with livestock and wildlife. In a region like the Basque Country, where Q fever is endemic and vaccination is not frequently implemented, this system poses a risk for infection and re-infection (Barlozzari et al., 2020; Muema et al., 2017; Rizzo et al., 2016). Nevertheless, the infection peak observed in yearlings in Flock 1 during the second and fourth lambing seasons is difficult to explain since yearlings did not share grazing pastures with other flocks. Roe deer frequented yearlings grazing fields, however their role as infection source was ruled out after testing *Coxiella*-negative by PCR analysis of their feces (data not shown). Besides, this was the only farm where beef cattle and goats were also present. However, and though they could not be tested, management practises confirmed that beef cattle and goats were hardly in contact with sheep. In any case, inappropriate implementation of biosafety measures is a risk factor for flock infections that cannot be ruled out (EFSA, 2010; Pandit et al., 2016; Plummer et al., 2018).

The interpretation of the humoral immune response against *C. burnetii* is complex and has little value at individual level because a percentage of infected animals (25-50%) do not seroconvert (Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a; Reichel et al., 2012; Rousset et al., 2009a). In this study, a commercial ELISA kit was used to measure *C. burnetii* antibodies in milk samples, since a good correlation between the level of antibodies detected in individual milk with those present in blood serum has been reported (Joulié et al., 2017a; Ruiz-Fons et al., 2011). The marked differences in seroprevalence observed in ewes and yearlings throughout the four lambing seasons among flocks were probably associated to the exposure of animals to different loads of viable bacteria. However, as seen in this study and others (Plummer et al., 2018), seroprevalence is not correlated with bacterial shedding.

The abovementioned factors, like animal purchase or grazing in communal pastures, can favour not only *C. burnetii* infection but also the probability of infection with more than one genotype. Presence of several *Coxiella* genotypes in a farm has been previously described

(Astobiza et al., 2012b; Dal Pozzo et al., 2016; Joulié et al., 2015; Piñero et al., 2015). Here, only one genotype was detected in Flock 1 and Flock 4, whereas in Flock 2 and Flock 3, three and two different genotypes were detected, respectively. Interestingly, flocks with more than one genotype were those that had purchased animals. Regardless of the flock, in all cases the more frequently found genotypes were SNP1/MST13 and SNP8/MST18. Both genotypes had been found in the region in sheep flocks (Álvarez-Alonso et al., 2018a) or in Q fever outbreaks of caprine origin associated with pneumonia in humans (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Hurtado et al., 2017). In Europe, SNP1 and SNP8 genotypes have also been associated to Q fever outbreaks (Dal Pozzo et al., 2016; Huijsmans et al., 2011), and SNP5, only detected here in two environmental samples (1 dust, 1 aerosol) from Flock 2, has been found in goats in Belgium and France (Dal Pozzo et al., 2016; Huijsmans et al., 2011). Regarding any possible association between genotype and infection pattern, it is noteworthy that SNP1/MST13 was the predominant genotype in flocks where infection progressed towards a gradual decrease (Flock 2 and Flock 4), whereas genotype SNP8/MST18 predominated in the two flocks where infection reactivated in yearlings (Flock 1 and Flock 3). However, the effect of purchase of animals on that reactivation hampers any further conclusions. Similarly, since abortion rates were very low, no associations can be inferred between pathogenicity and genotype.

Inhalation of aerosols contaminated with *C. burnetii* is the main infection route in humans (Eldin et al., 2017). Wind can easily spread *Coxiella* resistance forms when climatic conditions are favourable, and, therefore, environmental contamination of the surroundings of infected farms is a hotspot of concern that has been addressed by many studies (Álvarez-Alonso et al., 2018b; de Bruin et al., 2012; de Bruin et al., 2013; Joulié et al., 2015; Kersh et al., 2013). In this study, *Coxiella* loads were higher in aerosols taken inside farm facilities than in those taken outdoors, and levels progressively decreased during the weeks that followed the lambing seasons. These results are in agreement with those found in similar studies (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Astobiza et al., 2011b; de Bruin et al., 2012; de Bruin et al., 2013; Kersh et al., 2013). Interestingly, detection of *C. burnetii* in indoor aerosols was dependent on the proportion of animal shedders through vaginal fluids, as reported elsewhere (Astobiza et al., 2011b). *C. burnetii* excretion by vaginal fluids is normally higher compared to feces or milk (Joulié et al., 2015), especially when infection is recent in the flock. This study also pointed out that a high seroprevalence in the flock could be an indication of a recent infection by Q fever with a higher risk of detecting contaminated aerosols by *C. burnetii* outside farm facilities.

Coxiella accumulates in the dust of infected farms and its DNA remains in dust for long periods (Astobiza et al., 2011a; Kersh et al., 2013). Here, levels of *C. burnetii* in dust seemed to

depend mainly on the intensity of fecal shedders, and to a lesser extent of shedders by vaginal exudates. Nevertheless, the bacterial loads detected in dust samples were low in all four sheep flocks (Ct mean = 27-33) compared to the loads found in other goat and sheep flocks (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Carrié et al., 2019; Kersh et al., 2013), but similar to the Ct values obtained in some farms from the Netherlands during the large Q fever outbreak (de Bruin et al., 2012; de Bruin et al., 2013). The fact that in the study herein farmers rapidly discharged the placentas contributed to reduce environmental contamination at the farm premises. Even though the inoculation procedure in mice was carried out at the same time and using the same conditions for all samples, inoculation of dust homogenates collected during the first lambing season of yearlings in flocks 2 and 4 did not produce positive results. Inoculated GE loads (2.9×10^3 in flock 2 and 7.43×10^2 in flock 4) were similar to those used with samples collected from the other two flocks that multiplied in mice tissues. Interestingly, the genotype identified in these samples was SNPI which might suggest that multiplication of low concentrations of this particular genotype is not enough to grow in mice tissues.

Despite these low contamination loads in dust, isolation of *C. burnetii* was obtained from dust collected in the second and fourth lambing seasons in Flock 1, and the fourth lambing season in Flock 3. These results suggest that *C. burnetii* environmental contamination in the premises and surrounding areas of farms where the infection has been present for several years and the number of shedders is low, is markedly lower than at farms suffering a Q fever outbreak (Álvarez-Alonso et al., 2018b). However, despite the low loads of *C. burnetii* in dust, infection risk was still present since viable *C. burnetii* were detected during the fourth lambing season in two of the studied sheep flocks.

In conclusion, this study provided valuable epidemiological data on *C. burnetii* infection in sheep and opened new questions that require further investigation. The results obtained demonstrated that if *C. burnetii* infection is not controlled using a combination of vaccination and implementation of adequate biosafety and managing procedures, an active infection and continuous shedding of viable bacteria can persist in sheep flocks for over 5 years.

ARTÍCULO / ESTUDIO 3

A Q fever outbreak with a high rate of abortions in a dairy goat farm: *Coxiella burnetii* shedding, environmental contamination and viability

Álvarez-Alonso, R., Basterretxea, M., Barandika, J.F., Hurtado, A., Idiazabal, J., Jado, I., Beraza, X., Montes, M., Liendo, P., García-Pérez, A.L.

Appl. Environ. Microbiol., 84(20): e01650-18.2018.

ABSTRACT

This study describes a Q fever outbreak in a herd of 77 Alpine goats which suffered a high rate of abortions (81%, 58/72) in January 2017, and presents the results of monitoring contamination and viability of *Coxiella burnetii* in the farm environment several months after the outbreak. Bacterial shedding was studied in 35 aborted dams during seven months to monitor *C. burnetii* infection dynamics and duration of excretion. The highest bacterial shedding load was observed in vaginal mucus, followed by feces and milk. Conversely, duration of *C. burnetii* shedding was longer through feces (five months after abortion) than milk (three months). *C. burnetii* DNA was detected throughout the study in aerosol samples periodically collected indoors and outdoors the animal premises. Mice inoculation and culture in Vero cells demonstrated presence of viable isolates in dust collected from different surfaces inside animal facilities at the highest peak of abortions, but not in dust collected two, three and four months after the last parturition. Some workers and visitors were affected by Q fever, with an attack rate of 78% (7/9) and 31% (4/13), respectively. Affected people mostly showed fever and seroconversion along with myalgia and arthralgia in two patients and pneumonia in the index case. The genotype identified in animal and environmental samples (SNPI/MST13) turned out to be very aggressive in goats but caused only moderate symptoms in people. After diagnosis of abortion by Q fever in goats, several control measures were implemented in the farm to prevent contamination inside and outside animal facilities.

Keywords: *Coxiella burnetii*, goats, SNP, MST, viability, dust

IMPORTANCE

This work describes for the first time a 7-month follow-up of the excretion by different routes of *C. burnetii* genotype SNPI / MST13 in a herd of goats that suffered high rate of abortions (81%), generating high environmental contamination. Some of the workers and visitors who accessed the farm were infected, with fever as the main symptom but low incidence of pneumonia. The detected strain (SNPI / MST13 genotype) turned out to be very aggressive in goats. Viability of *C. burnetii* was demonstrated in the environment of the farm at the time of abortions, but two months after the last parturition no viable bacteria were detected. These results highlighted the importance of implementing good biosafety measures in farms and avoiding the entrance of visitors to farms several months after the end of the kidding period.

INTRODUCTION

Coxiella burnetii is an intracellular bacterium of the gamma-Proteobacteria that causes Q fever, a widespread zoonosis. Domestic ruminants are considered the most important source of infection for humans (EFSA, 2010; Georgiev et al., 2013; Porter et al., 2011). Although 60% of human infections are asymptomatic, *C. burnetii* can cause a simple febrile syndrome, or a febrile syndrome accompanied by pneumonia and/or hepatic involvement after an incubation period of 2-3 weeks (Eldin et al., 2017). Q fever is endemic in the Basque Country (northern Spain), and notification of cases to the System of Microbiological Information (Sistema de Información Microbiológica, SIM) for an epidemiological assessment is compulsory. In endemic areas, occasional outbreaks of Q fever occur in people, and the attack rate depends on the exposure of non-immune population to the infection source. Most human Q fever outbreaks have been related to goats and sheep (EFSA, 2010; Tissot-Dupont et al., 2004; van den Brom et al., 2015a), and direct or indirect contact with infected herds through the inhalation of contaminated aerosols is the most common source of infection (Eldin et al., 2017). In fact, some authors stated that a single *C. burnetii* is enough to infect and produce clinical disease (Madariaga et al., 2003; Tigertt et al., 1961). When *C. burnetii* infection appears in a herd, control measures must be quickly implemented and biosafety is essential to prevent the propagation of infection outside animal facilities. These measures include the collection and destruction of placentas and fetuses, correct management of manure, application of general hygiene procedures including periodic disinfections, and vaccination, among others (EFSA, 2010; van den Brom et al., 2015a).

Q fever in small ruminants has been mostly associated with late abortions, stillbirths and delivery of weak offspring (Agerholm, 2013). Q fever abortions in caprine herds are more important than in sheep flocks, affecting sometimes up to 90% of females (Palmer et al., 1983). After abortion or normal birth, infected animals shed the bacteria through the placenta and fetal fluids, which contain millions of bacteria (Arricau-Bouvery et al., 2003), and represent a high-risk infectious material. In addition, infected animals shed the bacteria through vaginal fluids, feces, milk, and urine. Some studies described that the most important route for *C. burnetii* shedding in goats was the milk (Rodolakis et al., 2007), whereas in an experimental infection *C. burnetii* was excreted through feces and vaginal mucus up to 95 days postpartum, with a shorter period of excretion through milk (Roest et al., 2012). Bacterial shedding by different routes together with the movement of the animals inside the stable, generate the formation of *C. burnetii* contaminated aerosols which pose a risk for people that have access to an infected farm at kidding period (de Bruin et al., 2012; Kersh et al., 2013; Whelan et al., 2012). In addition, *C. burnetii* can be displaced several kilometers by the wind affecting people living

far from the infected farms (Tissot-Dupont et al., 2004), thus hampering the epidemiological investigation of the source of infection.

Although *Coxiella* can survive in the environment during long periods of time (Gurtler et al., 2014; Reimer, 1993), scarce data are available about viability of *C. burnetii* in the farm environment after an outbreak of Q fever in ruminants (Kersh et al., 2013). Knowledge on the duration of *C. burnetii* viability in animal premises is essential to elaborate recommendations for farmers concerning minimum periods of time before handling the manure, receiving visitors at the farm, etc. This paper describes a 7-month follow-up of the excretion of *C. burnetii* by different routes in a herd of goats that suffered high rate of abortions, generating high environmental contamination and affecting workers and visitors of the farm. Results of the epidemiological investigation of the outbreak in the herd and the environment are presented, along with the identification of the genotype of *C. burnetii* involved, and its viability in dust collected in the farm. Also a description of the Q fever cases in workers and visitors of the farm is provided. Control measures taken after the outbreak are detailed and discussed.

MATERIAL AND METHODS

Case presentation

On January 27, 2017, the *General Practitioner from a municipality* in Gipuzkoa (Basque Country, northern Spain), notified a case of Q fever to the Epidemiology Surveillance Unit. A 57-year-old male presented with an acute respiratory infection with onset of symptoms in the middle of December 2016. The radiological study confirmed pneumonia, and the patient was treated with amoxicillin/clavulanic acid. *C. burnetii* infection was confirmed by Phase II *IgM and IgG detection*. The patient worked and lived in a dairy goat farm. He mentioned that in the previous weeks there had been 20 abortions in the herd and that the veterinarian attending the farm had collected and sent to the laboratory different samples for diagnosis. The patient reported that, besides him, another 10 people were living in the farm, including 8 adults and two children aged 1 and 5 years. He also mentioned that in January 16, a group of 13 visitors (12 students and one teacher) from an Agricultural School visited the farm, spending 2-3 hours inside and outside the animal facilities. In addition, in the surroundings of the farm there were cottages, occupied during the weekends and holiday periods by two different families. The same day the case was notified, the Occupational Health Authority (OSALAN) was informed. A multidisciplinary group that included microbiologists, veterinarians, occupational health

technicians and epidemiologists was gathered to investigate the case and design an epidemiological investigation.

Epidemiological study in the dairy goat farm

The worker affected by Q fever (index case) worked at a dairy goat herd composed of 77 Alpine breed goats. The herd had no contact with other flocks and the owner did not buy animals from other flocks (produced its own replacements). The females were usually mated in autumn, in September and November, and the kidding season extended from February to April. After kidding, the dams had a long lactation period before being retained for subsequent parturition. The animals were fed on grazing supplemented with hay and concentrate. Different types of dairy products, including yoghurts and fresh and cured cheese made with raw milk were produced in the farm.

Sampling and laboratory analyses for abortifacient agents

On January 24 (three days before the case notification), the farm veterinarian had sent to the Department of Animal Health of NEIKER 1 placenta, 6 vaginal swabs and 12 sera after observing an outbreak of abortions at the end of the gestational period (21 abortions since January 15). Bacteriological analyses consisting on Stamp staining (placenta) and bacteriological cultures (vaginal fluids and placenta) in general media (blood agar, MacConkey agar and Farrell selective agar), were done to rule out causes of bacterial abortion. Histopathological study of placenta was also performed to evaluate lesions associated to infectious abortifacients. If the histopathological study revealed lesions compatible with Q fever, the placenta samples were also analyzed by real-time PCR for the detection of *Coxiella* DNA (Schets et al., 2013). Sera samples were analyzed using ELISA for the detection of antibodies against *C. burnetii* (LSIVET Ruminant Milk/Serum Q Fever kit; Thermo Fisher Scientific), Pestivirus (Border disease) (IDEXX Laboratories, Maine, USA), and *Chlamydophila abortus* (Complement Fixation test).

Follow-up of *C. burnetii* infection in goats and the farm environment

After diagnosis of Q fever abortion by bacteriological, molecular and histopathological methods, control measures were recommended to the farmer by the farm veterinarian and the Animal Health Authorities. To estimate the infection prevalence within the herd and the duration of *C. burnetii* shedding in infected goats, the farm was visited monthly from February

to August. Samples collected included vaginal fluids (3 first visits), milk and feces taken from 35 goats with recent abortions, along with a bulk-tank milk sample (BTM) per visit. Environmental samples consisted of aerosols monthly taken inside and outside the animal premises with an air sampler (MD8 Airscan air Sampler, Sartorius), and dust samples taken in duplicates from 10 different surfaces inside the animal premises in the first visit (February 2) and two, three and four months after the last parturition (April 21st). Animal and environmental samples were processed for DNA extraction as previously described (Astobiza et al., 2011b) and analyzed by real-time PCR targeting the gene (Schets et al., 2013). A commercial internal amplification control (IAC) (TaqMan[®] Exogenous Internal Positive Control, ThermoFisher Scientific) was included in the assay to monitor for PCR inhibitors.

In order to evaluate seroprevalence against *C. burnetii*, individual milk samples were centrifuged and milk sera were tested for Q fever antibodies using ELISA test (LSIVET Ruminant Milk/Serum Q Fever kit; Thermo Fisher Scientific), following the protocol recommended by manufacturers for milk samples. A cocktail of antigen phases I and II was used in this assay to detect total anti-*C. burnetii* immunoglobulin G antibodies (IgG). An index (S/P) of the tested milk serum optical density to optical density of the positive control ratio was calculated according to the manufacturer's instructions. Milk samples with S/P indices ≤ 0.4 were considered negative, while samples with S/P > 0.4 were considered positive.

Genotyping

A selection of animal and environmental samples with a positive real-time PCR result and a low cycle threshold (Ct) value were genotyped by Multispacer Sequence Typing (MST) (Glazunova et al., 2005) with some modifications described elsewhere (Hurtado et al., 2017), and by Single-Nucleotide-Polymorphism (SNP) discrimination using real-time PCR (Huijsmans et al., 2011).

Studies of *C. burnetii* viability

These studies were carried out in BSL3 building facilities, and consisted on experimental inoculations of mice and culture in Vero cells. Once permissions were obtained from the Ethical & Animal Welfare Committee (Bizkaiko Foru Aldundia, document 3/2017, Reg. 15.328, 22/02/2017), twenty 6 week-old Balb/c male mice were included in the experiment to test 4 samples along with a negative control, with 4 replicates. Samples consisted of four homogenates

of pooled dust, collected in the abovementioned periods, and prepared following procedures already published (Kersh et al., 2010b) of *C. burnetii* genome equivalents (GE) in each homogenate was carried out by quantitative real-time PCR (qPCR) using 5 µl of DNA (in triplicates) and specific primers and a probe targeting the *ISIII* gene (Schets et al., 2013). In each qPCR run, a standard curve was generated using 10-fold serial dilutions of a known concentration of Nine Mile (RSA439) phase II strain of *C. burnetii* DNA. Four aliquots of 400 µl were prepared from each homogenate of pooled dust, containing 87.5-100.0 x 10³ *C. burnetii* GE. These 4 aliquots were inoculated intraperitoneally in 4 mice each; negative control mice (n=4) were inoculated intraperitoneally with 400 µl PBS. Mice were euthanized on days 7 post-inoculation (p.i.) (2 mice) and 21 p.i. (2 mice), and the spleens were removed. The level of splenomegaly was determined from the ratio of the spleen weight to the body weight. Spleens were stored at -80°C for further analyses.

Half of the spleen from each mouse was processed for DNA extraction and real-time PCR amplification. Briefly, spleen was mixed with Tris EDTA (TE) buffer (10 mM Tris Base, 1 mM EDTA, pH 8) and homogenized with TissueLyser (Qiagen Hilden, Germany). Two-hundred µl of the mixture were treated with 180 µl of ATL, and digested with 20 µl of proteinase K (8 mg/ml) for 3h at 55°C before DNA extraction with QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Presence of *C. burnetii* was assessed by real-time PCR targeting the *ISIII* gene (Schets et al., 2013), and positive samples were subjected to qPCR (Schets et al., 2013), as mentioned above, to quantify the number of *C. burnetii* GE detected in spleen and compare it with the number of GE inoculated.

African green monkey epithelial cells VERO C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6 ATCC[®] CRL-1586[™]] were grown in T75 culture flasks containing DMEM medium (Lonza Biologics Porriño S.L., Pontevedra, Spain) supplemented with 1% L-glutamine (Lonza Biologics Porriño S.L., Pontevedra, Spain), 0.4% non-essential amino acids (SIGMA Aldrich Quimica, S.L., Madrid, Spain) and 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (SIGMA Aldrich Quimica, S.L., Madrid, Spain) at 37°C in 5% CO₂. The second half of the qPCR-positive spleen was homogenized with 700 µl DMEM medium and 2% FBS in a TissueLyser. A hundred microlitres of each homogenate were placed on shell vials containing Vero cells, and centrifuged at 600 x g for 1 hour at 20°C. Then, 700 µl of fresh DMEM medium with 2% FBS were added to the shell vial, and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 6 days. After harvesting *C. burnetii* from shell vial on day 6 p.i., three passages of 1000 µl of harvested cells were transferred at weekly intervals into T25 culture flasks containing a Vero layer. At day 6 p.i. and before each passage, 200 µl were collected for DNA extraction and qPCR, following procedures described above. Cultures with

unchanged or increased GE during the procedure were considered to be positive. Uninfected control cells were kept close to infected cells to rule out possible cross-contaminations.

Epidemiological investigation of the human outbreak

An epidemiological investigation including the people working at the farm, the visitors and other population at risk was carried out. The *Primary Health Care Centre of the municipality was contacted and requested to collect information regarding additional patients with clinical symptoms compatible with C. burnetii infection.*

Two levels of risk were considered with different degree of exposure to infection. *Level 1* included people that had had a high risk of exposure in the farm from early December 2016: workers living in the farm (9 adults) and visitors (the group of students and teacher). An epidemiological questionnaire and a serological study were conducted in this group. *Level 2* included people who stayed on weekends or vacations at the two cottages in the surrounding area. The group of holidaymakers was contacted by telephone to be informed of the situation and to identify individuals who could belong to *level 1* (people who had had access to the stable) and/or could suffer other risk factors (immunosuppression, pregnancy, valvulopathy, etc.). The 1 and 5 year-old children whose parents worked in the farm but showed no symptoms during the study period, were also included in *level 2*.

Laboratorial investigation

Blood samples were obtained from *level 1* group for serological determination of *C. burnetii* phase II IgM and IgG antibodies. To evaluate seroconversion a second blood sample was obtained 3-4 weeks later. Blood samples from farm workers were analyzed by indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) in the Microbiology Laboratory of the *Hospital Universitario de Donostia-San Sebastian*, considering positive titles of phase II IgM $\geq 1/256$ and those of phase II IgG $\geq 1/128$ (*C. burnetii* IFA IgG and IFA IgM, Vircell SL[®], España). PCR for detection of *C. burnetii* DNA was also performed in the first blood extraction sample (Klee et al., 2006; Schneeberger et al., 2014). Blood samples from the visiting students group were analyzed in the Microbiology Laboratory of the *Hospital Universitario de Basurto* (Bilbao) and serological methods used included indirect chemiluminescent immunoassay (*C. burnetii* Virclia[®] IgM Monotest, Vircell SL[®], Spain) for detection of phase II IgM antibodies (expressed as positive,

negative or doubtful) and IFAT for phase II IgG considering as positive titers $\geq 1/128$ (*C. burnetii* IFA IgG Vircell SL®, Spain).

A confirmed human case was defined as a person who belonged to a group of risk level 1, had access to the farm after early December 2016 and had a positive result in laboratorial analyses (PCR positive, or positive results in the first determination of Phase II IgG or IgM, or seroconversion, always with Phase II IgM positive), with or without compatible clinical symptoms.

RESULTS

Confirmation of Q fever abortion in the goat herd and implementation of control measures

The goat herd suffered an outbreak of abortions at the end of gestation that at the end of the season had affected 81% of pregnant females (58 of 72), the highest peak occurring between January 18 and January 31 (39 abortions). Q fever was diagnosed based on the observation of *C. burnetii*-compatible bacteria in placenta and vaginal fluids (Stamp staining), and the detection of *C. burnetii* DNA in these samples. Additionally, the histological study of the placenta showed foci of necrosis in the cotyledon villi, accompanied by an inflammatory infiltrate and presence of large numbers of bacteria in the cytoplasm of the trophoblasts. Also, presence of an inflammatory infiltrate composed mainly of lymphocytes and neutrophils was found in the wall of arterioles. The presence of other bacteria causing abortions was ruled out. Eleven of the 12 sera from goats with recent abortions analyzed by ELISA had antibodies against *C. burnetii*.

As soon as *C. burnetii* was diagnosed as the cause of the abortions (26th January), control measures were immediately implemented and access of visitors was forbidden. Personal hygiene measures were imposed including the use of exclusive clothing and footwear when work was done inside animal premises. Control measures included antibiotic treatment (double treatment with oxytetracycline) of pregnant animals, and confinement of the herd inside the premises to prevent placentas and fluids being expelled outside the farm. The placentas were collected with gloves and placed in watertight containers, adding lime on the surface for the inactivation of *C. burnetii*. The manure was not removed from the animal facilities until four months after the last parturition, and afterwards, cleaning and disinfection of the premises with Virkon® was carried out. Three month-old replacements were vaccinated and revaccinated (18 kids) with inactivated phase I vaccine (Coxevac, Ceva Santé Animale). Finally, milk for cheese production was pasteurized.

C. burnetii shedding and serological response in goats

C. burnetii shedding was studied along seven months (February-August 2017) in 35 of 58 goats with recent abortion. The bacterial load detected was higher in vaginal fluids and feces than in milk (as inferred by Ct values). In May, four months after the abortion peak, bacterial excretion was still significant in feces, whereas in milk it was low (Figure 10). The evolution of *C. burnetii* DNA shedding in BTM samples followed the same decreasing trend and became negative in August (Ct >40) at the end of the study (data not shown).

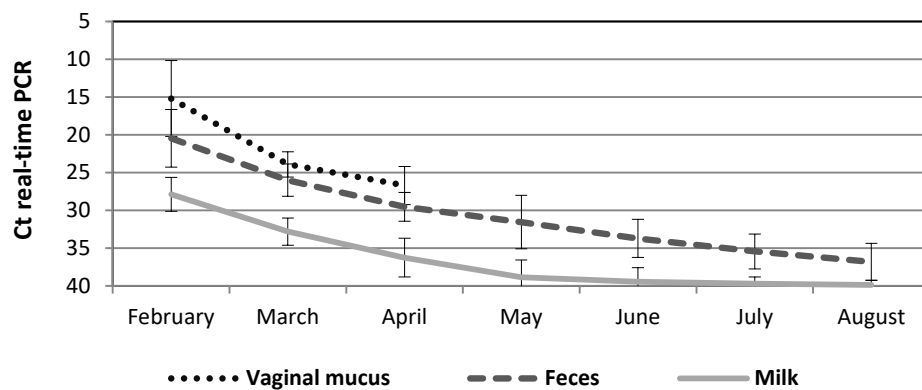


Figure 10. Dynamics and duration of *C. burnetii* shedding (mean Ct ± SD) through different excretion routes in 35 goats with recent abortions.

The seroprevalence estimated in individual milk samples by ELISA was high, and most of the examined goats seroconverted. Antibodies persisted at least for seven months after abortion (Figure II).

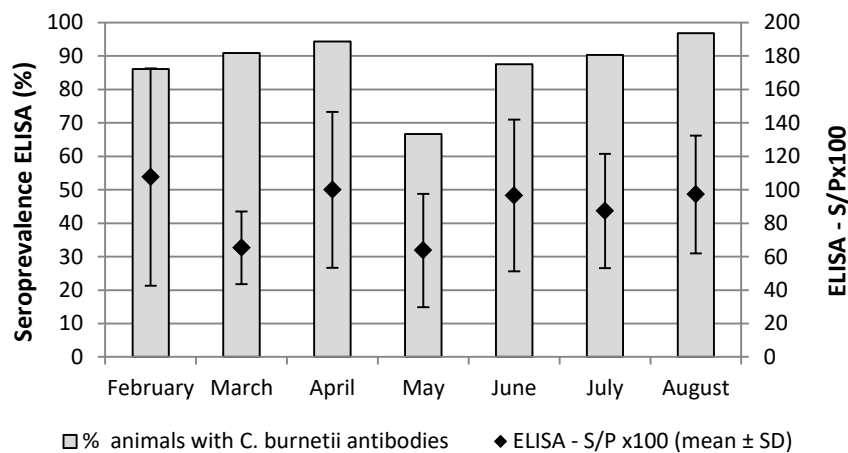


Figure II. Evolution of seroprevalence against *C. burnetii* in the 35 goats with recent abortions studied.

C. burnetii in environmental samples

The bacterial load (expressed in Ct values) found in aerosols was high at the peak of abortions, as shown in Figure 12. *C. burnetii* was detected in aerosols taken outside animal facilities during all the samplings, but always with lower bacterial loads than those detected inside the farm. *Coxiella* DNA was also detected in all dust samples collected in the 4 samplings from different surfaces of the animal facilities. Ct values obtained by real-time PCR amplification of the ISIII gene were always low indicating a high bacterial burden. The highest load (Ct 18.9) corresponded to the sample collected immediately after the highest peak of abortions in February, whereas the bacterial burden in dust samples taken in later samplings was lower (Ct 22.1-24.2).

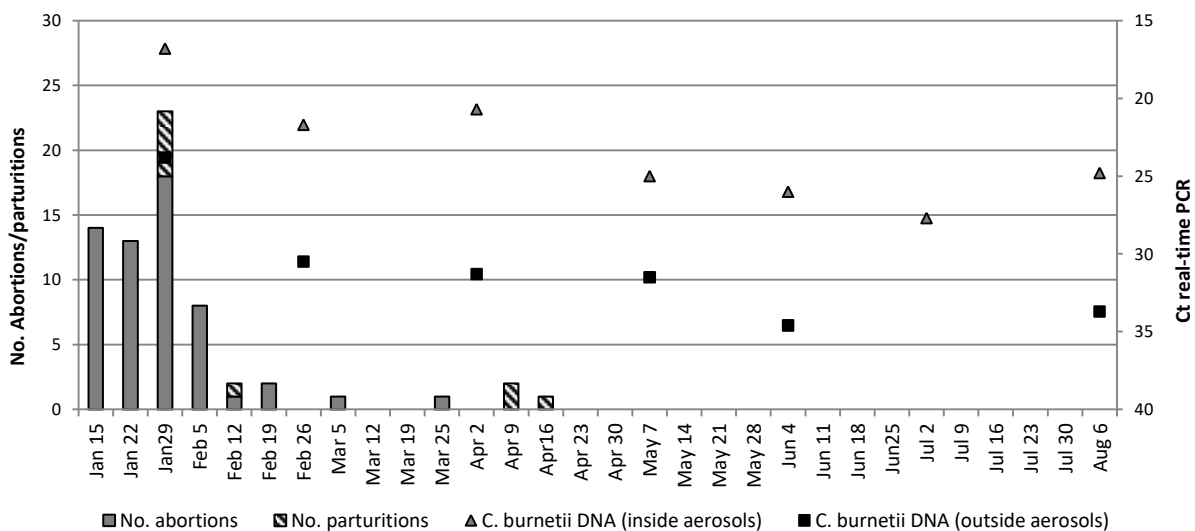


Figure 12. Dynamics of *C. burnetii* DNA in aerosols taken inside and outside animal premises, and relationship with abortions and normal parturitions. Dark bars represent weekly accumulated number of abortions and dashed bars, weekly accumulated number of parturitions. *C. burnetii* load, as determined by real-time PCR (Ct values) analysis of aerosol samples is represented by triangles (inside animal premises) and squares (outside animal premises). No aerosol samples were collected outside the premises in July, due to the rain.

SNP and MST genotyping

Genotyping analyses of 4 samples of vaginal fluids from goats with recent abortions and 2 dust samples identified type SNP-1 / MST-B.

Viability of *C. burnetii* in dust

Spleens of the four mice inoculated with the dust homogenate collected in February were positive to the real-time PCR showing lower Ct values in the two mice euthanized 21 days p.i. (30.6 and 32.6) than those euthanized 7 days p.i. (35.3 and 35.9). The number of *C. burnetii* GE recovered in the spleen of one mice euthanized 21 days p.i. was slightly higher than the GE injected (Table 14), suggesting that *C. burnetii* was viable and bacteria multiplied *in vivo*. In the homogenates of dust collected two, three and four months after the last parturition, *C. burnetii* was not detected in the spleen of mice even when targeting the multiple-copy ISIII gene. No relevant splenomegaly was detected in mice (Table 14). Culture in Vero cells of homogenates of spleens from mice inoculated with dust collected at the highest peak of abortions (*C. burnetii* real-time PCR-positive spleens) was positive for the two mice euthanized 21 days p.i.; no bacterial growth was obtained in those sacrificed on day +7 p.i. The bacterial loads (GE) recovered at each passage are shown in Table 14.

Q fever in farm workers and visitors

After the initial case of pneumonia by Q fever in one of the workers, an epidemiological survey was conducted on the group of farm workers, *i.e.*, 5 men and 3 women, aged between 22 and 57 years old. All of them participated in different tasks in the farm, and although two of them were mostly in charge of the goats, the other 6 workers could not rule out sporadic visits to the stable after early December 2016. Five of the 8 workers had a self-limited febrile illness with onset of symptoms between mid-December and mid-January, and two of them presented also with myalgia and arthralgia for 2-3 days. At the time of the survey (end of January), they were all asymptomatic. Taking into account the first case, the patient with pneumonia, a total of 6 workers had compatible symptoms with Q fever. Serological results showed an indicative response of acute infection in 7 workers, all met the definition of "case", 3 of them without clinical symptoms (Table 15). Despite having compatible clinical symptoms, one worker was considered no-case since he tested negative to Phase II IgM. PCR was negative in all cases. The attack rate in this group was 78% (7/9).

An epidemiological survey was also conducted in mid-February on 12 students and one teacher, aged 18 - 35 years, from the Agricultural school that visited the farm on January 16. Five students had fever, with onset of symptoms between the end of January and the beginning of February. All were asymptomatic at the time of the survey (February 14). The serological study

Table 14. Results of the viability study of *C. burnetii* in dust using Balb/c and cultivation in Vero cells lines.

Collection date (months after the last parturition)	Balb/c mice inoculation			Spleen weight/ body weight	Culture in cell lines (Vero E6)					Viable <i>C. burnetii</i>
	No. of GE ^a injected	Days p.i. ^b	No. of GE ^a in spleen		GE/ml inoculated	GE/ml at day 6 pi	GE/ml at 1 st passage	GE/ml at 2 nd passage	GE/ml at 3 th passage	
February (0)	87.5x10 ³	+7	66.7x10 ³	0.0032	8.8x10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0	No
		+7	93.2x10 ³	0.0040	0.0	0.0	-	-	-	No
		+21	80.9x10 ³	0.0040	4.9x10 ³	5.0x10 ³	4.5x10 ⁴	2.7x10 ⁵	2.9x10 ⁵	Yes
		+21	79.3x10 ⁴	0.0054	3.6x10 ⁴	1.2 x10 ⁵	2.3x10 ⁵	1.7x10 ⁵	4.7x10 ⁵	Yes
June (2)	100x10 ³	+7	0.0	0.0037	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+7	0.0	0.0039	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+21	0.0	0.0045	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+21	0.0	0.0043	ND	NA	NA	NA	NA	No
July (3)	100x10 ³	+7	0.0	0.0046	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+7	0.0	0.0041	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+21	0.0	0.0049	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+21	0.0	0.0041	ND	NA	NA	NA	NA	No
August (4)	100x10 ³	+7	0.0	0.0041	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+7	0.0	0.0042	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+21	0.0	0.0044	ND	NA	NA	NA	NA	No
		+21	0.0	0.0046	ND	NA	NA	NA	NA	No
Negative control (PBS)	NA	+7	0.0	0.0038	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	No
		+7	0.0	0.0033	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	No
		+21	0.0	0.0037	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	No
		+21	0.0	0.0033	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	No

^aGE, genome equivalents of *C. burnetii* determined by quantitative real-time PCR targeting IS1111; ^bp.i, post-inoculation; NA, not applicable; ND, not done.

showed an indicative response of acute infection in 4 of them, but 2 of them did not have any symptoms. In this group the attack rate was 31% (4/13) (Table 15). PCR was negative in all cases.

The group of people included in *level 2* consisted on 34 members of 2 families (24 male and 10 female, aged between 5 and 73 years), with residence outside the municipality where the farm was located, but who spent weekends and/or vacations in houses nearby the farm. A telephone survey done in mid-February confirmed that they had not had direct contact with the goats. No risk factors (immunosuppression, pregnancy, valvulopathy, vascular prosthesis) were identified in this group, but they were advised to visit the doctor in case of suffering fever, flu or any symptoms compatible with Q fever. They were also asked to report any news concerning any worsening condition on their health status. At the time of writing this manuscript, none was reported.

DISCUSSION

In Europe, most Q fever outbreaks in humans originate from small ruminants after the inhalation of aerosols contaminated with *C. burnetii* (EFSA, 2010; Eldin et al., 2017). Herein we present an outbreak of Q fever associated to a goat herd which suffered 78% of abortion in a short period of time, generating an aerosol-borne spread of *C. burnetii* that contributed to the infection of the farm workers and visitors who entered the animal premises during the kidding period. The follow up of 35 goats with recent abortions provided useful epidemiological information on the dynamics of *C. burnetii* excretion through different routes, and the duration of bacterial shedding. Until recently, milk was considered, in terms of duration, the main excretion route of *Coxiella* in goats (Rodolakis et al., 2007). This study has demonstrated that the bacterial load shed through milk is lower than the quantity shed through vaginal mucus or feces, and the shedding period is shorter in milk. Thus, three months after abortion, *C. burnetii* was not present in milk, whereas *C. burnetii* shedding in feces, albeit at low levels (Ct<35), was still detected five months after abortion. Similarly, an experimental infection in goats with the strain causing a large outbreak in The Netherlands (Roest et al., 2012) also identified fecal and vaginal as the major shedding routes. Taking into account similar studies carried out in sheep flocks (Astobiza et al., 2010; Joulié et al., 2015), it seems that *C. burnetii* excretion patterns and duration of shedding are very similar in goats and sheep.

Table 15. Epidemiological and serological data compiled in level I risk group.

Gender	Age	Access to the stable	Symptoms	Serology 1 st blood extraction		Serology 2 nd blood extraction		Case	Attack rate
				IgM ^b	IgG	IgM ^b	IgG		
Farm workers									
Man ^a	57	No	Yes	1/128	1/128	1/256	1/1024	Yes	
Man	57	No	Yes	Neg	Neg	Neg	Neg	No	
Man	59	No	No	1/1024	1/512	ND	ND	Yes	
Man	34	Yes	Yes	Neg	1/512	Neg	1/1024	No	
Woman	35	No	Yes	1/64	1/64	1/128	1/512	Yes	
Man	38	No	Yes	1/1024	1/2048	ND	ND	Yes	78%
Woman	29	No	Yes	1/128	1/2048	ND	ND	Yes	
Man	22	Yes	No	1/512	1/128	ND	ND	Yes	
Woman	43	Yes	No	Neg	Neg	1/512	1/128	Yes	
Visitors									
Woman	18	Yes	Yes	Neg	Neg	Neg	Neg	No	
Man	21	Yes	No	Neg	Neg	Neg	Neg	No	
Man	18	Yes	No	Neg	Neg	ND	ND	No	
Man	25	Yes	Yes	Neg	Neg	Pos	1/256	Yes	
Man	18	Yes	Yes	Neg	Neg	Neg	Neg	No	
Man	18	Yes	No	Neg	Neg	Neg	Neg	No	
Man	18	Yes	No	Pos	Neg	Pos	1/128	Yes	31%
Man	20	Yes	Yes	Neg	Neg	Pos	1/128	Yes	
Man	18	Yes	No	Neg	Neg	Neg	Neg	No	
Man	19	Yes	No	Pos	Neg	Pos	Neg	No	
Man	19	Yes	No	Neg	Neg	Pos	1/256	Yes	
Man	30	Yes	Yes	Neg	Neg	Neg	Neg	No	
Man	35	Yes	No	Neg	Neg	Neg	Neg	No	

^a Index case; ^b IgM determined by IFAT (farm workers) or indirect chemiluminescent immunoassay (visitors); Neg, negative; Pos, positive; ND, not done.

Bacteria released to the environment, together with the movement of the animals inside the barn, generate high levels of environmental contamination for long periods of time, which, as shown in this study, sometimes is longer than the duration of the kidding period. The presence of *C. burnetii* DNA in aerosols highlighted the risk of inhalation of the bacterium by people who entered the affected farm. Therefore, among other biosafety measures, access for visitors should be prohibited during the parturition period (Schneeberger et al., 2014; Whelan et al., 2012), as *C. burnetii* in the environment, even at low numbers, poses a public health risk (Brooke et al., 2013). As expected, the highest bacterial load in air was detected in the first sampling after the peak of abortions; afterwards, there was a progressive but slow decrease, with Ct levels inside the barn remaining below 30 until the end of the experiment. The biological significance of PCR-positive aerosols is not clear since the detection of *C. burnetii* DNA in environmental samples does not necessarily imply that these bacteria are viable. There are many studies that investigated the presence of *C. burnetii* DNA in the environment (Astobiza et al., 2011b; de Bruin et al., 2013; de Rooij et al., 2016; Kersh et al., 2010b), but only a few studied its viability (Kersh et al., 2010b; Kersh et al., 2013; Kersh et al., 2016). The laboratory methods to investigate *C. burnetii* viability include cell culture, the use of animal models, and *in vitro* methods (ethidium monoazide-PCR [EMA-PCR]) (Mori et al., 2013). The assessment of bacterial viability in environmental samples is not easy, since they are contaminated with a variety of microbes. Mice have the ability of clearing contamination in this type of samples and *C. burnetii* can be recovered from the spleen 21 days after inoculation (Kersh et al., 2010b). In this study, mice were experimentally inoculated with dust samples that had low Cts in real-time PCR, indicating that they contained a high *Coxiella* load (Eldin et al., 2013). The combination of inoculation in Balb/c and cultivation of spleen homogenates in Vero cells showed that *C. burnetii* was viable in the dust collected at the time of abortions (February). *C. burnetii* was not detected from mice inoculated with dust samples collected 2, 3 and 4 months after the last parturition, suggesting that bacteria were no longer viable. The time *C. burnetii* remains viable in dust has not been fully investigated but current results agree with some reports that stated that it could be viable for 2 months (EFSA, 2010). This is valuable information for sheep and goat herds that receive visits (schools, tourists, etc.) as an extra income in-farm activity, and will help to establish the minimum period when affected farms should not receive visitors. However, it would be necessary to investigate if all *Coxiella* genotypes remain viable for the same period of time, a key aspect to establish correct control measures.

Additional biosafety measures are essential to prevent the spread of infection. Management of manure is a crucial aspect in infection spread control because aerosols

containing *C. burnetii* can be generated while removing the bedding. Thus, in the outbreak of The Netherlands removing the manure from the stable within 30 days after the ending of kidding was prohibited (Schneeberger et al., 2014). In the studied farm, manure was kept inside the stable for 4 months after the last parturition to avoid environmental contamination. Fetuses and placentas were immediately removed and treated with lime in a watertight container. Trade or transport of animals was prohibited and pasteurization of milk was imposed by Public Health authorities. These farming practices contributed to reduce risks for the local population, since no new cases were detected in the municipality.

The Q fever outbreak had an attack rate of 78% among farm workers and 31% in the group of students who spent 2-3 hours inside and around the farm. All blood samples collected from human patients were PCR negative, probably because *C. burnetii* DNA becomes undetectable in serum when serological response develops (Schneeberger et al., 2010), and, therefore, it was not possible to isolate *C. burnetii* for genotyping. Fortunately, samples collected from the animals and the farm environment, were positive and some of them could be genotyped. The genotype identified, SNPI/MST13, has been previously found in humans from Spain, Portugal and France (Eldin et al., 2017), and also in sheep and cattle from the region (Astobiza et al., 2012b). The clinical presentation of *C. burnetii* infections depends on both the virulence of the infecting strain and the specific risk factors of the patient (Eldin et al., 2017). Here, despite the high air contamination with *C. burnetii* inside and outside the animal premises at the time of abortions, none of the workers or visitors needed hospitalization. Similarly, the group of people at *level 2* that frequented the area during weekends or vacations did not report any compatible symptoms, in spite of the aerosol contamination detected outdoors. Although this would suggest that SNPI/MST13 genotype causes milder clinical symptoms in humans, risk factors specific to the patient or the region (endemic vs. non-endemic) cannot be disregarded. On the other hand, infection of goats with genotype SNPI/MST13 resulted in a severe outbreak that almost reached 80% of abortions, suggesting that this is a very virulent genotype for goats. The source of infection in the affected herd could not be established, since the herd produced its own replacement and did not share grazing pastures with other domestic ruminants. Likely, infection could have come through the purchase of food/hay or through wildlife. Interestingly, most of the human cases concentrated between mid-December and mid-January, before the abortion storm began in the goat herd. It is known that pregnant infected goats can shed *C. burnetii* through feces weeks before abortion or parturition occurs (Arricau-Bouvery et al., 2003), being this the possible moment and source of infection for the affected people. In this study, most of the aborted goats seroconverted,

indicating that SNPI/MST13 genotype induced a high humoral response with long lasting antibodies, as demonstrated by the observation that 7 months after abortions 97% of the goats still had antibodies. This high seroprevalence, together with the vaccination plan applied to replacement kids, albeit not completely, should reduce significantly the percentage of abortions in subsequent farrowing periods, as suggested by other authors (Berri et al., 2007; de Cremoux et al., 2012a).

In conclusion, once Q fever appears in a herd, control measures should be maintained for a long period of time and the access of visitors avoided at least for two months after the end of parturition. This study is an example of a holistic One Health approach in which medical and veterinary institutions collaborate in the investigation of zoonotic outbreaks in which people and animals are involved, with the aim of protecting the health of the citizens and the consumers.

ARTÍCULO / ESTUDIO 4

Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk

Barandika, J.F., **Álvarez-Alonso, R.**, Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A.L.

Int. J. Food Microbiol., 303:42-45.2019.

ABSTRACT

Q fever is a bacterial zoonosis caused by *Coxiella burnetii* whose main reservoir are small ruminants. Infected animals shed the bacteria into the environment through the products of abortion as well as through feces, urine, and milk. Susceptible people are mainly infected by the inhalation of contaminated aerosols, while food-borne infection is unclear. High prevalence of *C. burnetii* DNA in cheeses from cattle, sheep or goat has been reported, but studies on viability of *C. burnetii* in hard cheeses are scarce. In this study, 67 sheep handicraft hard cheeses of different geographic origins made with unpasteurized milk were analyzed for the presence of *C. burnetii* DNA. To investigate viability of *C. burnetii* in cheese, 5 cheeses were selected among the 20 that tested DNA positive. Presence of viable *C. burnetii* was demonstrated in one cheese by experimental inoculation in BALB/c mice and culture in Vero cells. To further investigate the effect of cheese ripening in *C. burnetii* viability, another 12 cheeses elaborated in the same farm and season, and ripened for between 2.0 and 10.1 months were investigated. Results showed presence of *C. burnetii* DNA in all of them and viable *C. burnetii* in 5, indicating that *C. burnetii* can remain viable after at least 8 months of ripening in hard cheeses made with unpasteurized milk under the acid pH (4.96 - 5.41) and low water activity (0.9065 - 0.9533) conditions observed.

Keywords: *Coxiella burnetii*, Viability, Cheese, Sheep, PCR, Cell culture

INTRODUCTION

Coxiella burnetii is a zoonotic bacterium worldwide distributed that causes Q fever in animals and humans. Susceptible people in contact with infected livestock can become infected by the inhalation of aerosols contaminated with the bacteria. Domestic ruminants are considered the main reservoirs of the infection, and infected animals release large amounts of bacteria into the environment after abortion or normal parturition, especially through placenta and fetal fluids, but also through milk, feces, urine, etc. This means that, after a Q fever outbreak, the lambing period represents the time of greatest risk of infection for humans. Milk is the main route of *Coxiella* shedding in cattle (Rodolakis et al., 2007), and excretion remains active at least throughout two lactation periods (Piñero et al., 2014b). In addition, studies carried out worldwide (Astobiza et al., 2012a; Kim et al., 2005; Muskens et al., 2011) have shown that 51.4%-94.3% of bovine farms have *C. burnetii* milk shedders. In small ruminants, feces are the main route of excretion but *C. burnetii* shedding through milk also occurs and can last up to

several weeks (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Astobiza et al., 2010). However, the risk associated with the ingestion of raw milk products from farms affected by Q fever is unclear (EFSA, 2010; Eldin et al., 2017). Several studies confirmed the viability of *C. burnetii* in raw milk obtained from cattle (Loftis et al., 2010; To et al., 1998a). but pasteurization temperatures have been shown to destroy the bacteria (Maurin and Raoult, 1999). However, unpasteurized milk and milk products elaborated with raw milk are consumed in many parts of the world (Loftis et al., 2010). In Europe, several types of cheese with high quality and gastronomic value are made with unpasteurized raw milk. Several dairy sheep breeds are reared in European Mediterranean countries, and ewes are milked for several months for cheese production. A number of studies have shown a high prevalence of *C. burnetii* DNA in cheeses from sheep (27%-32%) (Capuano et al., 2012; Eldin et al., 2013; Galiero et al., 2016), goats (51%) (Eldin et al., 2013) or cattle (15%-82%) (Capuano et al., 2012; Eldin et al., 2013; Hirai et al., 2012). In general, prevalence of *C. burnetii* DNA in handicraft cheeses is reported to be lower than in non-handicraft cheeses (made with a milk mixture from different farms) (Galiero et al., 2016). First data on *C. burnetii* viability in milk, butter and cheese were obtained from experiments carried out in the 1940s and 1950s and, *C. burnetii* viability was only detected in cottage-type cheese after 42 days (reviewed by Gale et al., 2015). However, in two recent viability tests (Eldin et al., 2013; Hirai et al., 2012) *C. burnetii* detected in cheeses were not viable. In one of these studies (Eldin et al., 2013) that combined experiments in animal model and cell-line culture assays, mice inoculated with cheese homogenates were sacrificed at 7-days post-inoculation (p.i.) and culture of their spleens in Vero cell line produced negative results. Conversely, similar viability studies carried out on environmental samples (dust, manure) showed multiplication of *C. burnetii* in mice tissues 9-21 days p.i. (Álvarez-Alonso et al., 2018b; Berri et al., 2003; Kersh et al., 2010b). These results suggest that experimental infection protocols need to be adapted to the type of sample and the bacterial load and, that animals might need to be kept alive for longer periods to successfully achieve *C. burnetii* growth in mice tissues. The objectives of this study were: i) to investigate presence of *C. burnetii* in handicraft sheep hard cheeses made with raw milk bought at supermarkets from different geographic areas of Spain, and ii) to study its viability in a selection of positive cheeses (Stage I) and assess the effect of different ripening periods on viability (Stage II).

MATERIAL AND METHODS

Sample collection and detection of *C. burnetii* DNA

A total of 67 handicraft sheep hard cheeses with more than 2 months ripening, made with unpasteurized milk, and from different geographical origins were bought in Spanish supermarkets. If available, date of fabrication was recorded to calculate ripening. Before DNA extraction, cheese sample preparation followed a protocol already published (Hirai et al., 2012) with some modifications. Briefly, 10 grams of cheese were incubated with 15 ml phosphate buffered saline (PBS) at 56°C for 30 minutes. Then, the sample was homogenized in a Stomacher for 1 minute and placed into 50 ml screw cap tubes. Tubes were centrifuged at 900 \times g for 20 minutes at 4°C. The aqueous layer was preserved, and the pellet and the fat layer were washed with 10 ml of PBS and incubated at 45°C for 20 minutes. Tubes were vortexed, centrifuged at 900 \times g for 20 minutes at 4°C, and the aqueous layer was collected and mixed with the one previously preserved. The mixture was centrifuged at 11,000 rpm for 30 minutes at 4°C, the aqueous layer was discarded and the remaining pellet was resuspended in 300 μ l of PBS. DNA was then extracted using QIAmp DNA mini kit (Qiagen Hilden, Germany), and presence of *C. burnetii* was analyzed by real-time PCR targeting the *IS1111* gene (Schets et al., 2013). A commercial internal amplification control (IAC) (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, ThermoFisher Scientific, USA) was included in the assay to monitor for PCR inhibitors. Cheese samples were considered real-time PCR-positive when producing a $Ct \leq 35$.

Viability studies

Viability studies were carried out in BSL3 building facilities, and consisted on experimental inoculations in 6 week-old BALB/c male mice combined with culture in Vero cells. Permissions were obtained from the Ethical & Animal Welfare Committee (Bizkaiko Foru Aldundia, document 3/2017, Reg. 15.328, 22/02/2017). Cheese homogenates were prepared following the above mentioned procedure but without the incubations at 56°C and 45°C to preserve the viability of the possible bacteria present in the cheese samples. Quantification of *C. burnetii* genome equivalents (GE) in each homogenate was carried out by quantitative real-time PCR (qPCR) using 5 μ l of DNA (in triplicates) and specific primers and a probe targeting the *IS1111* gene as described elsewhere (Schets et al., 2013). In each qPCR run, a standard curve was generated using 10-fold serial dilutions of a known concentration of Nine Mile (RSA439) phase II strain of *C. burnetii* DNA. After quantification, aliquots of 500 μ l were prepared from each homogenate of cheese, containing approximately 10^3 - 10^4 *C. burnetii* GE. These aliquots were

inoculated intraperitoneally in 4-6 mice each; a homogenate of cheese positive to the presence of *C. burnetii* DNA in real-time PCR (Ct 24.1) was pasteurized and 500 μ L used as negative control, inoculating intraperitoneally mice (n = 6). Mice were euthanized on days 7, 14 and 21 p.i., and the spleens were removed. The level of splenomegaly was determined from the ratio of the spleen weight to the body weight. Half of the spleen from each mouse was processed for DNA extraction and real-time PCR amplification as fully detailed elsewhere (Álvarez-Alonso et al., 2018b). Positive samples were subjected to qPCR to quantify the number of *C. burnetii* GE detected in spleen in order to compare it with the number of GE inoculated. For qPCR-positive samples, the second half of the spleen was homogenized with 700 μ L DMEM medium and 2% FBS in a TissueLyser. A hundred microlitres of each homogenate were placed on shell vials containing Vero cells [African green monkey epithelial cells VERO CI008 (Vero 76, clone E6, Vero E6 ATCC[®] CRL-1586[™])], as fully detailed elsewhere (Álvarez-Alonso et al., 2018b). Briefly, after harvesting *C. burnetii* from shell vial on day 6 p.i., three passages of 1,000 μ L of harvested cells were transferred at weekly intervals into T25 culture flasks containing a Vero layer. At day 6 p.i. and before each passage, 200 μ L were collected for DNA extraction and qPCR, following procedures described above. Cultures with unchanged or increased GE during the procedure were considered to be positive. Uninfected control cells were kept close to infected cells to rule out possible cross-contaminations.

Physico-chemical analyses

Two hundred grams of cheeses included in the study of viability were submitted to AENOR laboratory (Miguel Yuste 12, Madrid, Spain) for physico-chemical analyses. These analyses included pH determination by potentiometry, and water activity (a_w) by hygrometry. Before the analyses cheeses had been kept at -80°C.

Statistical analysis

SAS Enterprise Guide 7.1 software was used for statistical analyses. To evaluate the degree of splenomegaly, the mean spleen weights in positive vs. negative mice were compared by non-parametric Wilcoxon two-sample test. Student's t-test was used to check differences in pH or water activity in cheeses with viable *Coxiella* compared to negative cheeses. Probability values less than 0.050 ($p < 0.050$) were considered significant.

RESULTS

C. burnetii DNA was detected in 29.9% (20 out of 67) of the sheep hard cheeses elaborated with raw milk. A selection of 5 DNA positive cheeses with 2.0-3.1 months of ripening, were included in the study of *C. burnetii* viability using mice model and cell line culture (Stage I). Selected cheeses, with Ct values in real-time PCR ranging between 24.1 and 32.7, were homogenized and inoculated in 6 weeks-old BALB/c mice (4-6 replicates per cheese homogenate). The spleen of one mouse inoculated with a 3.1 months ripened cheese was PCR-positive at 14 day p.i. (Table 16). *C. burnetii* GEs recovered from the spleen of this mouse were higher than the GE inoculated, suggesting that *C. burnetii* was viable and bacteria multiplied *in vivo*. Culture in Vero cells of the homogenate of the spleen of this mouse was also positive, and bacterial loads (GE) recovered at each passage are shown in Table 16. No *C. burnetii* DNA was detected in the spleen of mice inoculated with the remaining 4 cheese homogenates. To further investigate the effect of cheese ripening in *C. burnetii* viability, another 12 cheeses elaborated in the same farm and season as the positive cheese, with ripening ranging between 2.2-10.1 months, were investigated (Stage II). Results showed presence of *C. burnetii* DNA in all 12 cheeses with Ct values in real-time PCR ranging between 23.5 and 30.8. Inoculation of 6 week-old BALB/c male mice resulted in viable *C. burnetii* being recovered 21 days p.i. from the spleens of 6 mice inoculated with homogenates of 5 different cheeses (Table 16). Cultures in Vero cells of homogenates of spleens from the 6 real-time PCR positive mice resulted in growth in all cases but one. Thus, *C. burnetii* GEs recovered through the different passages in Vero cells were higher than the GEs inoculated in shell vials in homogenates of spleens from 5 mice. Spleen of one mouse with *C. burnetii* GEs below 1×10^4 did not show growth in cell cultures. The bacterial loads (GE) recovered at each passage are shown in Table 16. Spleens from negative control mice were also negative. No relevant splenomegaly was detected in positive mice ($p=0.0737$). Cheeses with viable *C. burnetii* (6 of 13 cheeses from one sheep farm, 1 at Stage I and 5 at Stage II) covered a wide range of ripening (2.7-8.7 months) and bacterial loads expressed as Ct values in real-time PCR (Ct 24.1-30.3) (Table 16). Table 16 shows the pH and a_w values of 15 of the 17 cheeses included in the viability study. No clear trend in the evolution of pH throughout the ripening process was observed. On the contrary, a decrease in a_w was observed along ripening. In the cheeses with viable *Coxiella* pH ranged between 4.96 and 5.41 (mean 5.11 ± 0.18), and did not statistically differ from pH of the negative cheeses which ranged between 4.56 and 5.42 (5.05 ± 0.23) ($p=0.6915$). Similarly, cheeses with viable *C. burnetii* had a_w between 0.9065 and 0.9533 (mean 0.9387 ± 0.02) and differences with respect a_w of cheeses without viable *Coxiella* (range between 0.9040 and 0.9688; mean 0.9388 ± 0.03) were not significant ($p=0.6352$).

Table 16. Results of the viability study of *C. burnetii* in unpasteurized cheeses using BALB/c mice and culture in Vero cell lines.

Cheese selection					Experimental Infection - mice BALB/c model					Culture in cell lines (Vero E6) (GE ^d /ml)					Viable <i>C. burnetii</i>
Cheese	Ripening (months)	pH	a _w ^a	Ct real-time PCR	No. of mice/cheese and day of sacrifice (p.i.) ^b			No. of positive mice (day p.i.)	No. of GE ^c in spleen	Inoculated	Day 6 p.i.	1 st passage	2 nd passage	3 th passage	
					+7 p.i.	+14 p.i.	+21 p.i.								
Stage I															
1	2	5.24	0.9688	24.4	-	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
2	2.9	4.95	0.9539	26.4	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
3	3.1	5.04	0.9533	24.1	2	2	2	1 (+14)	5.8 x10 ⁵	2.8 x10 ⁴	4.3 x10 ⁵	9.1 x10 ⁴	2.1 x10 ⁵	0	Yes
4	2	5.02	0.9680	32.7	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
5	2.3	5.13	0.9542	31.4	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
Neg. control	3.1	5.04	0.9533	24.1	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
Stage II															
6	2.2	4.56	0.9573	27.1	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
7	2.7	4.96	0.9508	26.8	2	2	2	1 (+21)	7.8 x10 ⁵	9.4 x10 ⁴	2.6 x10 ⁵	2.2 x10 ⁵	7.3 x10 ⁵	5.2 x10 ⁵	Yes
8	3.1	5.00	0.9484	28.9	2	2	2	1 (+21)	1.4 x10 ⁶	3.1 x10 ⁵	1.3 x10 ⁶	1.6 x10 ⁶	3.9 x10 ⁶	2.1 x10 ⁶	Yes
9	3.6	5.00	0.9407	30.4	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
10	4.5	5.02	0.9236	30.8	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
11	4.8	ND	ND	30.3	2	2	2	1 (+21)	1.3 x10 ¹⁰	1.3 x10 ⁸	3.5 x10 ⁸	4.6 x10 ⁸	1.3 x10 ⁹	1.1 x10 ⁹	Yes
12	5.1	ND	ND	28.1	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
13	5.3	5.16	0.9344	28.0	2	2	2	1 (+21)	2.3 x 10 ³	1.2 x 10 ²	0	0	0	0	No
14	8.7	5.41	0.9065	25.7	-	2	2	2 (+21)	2.3 x 10 ⁶ 1.3 x 10 ⁹	4.8 x10 ⁴ 1.0 x 10 ⁷	1.5 x10 ⁵ 4.9 x 10 ⁷	1.7 x10 ⁵ 5.5 x 10 ⁷	1.3 x10 ⁵ 4.6 x 10 ⁷	0 5.0 x 10 ⁷	Yes Yes
15	8.9	5.42	0.9074	25.5	-	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
16	10.1	5.25	0.9101	23.5	-	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
17	10.1	4.56	0.9040	28.8	-	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No
Neg. control	3.1	5.04	0.9533	24.1	2	2	2	0	0	NA	NA	NA	NA	NA	No

^a a_w, water activity; ^b p.i., post-inoculation; ^c GE, genome equivalents of *C. burnetii* determined by qPCR targeting *IS1111*; ^d GE, genome equivalents inoculated in shell vial, and recovered at following passages in Vero cells; NA, not applicable; ND, not done, insufficient amount of cheese available for analysis (<200g).

DISCUSSION

C. burnetii is a Gram negative intracellular bacterium that in its life cycle passes through two phases, the large cell variant and the small cell variant. The latter is highly resistant to physical and chemical stresses, and allows *Coxiella* to survive for months in the environment or in different types of matrices such 7 to 10 months in wool, one month in fresh meat and more than 40 months in fresh milk (Eldin et al., 2017). Viability of *C. burnetii* in milk has been widely demonstrated (Loftis et al., 2010; To et al., 1998a), viability in cheese is uncertain. Whereas backdated studies (1940s-1950s) demonstrated viability in cottage-cheese (reviewed by Gale et al., 2015), more recent investigations were unable to demonstrate *C. burnetii* viability in cheese manufactured with unpasteurized milk (Eldin et al., 2013; Hirai et al., 2012). However, only 5 and 7 cheeses were analyzed in those studies, respectively. Here, *C. burnetii* real-time PCR-positive cheeses, with high-moderate bacterial loads (Ct 23.5-32.7) and 2.0-10.1 months ripening were analyzed for viability studies. Intraperitoneal inoculation of these cheese homogenates in BALB/c mice and culture in Vero cells of the spleens of mice euthanized at 7, 14 and 21 days p.i. showed that *Coxiella* remains viable in raw milk cheeses for almost 9 months of ripening. *C. burnetii* was viable in 6 of 17 cheeses tested and positivity was revealed in mice at 14 and 21 days p.i., but not at 7 days p.i. Similarly, authors who failed to demonstrate viability in cheese, sacrificed mice at 7 days p.i (Eldin et al., 2013). According to the results reported herein, ripening periods of up to 9 months did not seem to efficiently kill *C. burnetii* present in raw milk. The acid pH (4.9-5.5) reached during the hard cheese elaboration process (Gale et al., 2015), apparently allowed *C. burnetii* survival. In agreement with this, the pH values obtained in this study in cheeses with viable *Coxiella* were within the above mentioned range (4.96-5.41), confirming that acid pH allows *Coxiella* to remain viable along ripening. The water activity trend observed in this study along ripening was in agreement with values reported for Spanish sheep hard cheeses, which decreased from 0.9880 (on ripening day 1) to 0.9130 (on ripening day 240) (Etayo et al., 2006). In this study, a_w ranged between 0.9688 (on ripening day 60) and 0.9040 values (on ripening day 300). It is noticeable that *Coxiella* viability was not affected by low a_w since viable *Coxiella* was detected in cheeses with a_w values as low as 0.9065.

It is difficult to explain why 4 of the 5 cheeses initially tested showed negative results and lack of growth in mice tissues despite having similar Ct values and ripening times. One hypothesis is that cheeses would have a different proportion of viable / non-viable bacteria, both undistinguishable by PCR. Also, bacteria growth would had been unnoticed if multiplication in mice tissues occurred outside the pre-established sacrifice days (7, 14 and 21

p.i.). Moreover, the limited number of animals that can be used in experimental studies (here 2 mice per day of sacrifice and cheese), reduces chances of isolation.

Although these results would confirm exposure of cheese-consumers to *C. burnetii*, no clear evidences of human oral infection by consumption of infected unpasteurized milk and milk products have been found (EFSA, 2010; Eldin et al., 2017; Gale et al., 2015). Some studies have shown high seroprevalences and clinical disease in people consuming raw milk (Benson et al., 1963; Eldin et al., 2017), but it is difficult to ascertain if patients that reported consumption of raw milk products were previously exposed to aerosol inhalation of *C. burnetii*. In fact, most Q fever cases in humans occur after inhalation of *C. burnetii*-infected aerosols in livestock-associated environments around the parturition period (EFSA, 2010; Eldin et al., 2017; Maurin and Raoult, 1999). Evidences suggest that the oral route is of minor relevance in Q fever acquisition. A recent risk assessment study concluded that the risk of infection by the consumption of unpasteurized milk would be relatively low in comparison with the aerial route, but not negligible (Gale et al., 2015). In spite of the high prevalence of livestock farms positive to *C. burnetii* in bulk-tank milk (Astobiza et al., 2012a; Kim et al., 2005) and high prevalence of *C. burnetii* DNA in cheeses (Capuano et al., 2012; Eldin et al., 2013; Galiero et al., 2016; Hirai et al., 2012), even higher is the bacterial load found in placentas (millions of *C. burnetii* per gram of placental tissue) (EFSA, 2010) and expelled to the environment by infected animals. This situation results in a high environmental contamination that leads to high risk of Q fever outbreaks. In addition, human infection by the digestive route does not seem to be as efficient as infection by inhalation of contaminated air, probably due to the small number of macrophages, which are the major targets for *Coxiella* multiplication, in the digestive tract in comparison to those found in lung tissues (Gale et al., 2015).

In summary, the prevalence of *C. burnetii* DNA estimates reported here in sheep cheeses are within the ranges obtained in other similar European studies (Capuano et al., 2012; Eldin et al., 2013; Galiero et al., 2016), in agreement with the worldwide distribution of *C. burnetii* infection in domestic ruminants. While the airborne route is the main route for *C. burnetii* infection, contribution of dairy products to Q fever epidemiology should not be neglected particularly after demonstrating the survival of the bacterium in hard cheese along the ripening period. Consequently, efforts should be made to implement control methods based in vaccination and biosafety implementation in order to progressively decrease infection levels in dairy farms and obtain *Coxiella*-free milk and milk products. This study has been carried out with sheep cheeses made with unpasteurized milk, but the results would be applicable to all hard cheeses made with raw milk regardless of the ruminant species.

V. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

La fiebre Q es una zoonosis endémica en la CAPV (Montes et al., 2006), en la que el papel de los rumiantes domésticos es clave en la transmisión de la infección a la población humana (Roest et al., 2013a; van den Brom et al., 2015a). Los casos humanos de fiebre Q declarados en la CAPV han ocurrido por lo general en zonas rurales durante los meses de primavera (Pérez-Arellano et al., 2018), coincidiendo con la época de partos del ganado ovino (Cilla et al., 2008). Esto mismo se ha observado en un estudio reciente realizado en Grecia (Vranakis et al., 2020), ya que, tras analizar los casos humanos de fiebre Q durante 13 años, se ha hallado una relación estacional entre la aparición de casos clínicos y la época de partos. Así, debido a la importancia que tiene el ganado ovino en la producción ovina de la CAPV, se llevaron a cabo varios estudios epidemiológicos para conocer la prevalencia de *C. burnetii* en esta especie (García-Pérez et al., 2009; Ruiz-Fons et al., 2011), en los que se observó que un 22% de las explotaciones tenían animales excretores de *C. burnetii* a través de la leche. Además, un estudio de seroprevalencia realizado en las tres especies de rumiantes domésticos (Ruiz-Fons et al., 2010), determinó que el ganado ovino mostraba una seroprevalencia a nivel de rebaño (74%) y a nivel individual (11,8%) superior a la observada en el ganado caprino (45% y 8,7% respectivamente) y bovino (43% y 6,7% respectivamente). Por ello, y debido a que el ganado ovino y bovino lechero tienen los censos ganaderos más altos en la CAPV, hasta el comienzo de esta tesis los esfuerzos se habían centrado en el estudio de la infección por *C. burnetii* en estas dos especies de rumiantes (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b; Astobiza et al., 2013; Piñero et al., 2014b; Piñero et al., 2014c). Conforme se ha ido profundizando en la epidemiología de la infección por *Coxiella* en estas especies, han ido surgiendo una serie de cuestiones, poco estudiadas en la literatura científica, y que han constituido los objetivos de este trabajo de tesis.

En relación con el **primer objetivo** “*Estudio de la prevalencia de C. burnetii en las explotaciones ovinas lecheras de la CAPV y su evolución en un periodo de 10 años*”, se ha realizado el **Estudio 1**. En él se han evaluado posibles cambios en la prevalencia de la infección por *C. burnetii* en un intervalo de 10 años (2005 y 2015). Para ello se utilizaron muestras de leche de tanque. Este tipo de muestra se viene utilizando ampliamente para evaluar la prevalencia de diferentes agentes patógenos en explotaciones lecheras (Plummer et al., 2018; Soltau et al., 2017), porque la toma de muestras es sencilla y no invasiva, y proporciona información sobre el estatus de infección un rebaño sin elevado coste económico. Puede utilizarse como método de cribado, para diferenciar explotaciones positivas o negativas a un determinado agente patógeno. En muestras de leche de tanque se pueden realizar análisis serológicos, cuyos resultados positivos indican el contacto previo del rebaño con *Coxiella*, así como análisis moleculares, cuyo

resultado positivo indica la presencia de animales excretores de *C. burnetii* a través de la leche, lo que sugiere que la infección es reciente (Plummer et al., 2018). Así, en los muestreos de leche de tanque realizados en los años 2005 y 2015 se observó que la infección por *C. burnetii* estaba ampliamente distribuida en la población ovina de la CAPV, con un 22,1% y 23,5% de rebaños positivos a la presencia de ADN de *Coxiella* mediante el análisis por PCR, respectivamente. En 46 rebaños se tomaron muestras en ambos muestreos (2005 y 2015), y comparando los resultados obtenidos se observó un incremento en el porcentaje de explotaciones que tenían animales excretores en leche (21,7% y 28,3%, respectivamente), lo que pudo achacarse a la mayor sensibilidad de la técnica de PCR a tiempo real utilizada en las muestras del año 2015, en relación con la PCR convencional usada en 2005 (Galiero et al., 2016; Topcuoglu et al., 2013; Zemtsova et al., 2015). Sin embargo, este incremento no fue estadísticamente significativo, por lo que a nivel general, parece que en el lapso de tiempo de 10 años transcurrido entre ambos estudios, la prevalencia se mantuvo estable. El hecho de no haber observado un aumento en la prevalencia podría achacarse a que en estos últimos 10 años el censo ovino ha disminuido en 94.000 cabezas, lo que ha podido evitar una mayor expansión de la infección entre rebaños. Por otro lado, el hecho de no haber observado tampoco una reducción en la prevalencia en este periodo de tiempo, es consistente con la ausencia de planes específicos de control de la fiebre Q en la cabaña ovina de la CAPV, ya que hasta 2020 no ha existido un Plan de Vigilancia y Control de la fiebre Q en Euskadi.

La implantación de medidas de control, incluyendo la vacunación obligatoria, podría dar lugar a descensos significativos de la prevalencia de *C. burnetii* en las explotaciones de pequeños rumiantes, como ocurrió en Holanda donde, en 2009 se partía de un 20,5% de muestras de leche de tanque positivas en PCR, y, cinco años más tarde, en 2014, el porcentaje de positividad descendió a niveles mínimos (0,3%) (van den Brom et al., 2015b). Así pues, una de las formas de evaluar el éxito del programa de control en ese país fue mediante el análisis de muestras de leche de tanque. Estos resultados ponen de manifiesto la validez del método para el seguimiento epidemiológico de la infección por *C. burnetii* (van der Hoek et al., 2012).

En lo que respecta a la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii*, un 32,1% de rebaños presentaron anticuerpos durante el muestreo realizado el año 2015, siendo este porcentaje ligeramente menor al observado en 2005 (40,3%) (Ruiz-Fons et al., 2011). Sin embargo, estas tasas fueron netamente inferiores a las obtenidas en un estudio de seroprevalencia realizado con muestras de suero sanguíneo de 46 rebaños (74%) en el periodo 2007-2008 (Ruiz-Fons et al., 2010). Estas diferencias pueden ser debidas al tipo de muestra utilizado en cada estudio, suero lácteo procedente de leche de tanque o suero sanguíneo. De hecho, en el estudio de Ruiz-Fons

et al. (2010), se consideró una explotación positiva cuando al menos un animal de los analizados (1/30) presentaba anticuerpos, por lo que estas bajas tasas de anticuerpos podrían no detectarse en una muestra de leche de tanque. En cualquier caso, las seroprevalencias obtenidas en el Estudio I fueron superiores a las detectadas en 2008 en los Países Bajos al inicio del brote de fiebre Q, en el que se detectó en torno a un 20% de rebaños seropositivos (van den Brom et al., 2012), pero se encuentran dentro de los rangos hallados en otros países, 10,2-52,1% (Anastácio et al., 2016; Cruz et al., 2018b; Obaidat and Kersh, 2017).

En este Estudio I, se consideró que un rebaño era positivo cuando al menos una de las dos técnicas realizadas, ELISA para el análisis de anticuerpos frente a *Coxiella*, o PCR para el análisis de la presencia de ADN de la bacteria, eran positivas (Guatteo et al., 2011; Mori and Roest, 2018). Así, otro resultado de interés fue el comprobar que algunas explotaciones positivas en 2005 mantenían la positividad 10 años más tarde. Este hallazgo es difícil de explicar ya que no se conocía el periodo de tiempo durante el cual la infección puede permanecer activa de forma natural en un rebaño. Por ello, en el **Estudio 2** se realizó el seguimiento de la infección por *C. burnetii* a lo largo de 4 parideras consecutivas en 4 rebaños que habían mostrado un resultado positivo en leche de tanque en el muestreo realizado en el año 2015. Se ha podido comprobar que cada explotación ha mostrado un patrón de infección diferente, y que algunas prácticas de manejo han podido favorecer la reactivación de la infección en los rebaños, como por ejemplo la compra de animales, o realizar pastoreo en proximidad con otros rebaños, manteniendo la infección activa por *C. burnetii* a lo largo del estudio. Por ello, estos resultados sugieren que el mantenimiento de la infección por *C. burnetii* durante 10 años, podría ser posible.

Es interesante destacar que también es posible que un rebaño infectado logre eliminar la infección en un plazo de tiempo determinado, ya que en el Estudio I se comprobó que 17 rebaños que eran positivos en 2005, en 2015 fueron negativos tanto a la presencia de anticuerpos como a la presencia de ADN de *C. burnetii* en leche de tanque.

La alta prevalencia de *C. burnetii* en los rebaños ovinos de la CAPV precisan de la aplicación de medidas de prevención y control, como por ejemplo, la vacunación, el evitar la introducción de nuevos animales en el rebaño, no realizar pastoreo conjunto con otros rebaños de los que no se conozca su estatus de infección, así como llevar a cabo medidas de higiene y desinfección dentro de las explotaciones (EFSA, 2010; Plummer et al., 2018; van den Brom et al., 2015a). De esta manera se podría conseguir, primero minimizar y, posteriormente, eliminar la infección en los rebaños.

El **segundo objetivo** de esta tesis ha consistido en “*Estudiar la cinética, persistencia y progresión de la infección por C. burnetii en explotaciones lecheras de pequeños rumiantes de la CAPV*”, y para ello se ha realizado un seguimiento de la infección en cuatro rebaños ovinos y en un rebaño caprino, a lo largo de periodos de tiempo variables. En lo que respecta al ganado ovino, se seleccionaron rebaños ovinos que habían mostrado resultados positivos (ELISA y PCR) en leche de tanque en el muestreo realizado en Marzo-Abril 2015 (Estudio 1), y que presentaron también una alta seroprevalencia en primaras, lo que denotaba la existencia de una infección reciente en la explotación (EFSA, 2010; OIE, 2018; Plummer et al., 2018). El objetivo ha consistido en profundizar en el conocimiento de la evolución de la infección natural por *C. burnetii* en explotaciones ovinas, a través de su seguimiento a lo largo de cuatro parideras, trabajo que ha dado lugar al **Estudio 2**. La rotura de stock de la vacuna en fase I en el momento de iniciar este estudio, impidió aplicar la vacunación como medida de control. Cabe destacar que, según las observaciones de los ganaderos, estos 4 rebaños no tenían problemas de abortos, y cumplían, en general, las prácticas de manejo habituales en la raza Latxa, con estancias prolongadas en zonas de sierra compartiendo pastos con otros rumiantes domésticos. Hasta la fecha, en la CAPV, se había realizado seguimiento de la infección en explotaciones ovinas en las que se había llevado a cabo algún tipo de control (antibióticos y/o vacunación) (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b; Astobiza et al., 2013), pero no en explotaciones con las características citadas.

Cada rebaño mostró una dinámica de infección por *Coxiella* diferente, con diferentes porcentajes de animales excretores y diferente grado de excreción bacteriana durante la primera paridera. Además, la negatividad en el grupo de primaras y/u ovejas en algunos rebaños, sugiere que la infección pudo entrar en cada rebaño en momentos diferentes. También la escasa excreción a través de la leche durante la primera paridera, que es la vía de eliminación de *Coxiella* que dura menos en el tiempo, tiene menor carga bacteriana y que antes desaparece, en comparación con las heces y los fluidos uterinos, es otro de los indicadores para apoyar esta hipótesis (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2013; Berri et al., 2001; Joulié et al., 2015; Rodolakis et al., 2007).

Antes de comenzar esta tesis se conocía que la excreción de *C. burnetii* en rebaños ovinos naturalmente infectados puede durar al menos 2 parideras consecutivas con un descenso importante de la excreción en la segunda paridera, y que también existen animales infectados de forma crónica que pueden mantener la infección y permanecen como excretores durante más tiempo, pudiendo ser el origen de nuevas reinfecciones en el rebaño (Berri et al., 2002). En el rebaño 4, a pesar de no estar vacunado, la infección fue desapareciendo progresivamente con el paso de los años, no habiendo apenas excreción en la segunda paridera y desapareciendo en la

tercera y cuarta. Sin embargo, en los otros 3 rebaños, a pesar de ser rebaños en los que parecía que la infección ya estaba remitiendo, ocurrieron nuevas reinfecciones. En los rebaños 2 y 3 se compraron lotes de ovejas gestantes, afectando de una u otra forma a la reactivación de la infección en estos rebaños. En el caso del rebaño 2, los animales gestantes introducidos unos meses antes del momento de los partos eran susceptibles a la infección y al no estar vacunados antes de su entrada, al introducirse en un ambiente contaminado, tras la infección, experimentaron una alta excreción de *Coxiella* en el momento del parto. En el caso del rebaño 3, los resultados obtenidos indicaban que los animales comprados procedían de un rebaño positivo. Ambos casos han afectado de forma negativa al transcurso de la infección en los rebaños 2 y 3. Estos resultados no sorprenden, puesto que la compra de animales es una de las causas más habituales de introducción de ésta y otras infecciones en un rebaño (Anderson et al., 2015; Pandit et al., 2016). El uso de pastos comunales donde se pasta en estrecho contacto con otros rebaños, o con fauna silvestre (Barlozzari et al., 2020; Muema et al., 2017; Rizzo et al., 2016), ha podido ser el caso de las reinfecciones experimentadas por el grupo de primaras del rebaño 1, pero tras hablar con el ganadero, en este caso no se daba esta circunstancia. Podría ser que otras especies de rumiantes (cabras y vacas) existentes dentro de la explotación pudieran haber introducido la infección, pero esta hipótesis tampoco pudo ser confirmada.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, hay que evitar la compra de animales, así como el contacto con otros rebaños de los que no se conoce el estatus de infección, restringir los partos a zonas exclusivas de la explotación y extremar la limpieza y desinfección de las instalaciones, podrían evitar las reinfecciones impidiendo que se prolongue en el tiempo la infección dentro del rebaño. Además de las medidas citadas, la vacunación con la vacuna inactivada en fase I, reduciría el riesgo de reinfecciones durante el tiempo que *C. burnetii* permaneciera activa en el rebaño (EFSA, 2010). No obstante, para que la vacunación tenga un efecto en la reducción de la infección en la población animal y en el entorno de la explotación infectada, ha de aplicarse durante varios años consecutivos (Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2011b). Asimismo, la vacunación es más eficiente si se comienza a aplicar en los animales jóvenes no infectados, a los 3 meses de edad, cuando éstos son más susceptibles a la infección (de Cremoux et al., 2012b; Guatteo et al., 2008; Hogerwerf et al., 2011; Rousset et al., 2009b). En el Estudio 2 se ha observado que las reactivaciones de la infección, con una mayor excreción de la bacteria, afectaron principalmente al grupo de las primaras. Por ello, algunos autores recomiendan la aplicación de la vacunación en la reposición, con dosis de recuerdo anual, durante varios años hasta que todo el rebaño esté compuesto de animales vacunados (de Cremoux et al., 2012b). Además, cabe señalar que la vacunación preventiva de los rebaños

resultó ser la estrategia más eficaz para la disminución de la prevalencia de la fiebre Q en Holanda, según un modelo desarrollado para evaluar el efecto de cada una de las medidas de control llevadas a cabo en este país (Bontje et al., 2016). En cualquier caso, la opción más efectiva sería la vacunación del rebaño completo al menos durante 10 años, tal y como se ha mostrado en un estudio donde se predice la evolución de la infección en el ganado vacuno (Courcoul et al., 2011). Los resultados obtenidos en los rebaños del Estudio 2, indican la conveniencia de aplicar la vacunación junto con una exhaustiva desinfección de las instalaciones, para evitar el riesgo de sucesivas reactivaciones de la infección por *Coxiella*, porque de lo contrario, existe el riesgo de que la infección se mantenga durante más de 5 años, tal y como se ha observado en alguno de los rebaños estudiados.

En lo que respecta al ganado caprino, en los últimos años esta especie se ha visto involucrada en importantes brotes humanos de fiebre Q (Bjork et al., 2014; Bond et al., 2016; van der Hoek et al., 2012). Hasta el comienzo de esta tesis apenas se había investigado el papel del ganado caprino en el ciclo doméstico de la fiebre Q en la CAPV. Únicamente disponíamos de un estudio de seroprevalencia (Ruiz-Fons et al., 2010), que indicaba que el 45% de los rebaños tenía al menos un animal seropositivo, y que el 27% de estos rebaños tenía seroprevalencias superiores al 20%, lo que sugería que el ganado caprino también podría tener vínculos con los brotes humanos de fiebre Q en la CAPV. No obstante, se había asumido que al tener un escaso censo en relación al ganado ovino y vacuno, podría tener menos implicaciones en la transmisión de la fiebre Q a la población humana. Sin embargo, los últimos brotes de fiebre Q investigados en la CAPV han tenido como posible fuente de infección a esta especie (Alonso et al., 2015; Alonso et al., 2019; Hurtado et al., 2017), lo que ha creado la necesidad de estudiar la epidemiología de la infección por *C. burnetii* en esta especie, tal y como se ha hecho en el **Estudio 3**.

La explotación caprina estudiada padeció un alto porcentaje de abortos (81%), dentro del rango de la tasa de abortos hallada por otros autores (Palmer et al., 1983; Rousset et al., 2009b). La alta contaminación ambiental generada por las excreciones de *C. burnetii* expulsadas por los animales abortados a través de placentas, heces y otros fluidos, dio lugar a un brote de fiebre Q entre los trabajadores y visitantes de la explotación. Los brotes explosivos de abortos que experimentan las cabras distan bastante de lo que se observa en la especie ovina, en la que las tasas de abortos son sensiblemente más bajas (Agerholm, 2013; Dijkstra et al., 2012; van den Brom et al., 2015a). De hecho, tal y como se ha podido comprobar en el Estudio 2 de este trabajo de tesis, los ganaderos no habían observado problemas de abortos significativos en las explotaciones ovinas estudiadas.

En los trabajos realizados en los rebaños ovinos del Estudio 2 y en otros trabajos previos, se ha ido discerniendo cuales son las vías de excreción de *C. burnetii* más importantes y que pueden contribuir más a la contaminación ambiental en el entorno de una explotación afectada. Se ha comprobado que, en el ganado ovino, los fluidos vaginales y las heces son vías de excreción más duraderas en el tiempo a la vez que presentan niveles de excreción bacteriana más elevados que a través la leche (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Astobiza et al., 2013; Berri et al., 2001; Joulié et al., 2015; Rodolakis et al., 2007). En lo que respecta al ganado caprino, varios estudios definieron la leche como la vía de excreción de *C. burnetii* más relevante en esta especie (Arricau-Bouvery et al., 2003; Arricau-Bouvery et al., 2005; Rodolakis et al., 2007), en comparación con la excreción a través de los exudados vaginales o las heces. Sin embargo, estudios posteriores, han demostrado que *Coxiella* se excreta tanto a través de los fluidos vaginales como de las heces, incluso durante periodos más prolongados que a través de la leche (Berri et al., 2005b; Roest et al., 2012). Los resultados observados en el Estudio 3, tras el seguimiento de la infección en 35 cabras abortadas durante 7 meses, nos permitieron llegar a las mismas conclusiones. Las muestras de exudados vaginales presentaron las mayores cargas bacterianas, seguidas de las heces y por último la leche. La excreción de *Coxiella* en leche fue prácticamente nula al cuarto mes, tras el pico de abortos, mientras en heces la carga bacteriana todavía era importante hasta el quinto mes. Por lo tanto, la cinética de excreción de *C. burnetii* en la especie caprina es similar a lo que ocurre en ganado ovino (Astobiza et al., 2010; Astobiza et al., 2011a; Joulié et al., 2015; Rodolakis et al., 2007). La contribución de los exudados vaginales y las heces a la contaminación ambiental generada en los aerosoles y polvo acumulado en la explotación, es clave para explicar el brote de fiebre Q que hubo entre los trabajadores y visitantes del rebaño caprino.

Se ha comprobado que, en un rebaño infectado, tanto los animales que abortan como los que tienen un parto normal, excretan *Coxiella* al medio exterior. Sin embargo, la excreción siempre es mayor en animales abortados (Joulié et al., 2015; Rousset et al., 2009a). Por lo que, un rebaño infectado con tasas elevadas de abortos supondría un alto riesgo alto de contagio para las personas que frecuenten la explotación. Este hecho fue patente en el Estudio 3, ya que un 78% de los trabajadores de la explotación y un 31% de los visitantes, mostro síntomas compatibles con fiebre Q y/o seroconversión. El origen del brote, que alertó a Salud Pública, fue el caso de neumonía en uno de los trabajadores, que es la manifestación de la fiebre Q más común en el norte de España en casos graves agudos (Alende-Castro et al., 2018). También en el Estudio 2, el ganadero propietario del rebaño 2 comentó al inicio del estudio que una persona

de la explotación había padecido neumonía el año previo al comienzo del estudio, pero, al no requerir hospitalización, su etiología no pudo ser determinada.

En el contexto de este brote de fiebre Q, los epidemiólogos de Salud Pública instaron a pasteurizar la leche de este rebaño caprino, ya que la destinaban a la producción de queso artesanal. La evolución de la presencia de *Coxiella* en leche de tanque siguió lógicamente la misma cinética que se observó en la población de cabras que se examinaba mensualmente, pero se siguieron detectando bajos niveles de *C. burnetii* desde el tercer mes hasta la finalización del estudio. El hecho de que la leche de tanque se negativizara más tarde que en los animales en seguimiento, no es contradictorio, ya que la leche de tanque es una muestra representativa de todo el rebaño, por lo que algunas de las cabras no analizadas todavía podrían haber estado excretando bajas cantidades de bacterias a lo largo del periodo de ordeño. En definitiva, el seguimiento de muestras de leche de tanque en una explotación, muestra la evolución de la excreción en el rebaño. Así mismo, en el Estudio 2, los resultados de la presencia de ADN de *C. burnetii* en la leche de tanque, han sido un reflejo de cómo iba evolucionando la infección en cada rebaño, con aumentos puntuales de la carga bacteriana, relacionados con reinfecciones puntuales que se iban sucediendo en algunos rebaños.

En cuanto a la cinética de anticuerpos tras la infección, en el caso del Estudio 3, el grupo de cabras abortadas examinado mostró una respuesta humoral importante frente a *C. burnetii*, y los anticuerpos se mantuvieron al menos durante los 7 meses que duró el estudio. A pesar de que se sabe que tras la infección por *Coxiella* hay un porcentaje variable de animales que no seroconvierte (Berri et al., 2001; Berri et al., 2005a; de Cremoux et al., 2012a; Reichel et al., 2012; Rousset et al., 2009a), en este caso hubo una alta tasa de seroconversión, próxima al 100% en algunos muestreos. En el Estudio 2, aunque el planteamiento del seguimiento de la infección en los 4 rebaños fue diferente, con sólo un muestreo a las ovejas y primaras en cada paridera, sí que se observó que las tasas de seroconversión fueron variables entre rebaños, y no superaron el 80%. En algunos rebaños ovinos del Estudio 2, el grupo de ovejas presentó niveles constantes de la seropositividad a lo largo de 3 años, lo que indica que la respuesta humoral frente a *C. burnetii* puede durar largos periodos de tiempo, tal y como observaron Berri et al. (2005b), que detectaron anticuerpos en ganado caprino durante los 15 meses de duración del estudio. También observaron que algunas ovejas que habían sido excretoras de *C. burnetii* en la paridera del brote, seguían siendo seropositivas en las 2 parideras consecutivas (Berri et al., 2002). Tal y como cabía esperar no hubo concordancia entre los resultados de los análisis de fluidos vaginales, heces y leche mediante PCR a tiempo real, y los resultados de ELISA (Plummer et al., 2018).

En la fiebre Q, la vía principal de infección es la aerógena (Eldin et al., 2017), por lo que la existencia de aerosoles contaminados con *C. burnetii* supone un riesgo para las personas y los animales susceptibles. La excreción de la bacteria a través de las heces y otras secreciones por parte de los animales infectados en plena paridera origina aerosoles contaminados con la bacteria, que acaban depositándose en diferentes superficies de la explotación, lo que conlleva al acúmulo de *Coxiella* en el polvo, donde la bacteria puede resistir viable en su forma SCV (Plummer et al., 2018). Estas bacterias que se encuentran en el ambiente pueden desplazarse por corrientes de aire, y movimientos de los propios animales, y pueden ser desplazadas a otras explotaciones cuando el clima es seco y ventoso, favoreciendo la dispersión de *C. burnetii* (Clark and Soares Magalhaes, 2018; de Rooij et al., 2016; Mori and Roest, 2018; Vranakis et al., 2020). El análisis de las muestras de polvo ha sido descrito como un parámetro indicativo de infección en las explotaciones, sobre todo en los rebaños de pequeños rumiantes (Carrié et al., 2019). Además de haber detectado contaminación ambiental en el entorno de explotaciones infectadas (Joulié et al., 2015; Kersh et al., 2013), también se ha detectado *C. burnetii* en entornos urbanos alejados de zonas ganaderas (Kersh et al., 2010b; Kersh et al., 2016). Durante el brote de Holanda, se detectó ADN de *C. burnetii* en el 100% de las muestras de polvo tomadas en las explotaciones localizadas en los focos principales de infección (de Bruin et al., 2012; de Bruin et al., 2013). También se ha detectado la presencia de ADN de *Coxiella* en polvo en explotaciones ovinas infectadas tras 4 años de vacunación, a pesar de que la excreción de *C. burnetii* en la población animal era inexistente (Astobiza et al., 2011a). Teniendo en cuenta lo expuesto, se consideró necesario dilucidar el significado de la presencia de ADN de *C. burnetii* en el polvo de las explotaciones de pequeños rumiantes, y averiguar si las bacterias se pueden encontrar viables, y durante cuánto tiempo. Para ello, se planteó el **tercer objetivo** de la tesis, que ha consistido en el “*Estudio la viabilidad de C. burnetii en muestras medioambientales tomadas en explotaciones afectadas por fiebre Q*”. Así, tanto en el **Estudio 2** como en el **Estudio 3**, se tomaron muestras medioambientales (polvo y aerosoles) a la par que se monitorizaba la evolución de la infección en los animales. Al igual que lo observado en un estudio holandés (de Bruin et al., 2013), y con la excepción del muestreo realizado en la cuarta paridera del rebaño 4 (Estudio 2), el análisis mediante métodos moleculares mostró que el 100% de muestras de polvo tomadas en el interior de las explotaciones eran positivas a la presencia de ADN de *Coxiella*. Se observó cierta variación en la carga bacteriana, expresada con el valor de Ct obtenido en la técnica de PCR a tiempo real. Así, en el polvo tomado en las diferentes superficies de las instalaciones del rebaño caprino (Estudio 3), se obtuvo un Ct promedio de 18,9, indicativo de la existencia de millones de bacterias en el ambiente. Sin embargo en el Estudio 2, en el que los

rebaños ovinos no habían sufrido abortos, al menos recientemente, y los animales mostraban excreciones de *C. burnetii* moderadas-bajas, los valores de Ct promedio estuvieron dentro del rango entre 27 y 33. Sin embargo, un resultado positivo en PCR no es indicativo de que la bacteria se encuentre viable, por lo que ha sido necesario recurrir a otros métodos.

Pocos estudios hasta el momento han analizado la viabilidad de la bacteria en este tipo de muestras ambientales, y los que existen han utilizado la inoculación de homogeneizados de polvo en modelo murino, con el posterior cultivo del bazo en cultivos celulares (Kersh et al., 2010b; Kersh et al., 2013; Kersh et al., 2016). En este trabajo seguimos este tipo de procedimiento con un doble objetivo, por un lado analizar durante cuánto tiempo permanece *Coxiella* viable tras los abortos, a lo largo del periodo de la paridera y ordeño en un rebaño caprino (Estudio 3), y, por otro, evaluar cuánto tiempo se puede detectar *Coxiella* viable a lo largo de sucesivas parideras (Estudio 2).

En el estudio 3 se realizaron cuatro muestreos de polvo, y los inóculos que se prepararon con los homogeneizados de polvo tenían una cantidad de equivalentes genómicos (EG) de *C. burnetii* acordes a la gran contaminación ambiental presente (10^5 EG). Teniendo en cuenta los resultados de estudios ya publicados (Kersh et al., 2010b; Kersh et al., 2013; Kersh et al., 2016; Mori et al., 2013; Zhang et al., 2005b), se utilizó un número mínimo de ratones BALB/c por homogeneizado que se sacrificaron los días +7 (2 ratones) y +21 post-inoculación (2 ratones). Los bazos que fueron positivos con la técnica PCR, se cultivaron en la línea celular Vero, donde se pudo comprobar la multiplicación de *Coxiella* a partir de las muestras de polvo tomadas en el momento álgido de los abortos, pero no se detectó crecimiento de *C. burnetii* en muestras de polvo tomadas a los 2, 3 y 4 meses desde que tuvo lugar el último parto. Estos resultados son de gran interés a la hora de establecer recomendaciones a los ganaderos que reciben visitas en la explotación, para que no autoricen la entrada de personal ajeno durante el periodo de paridera y durante semanas después, hasta que al menos no se cumpla un periodo mínimo de 2 meses desde el último parto. Estos resultados son de gran utilidad práctica a la hora de establecer medidas de bioseguridad en las explotaciones, ya que en la CAPV, la entrada de visitantes al interior de las cuadras es una práctica habitual, y en algunos casos, el hecho de recibir visitas puede originar ingresos económicos.

El estudio de viabilidad correspondiente al Estudio 2 fue realizado con posterioridad al Estudio 3, ya que comprendía muestras de 4 parideras. Los inóculos de polvo se mantuvieron a -80°C hasta el momento de realizar la infección experimental en modelo murino. Ésta se realizó con las muestras de polvo tomadas en cada rebaño y año, durante la paridera de las primaras, consecutiva a la paridera de las ovejas. Se tomó la decisión de investigar la viabilidad en las muestras en dicho periodo pensando en que estas muestras acumularían una

mayor carga bacteriana, procedente de ambas parideras. Para cada homogeneizado de polvo se inocularon 4 ratones BALB/c que se sacrificaron los días +14 (2) y + 21 p.i. (2). Los EG de *Coxiella* de los inóculos fueron sensiblemente inferiores (10^2 - 10^4), a los obtenidos en el Estudio 3, debido a la menor concentración de *C. burnetii* en el polvo de las explotaciones ovinas, como ya se ha comentado. Sin embargo, se detectaron varios ratones positivos los días +14 y +21 p.i. en los rebaños 1, y 3, confirmando que todavía en la cuarta paridera había suficiente número de *Coxiella* viables capaces de multiplicarse en modelo murino y células Vero.

En el Estudio 3 no se detectó crecimiento de *C. burnetii* en las muestras de polvo recogido a los 2, 3 y 4 meses desde que tuvo lugar el último parto, a pesar de que los inóculos albergaban aparentemente una alta carga bacteriana. Por lo tanto, teniendo en cuenta que en el Estudio 2 se detectó viabilidad de *Coxiella* en muestras de polvo con concentración bacteriana, sensiblemente más baja, esto indicaría que efectivamente los resultados obtenidos en el Estudio 3 serían correctos y que *Coxiella* permanecería viable en muestras de polvo durante un periodo limitado de tiempo, tal y como han hallado otros autores, que indican una viabilidad en muestras de polvo de 2 meses (revisado por EFSA, 2010).

Otras muestras ambientales, como los aerosoles tomados tanto fuera como dentro de las explotaciones, también han aportado información sobre la intensidad de la contaminación ambiental en las explotaciones ovinas y caprina, investigadas en los Estudios 2 y 3. En el Estudio 2, en el que la población animal mostró en general una baja excreción de *C. burnetii*, la contaminación detectada en los aerosoles externos fue en general muy baja, o nula. Los aerosoles tomados en el interior de las explotaciones, mostraron por lo general una mayor carga de *C. burnetii*, que fue descendiendo progresivamente en los rebaños 2 y 4, mientras que en los otros dos rebaños (rebaños 1 y 3) hubo repuntes debidos a las reinfecciones que experimentaron los grupos de primaras. Sin embargo, en el Estudio 3, todas las muestras de aerosoles tomados tanto dentro, como fuera de la cuadra, fueron positivas durante los 7 meses de seguimiento de la infección, y las cargas bacterianas fueron altas, especialmente en el interior de las instalaciones. La contaminación ambiental de los aerosoles siguió la misma cinética que el transcurso de la infección en los animales, altas cargas en el momento de los abortos y un descenso progresivo durante los meses sucesivos. Estos resultados corroboran lo observado en otros estudios realizados en explotaciones ovinas (Joulié et al., 2015).

La persistencia del ADN de *C. burnetii* en el entorno de la explotación, puede ser debida a varias causas, y entre ellas, a la ausencia de medidas de limpieza y desinfección. De hecho, en un estudio en el que se observó la ausencia de excreción bacteriana por parte de los animales tras 4 años de vacunación, se seguían detectando aerosoles y polvo contaminado con *C. burnetii*

(Astobiza et al., 2011a). En otro estudio llevado a cabo en la CAPV, en 2 rebaños ovinos que habían presentado abortos por fiebre Q, sólo uno de los rebaños presentaba aerosoles contaminados, y estas diferencias se achacaron al diferente manejo que se hacía con el estiércol (Astobiza et al., 2011b), ya que el rebaño que mostró negatividad a la presencia de ADN de *Coxiella*, utilizaba un sistema que no generaba aerosoles reduciendo de esa forma la contaminación ambiental. Estos resultados ponen de manifiesto el riesgo que conlleva el incorrecto manejo del estiércol en una explotación infectada. Además, en el estudio 2, se ha observado que la carga bacteriana detectada en el polvo acumulado en el interior de las cuadras estaba determinada por el número de animales excretadores de *C. burnetii* en heces, material que constituye mayoritariamente el estiércol.

El hecho de que los aerosoles contengan menos carga bacteriana que el polvo recogido de superficies puede ser debido a que los aerosoles representarían la contaminación puntual existente en el momento del muestreo. Por el contrario, las muestras de polvo tomadas en las superficies pueden contener un acúmulo continuo de bacterias, por lo que es complicado comparar los resultados en ambos tipos de matrices (de Bruin et al., 2012). Es interesante destacar que en Holanda, un año después del gran brote, casi un 30% de los aerosoles tomados en diferentes zonas residenciales del área más afectada, seguían siendo positivos a la presencia de *Coxiella*, aunque la carga bacteriana detectada era muy baja (de Rooij et al., 2016). En ese mismo periodo, los muestreos realizados en las explotaciones (de Bruin et al., 2013), detectaron que todas las muestras tomadas en el interior de las instalaciones eran positivas y tenían un grado de contaminación bacteriana significativamente mayor que las muestras de aire tomadas fuera de las explotaciones. Sin embargo, la positividad se mantenía a 1 kilómetro de distancia desde las explotaciones afectadas (de Bruin et al., 2013). Esta información indica la necesidad de extremar las precauciones en el manejo de los animales en una explotación afectada, ya que el movimiento de animales entre el interior y el exterior de la cuadra, así como permitir que los partos tengan lugar fuera de las instalaciones, o apilar el estiércol fuera de la cuadra en días secos y ventosos, implicarían un mayor perímetro de contaminación del aire, por lo que todas esas actividades deberían realizarse en el interior de la cuadra. Además, la contaminación que se origina en el exterior de la cuadra puede ser transportada por el viento o vehículos que entren en la explotación hacia otras zonas alejadas, dispersando así *C. burnetii* (Clark and Soares Magalhaes, 2018). Desafortunadamente, en este trabajo no se ha realizado la evaluación de la contaminación ambiental presente en el perímetro de las explotaciones afectadas, pero sí que se pudo hacer un seguimiento de la posible aparición de casos humanos de fiebre Q en el entorno de la explotación caprina investigada en el Estudio 3. Alrededor de esta cuadra había una serie

de casas y caseríos cuyos propietarios solían acudir los fines de semana, y a los que se les explicó la importancia de hacer un seguimiento de cualquier síntoma compatible con la fiebre Q que pudiera darse. No hubo ninguna notificación de casos o sospechas de fiebre Q entre los habitantes del vecindario, lo que parece indicar que la presencia de la contaminación exterior por *C. burnetii* no tuvo consecuencias relevantes. Sin embargo, en las valoraciones retrospectivas realizadas por los epidemiólogos de Salud Pública acerca de las visitas que habían frecuentado la explotación en el periodo de riesgo, se comprobó que un grupo de estudiantes y profesores de una Escuela Agraria había visitado la explotación durante unas pocas horas durante la época de partos. En el grupo hubo casos confirmados de fiebre Q, aunque la tasa de ataque fue inferior a la observada en los trabajadores. Tal y como se ha comentado, algunas explotaciones en la CAPV reciben una remuneración extra aceptando visitas profesionales o de grupos de turistas, por lo que se debería de evitar la entrada de personal ajeno durante el periodo de la paridera, ya que es un factor de riesgo y causa de brotes de fiebre Q, tal y como han indicado también otros autores (Kersh et al., 2013; Whelan et al., 2012).

En relación con el **cuarto objetivo**, “*Identificación de los genotipos de C. burnetii presentes en muestras animales y medioambientales de las explotaciones de pequeños rumiantes, su evolución en el tiempo y su relación con brotes humanos de fiebre Q*”, los **Estudios 1, 2 y 3** han definido cuáles son los genotipos de *C. burnetii* predominantes en las explotaciones ovinas y caprinas estudiadas, y estos hallazgos pueden ser extrapolables al conjunto de la población de pequeños rumiantes de la CAPV. Tal y como se ha comprobado, las especies ovina y caprina comparten genotipos de *C. burnetii* (SNP1/MST13 y SNP8/MST18), hecho que ya se había observado con anterioridad en un estudio realizado en la CAPV sobre los genotipos circulantes en los rumiantes domésticos mediante la técnica MLVA y MST (Astobiza et al., 2012b). Estos genotipos también se han identificado en brotes de fiebre Q en humanos (Eldin et al., 2017).

El estudio de los genotipos se ha llevado a cabo mediante la técnica de genotipado SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Huijsmans et al., 2011) y la técnica MST (*Multispacer Sequence Typing*) (Glazunova et al., 2005). Se ha preferido utilizar estas dos técnicas, en detrimento de la técnica MLVA (*Multilocus variable number of tandem repeats - VNTR - analysis*) (Arricau-Bouvery et al., 2006; Svraka et al., 2006), porque esta última, a pesar de ser más discriminatoria, conlleva cierta dificultad para poder comparar los resultados entre laboratorios, y por su difícil estandarización. Además, las técnicas de SNP y MST son más sencillas y permiten comparar los resultados obtenidos con los obtenidos por otros grupos de investigación (Eldin et al., 2017; Sidi-Boumedine and Rousset, 2011). Tanto el Estudio 1 como el Estudio 2 han revelado que los genotipos predominantes en el ganado ovino de la CAPV son el

SNPI y el SNP8, aunque también se detectaron el SNP4 (Estudio 1) y el SNP5 (Estudio 2), de forma esporádica. Los dos primeros han correspondido con MST13 y MST18, respectivamente, pero desafortunadamente, no se han podido obtener los perfiles completos de MST de los genotipos SNP4 y SNP5 ya que el ADN disponible tenía una baja carga bacteriana. Ambas técnicas de genotipado tienen la ventaja de poder aplicarse en muestras clínicas, sin necesidad de realizar aislamiento previo en cultivo celular (Sidi-Boumedine and Rousset, 2011).

En el transcurso de la tesis se ha podido estudiar el impacto clínico de estos genotipos de *C. burnetii* en la salud humana. Así en el Estudio 3, se produjo un brote de fiebre Q entre trabajadores y visitantes de una explotación caprina, que estaba infectada por el genotipo SNPI/MST13. Tal y como ya se ha comentado solo uno de los trabajadores presentó neumonía, mientras el resto mostro síntomas poco específicos (fiebre, mialgia, etc), lo que sugiere que este genotipo podría causar síntomas moderados en la enfermedad. Sin embargo, recientemente, hemos tenido la oportunidad de realizar el seguimiento de otro brote de fiebre Q entre los trabajadores de una empresa de transporte autorizada para el transporte de mascotas (Alonso et al., 2019), en la que se identificó el genotipo SNPI/MST13 como fuente de infección, y en este caso hubo un porcentaje alto de neumonías entre los trabajadores. Por otra parte, el SNP8/MST18 también ha sido detectado en la CAPV en el transcurso de otros brotes humanos de fiebre Q, con neumonía como principal manifestación clínica (Hurtado et al., 2017). Por lo tanto, podemos decir que los genotipos predominantes en los pequeños rumiantes darían lugar a cursos agudos de la enfermedad, con neumonía en casos graves, tal y como se ha venido observando en la CAPV y en otras comunidades del norte de España (Alende-Castro et al., 2018; Pérez-Arellano et al., 2018). Es de interés destacar que en otras zonas de España predomina otro tipo de sintomatología asociada a la fiebre Q, con afectación hepática, entre otros síntomas (Alende-Castro et al., 2018), por lo que sería de interés conocer cuáles son los genotipos asociados a otras sintomatología.

Si nos fijamos en los resultados obtenidos en muestras de casos humanos, los genotipos MST predominantes en el ganado ovino y caprino de la CAPV se han detectado en pacientes de varios países del sur de Europa (Eldin et al., 2017). En lo que respecta a los rumiantes domésticos, haciendo una recopilación de los hallazgos previos, el genotipo SNPI ha sido descrito en ganado caprino en Francia y Bélgica, en ganado ovino en Marruecos y en ganado caprino, ovino, vacuno, así como en pacientes de Holanda (Boarbi et al., 2014; Dal Pozzo et al., 2016; Huijsmans et al., 2011). El genotipo SNP8, detectado en muestras clínicas humanas en Holanda, Italia y Eslovaquia (Huijsmans et al., 2011), se ha asociado con el genotipo MST18

(Pearson et al., 2014), tal y como se ha observado en las muestras genotipadas del Estudio 2 de esta tesis.

El SNP5 encontrado en el Estudio 2, se ha identificado previamente en Bélgica y Francia en muestras de origen caprino (Dal Pozzo et al., 2016; Huijsmans et al., 2011) y el MST correspondiente podría ser el MST8 (Pearson et al., 2014), responsable también de brotes de fiebre Q en ganado caprino reportados en Estados Unidos (Kersh et al., 2013). Si asumimos que el SNP5 puede corresponder al MST8, éste sería el tercer genotipo compartido entre el ganado ovino y caprino de la CAPV según lo observado por (Astobiza et al., 2012b), aunque este genotipo sería, según los resultados obtenidos, poco frecuente.

Respecto al SNP4 detectado de forma esporádica en el Estudio 1, se ha detectado en leche de tanque caprina en Holanda Huijsmans et al., 2011). Pearson et al. (2014) infirieron que el SNP4 podía corresponder al MST20, genotipo asociado principalmente con el ganado bovino (Astobiza et al., 2012b; Kersh et al., 2016; Pearson et al., 2014). Sin embargo, el genotipo MST20, también se ha detectado de manera minoritaria en muestras de leche caprina (Pearson et al., 2014), en productos de aborto de un rebaño caprino del Reino Unido (Reichel et al., 2012), y recientemente, también en una muestra de placenta ovina (Hemsley et al., 2019). Es de interés destacar que el genotipo MST20 ha sido detectado en algunas muestras de origen humano en España, Francia o Portugal (https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html), y el SNP4 en sangre de pacientes en Eslovaquia (Huijsmans et al., 2011). Por lo tanto, teniendo en cuenta los hallazgos de esta tesis, y su relación con los hallazgos obtenidos en otros estudios, la infección por *C. burnetii* en población ovina y caprina de la CAPV podría estar causada por cuatro genotipos diferentes, siendo los más prevalentes el SNP1/MST13 y SNP8/MST18, y los menos frecuentes SNP5 (posible MST8) y SNP4 (posible MST20). En el futuro, sería de interés conocer el impacto clínico de cada uno de estos genotipos en los casos de fiebre Q de los pequeños rumiantes, así como su relevancia en el origen de brotes humanos. De momento, sabemos que el SNP1/MST13 causa graves brotes de abortos en la población caprina, según lo observado en el Estudio 3. Sin embargo, en la población ovina (rebaños 2 y 4 del Estudio 2) este genotipo no parece tener impacto como causa de abortos, y además, parece que la infección no permanece tanto tiempo activa en las explotaciones, en comparación con el genotipo SNP8/MST18. No obstante, en estos rebaños hubo reactivaciones de la infección a partir de la segunda paridera, lo que pudo causar que todavía hubiera abundante cantidad de *C. burnetii* viable en el ambiente de las explotaciones durante la cuarta paridera.

Por ello, otro aspecto de interés observado en las pruebas de viabilidad realizadas con las muestras de polvo, es que únicamente el polvo de las explotaciones infectadas con el genotipo SNP8/MST18 mostró que las *C. burnetii* presentes eran capaces de multiplicarse en la combinación de modelo murino y cultivo celular. Sin embargo, la cantidad de EG de *C. burnetii* en los inóculos del polvo con genotipo SNP1/MST13 fue ligeramente inferior.

Otra explicación podría ser la mayor facilidad del genotipo SNP8/MST18 para multiplicarse en los tejidos del ratón, y posteriormente en las líneas celulares, ya que la propagación de *C. burnetii* varía significativamente según la cepa de que se trate (Mori et al., 2013). En este último estudio, la cepa de referencia Nine Mile (SNP3) mostró una mayor capacidad de crecimiento que las cepas aisladas en brotes de fiebre Q en ganado caprino (con genotipo idéntico al SNP1/MST33 de la cepa causante del brote de Holanda) y en ganado bovino de Bélgica (SNP2), las cuales tuvieron un ratio de multiplicación similar (Mori et al., 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en ese estudio (Mori et al., 2013), la inoculación se realizó con concentraciones de *C. burnetii* viables conocidas, por lo que las respuestas generadas en las infecciones experimentales llevadas a cabo con muestras de campo podrían no ser comparables. En un estudio reciente también se comprobó que el grado de esplenomegalia observado en los ratones infectados, y el tiempo en el que se detectaba la infección, variaba entre cepas de *C. burnetii* (Miller et al., 2020). Estos autores concluyeron que aunque las cepas de *C. burnetii* presenten diferente virulencia, también es posible que generen diferente respuesta inmune, favoreciendo que la infección permanezca más o menos tiempo, y con más o menos intensidad, en el curso de la infección experimental. La diferencia de virulencia entre diferentes cepas ha sido analizada también recientemente en otros estudios (Long et al., 2019; Melenotte et al., 2019). En el estudio de Melenotte et al. (2019), al igual que lo observado en el estudio de Miller et al. (2020), hubo diferencias en los niveles de virulencia en función de la cepa, observando una mayor variabilidad entre cepas si se utilizaban los ratones BALB/c de una sensibilidad intermedia, en comparación con los ratones SCID (inmunodeficientes) (Melenotte et al., 2019). Esto explicaría la variabilidad obtenida en el crecimiento de *C. burnetii* en los tejidos de ratones inoculados con un mismo inóculo, observada en los Estudios 2, 3 y 4.

Respecto a la coexistencia de diferentes genotipos de *C. burnetii* en una misma explotación, existen trabajos previos que ya lo habían confirmado (Astobiza et al., 2012b; Bauer et al., 2015; Dal Pozzo et al., 2016; Joulié et al., 2015; Piñero et al., 2015). En el Estudio 2, se ve claramente que este hecho se da especialmente en los rebaños que tienen la práctica de comprar animales. Lo que también llama la atención son los resultados del Estudio 1, en el que en el lapso de tiempo de 10 años, se comprobó que en la población ovina hubo variaciones en el

genotipo predominante, pasando del predominio del SNP8 en 2005 al predominio del SNP1 en el año 2015. Estos resultados merecen ser confirmados con un nuevo estudio, ya que se deberían de repetir los mismos análisis al cabo de unos años, pero en los mismos rebaños, ya que en el Estudio 1 no se pudo disponer de ADN suficiente para genotipar las muestras de los rebaños positivos en ambos periodos de tiempo. No obstante, la explicación a estos resultados podría estar ligada a los cambios en el censo ovino, que disminuyó en 94.000 cabezas en dicho periodo de tiempo, lo que habría permitido la expansión de un genotipo a costa de la supresión del otro. También sería de interés realizar estudios de prevalencia en fauna silvestre, que completen los conocimientos ya disponibles en esta zona (Astobiza et al., 2011c), para conocer los genotipos que afectan a los ungulados silvestres y que comparte zonas de pastoreo con el ganado ovino de la CAPV, ya que durante los últimos años la población de corzos y de jabalíes en la CAPV ha sufrido un incremento significativo, y ambas especies parecen ser reservorios de *C. burnetii* (Astobiza et al., 2011c).

En la caracterización de cepas de *C. burnetii*, además del estudio de los genotipos, existen otras clasificaciones basadas en el estudio de diferentes genes y plásmidos. En el Estudio 2, se realizó la caracterización mediante el análisis del gen *adaA* y el plásmido QpHI en las muestras con genotipos SNP1/MST13 y SNP8/MST18 (datos no publicados). En ambos se detectó la presencia del plásmido QpHI, confirmando hallazgos previos. Además, debido a la relación entre los MST identificados por Glazunova et al. (2005) y los grupos genómicos definidos por Hendrix et al. (1991), tanto el MST13 como el MST18 se situarían en el grupo genómico II (Hornstra et al., 2011), grupo genómico con presencia del plásmido QpHI (Hendrix et al., 1991). La correlación entre la presencia de este plásmido y el gen *adaA* fue observada en un estudio realizado por Frangoulidis et al. (2013). Esta correlación ha sido observada también en las muestras del Estudio 2, ya que ambos genotipos mostraron presencia del gen *adaA*. Inicialmente, tanto el gen *adaA* como la presencia del plásmido QpHI fueron relacionados con casos agudos de fiebre Q en humanos (Hendrix et al., 1991; Samuel et al., 1985; Zhang et al., 2005a), sin embargo esto no siempre se ha cumplido (Frangoulidis et al., 2013; Jado et al., 2012; Stein and Raoult, 1993; Thiele and Willems, 1994). Además, existen otros plásmidos relacionados también con *adaA* como el plásmido QpDG (Frangoulidis et al., 2013). En resumen, los genotipos identificados en el Estudio 2, SNP1/MST13 y SNP8/MST18, presentan el gen *adaA* y el plásmido QpHI (datos no publicados), y se han asociado con casos humanos de fiebre Q aguda, con sintomatología respiratoria (neumonía), tal y como se ha observado en el Estudio 3, y en otros trabajos realizados recientemente en la CAPV en el curso del seguimiento de brotes humanos de fiebre Q (Alonso et al., 2019; Hurtado et al., 2017) .

Como ya se ha comentado previamente, la vía oral no parece ser una vía importante de transmisión de la fiebre Q (Gale et al., 2015), en relación a la importancia de la vía aerógena, pero no se puede descartar totalmente. Hay numerosos estudios en los que se ha detectado ADN de *C. burnetii* en leche y diferentes tipos de productos lácteos (Abdali et al., 2018; Capuano et al., 2012; Eldin et al., 2013; Fretz et al., 2007; Galiero et al., 2016; Hirai et al., 2012; Tatsumi et al., 2006). Además, se ha confirmado que *C. burnetii* permanece viable en algunas de esas matrices (leche, mantequilla, queso fresco tipo cottage) durante periodos de tiempo variable (Gale et al., 2015; Loftis et al., 2010; Olivas et al., 2016; To et al., 1998a). Por ello, y debido a la alta prevalencia de la infección por *C. burnetii* observada en la población ovina de la CAPV, cuya producción principal es el queso, el **quinto objetivo** de esta tesis consistió en “Investigar la prevalencia de *C. burnetii* en quesos elaborados con leche cruda, y su viabilidad a lo largo del proceso de maduración”. En relación a los estudios de viabilidad en el queso, se había detectado la viabilidad de *C. burnetii* en quesos frescos tipo “cottage” de 42 días (revisado por Gale et al., 2015), pero en el resto de estudios recientes no se había demostrado la viabilidad de *C. burnetii* en quesos curados elaborados con leche cruda (Eldin et al., 2013; Hirai et al., 2012).

En el **Estudio 4** de este trabajo de tesis se investigó en primer lugar la presencia de ADN de *C. burnetii* en quesos curados elaborados de forma artesanal con leche de oveja sin pasteurizar con diferentes orígenes dentro de la península y comprados en mercados y supermercados. Se halló que el 30% de los quesos analizados eran positivos, y que esta cifra estaba dentro del rango de prevalencia observado en otros estudios realizados en Europa (Capuano et al., 2012; Galiero et al., 2016). Tras confirmar que la prevalencia era elevada, el siguiente paso fue demostrar la viabilidad de *Coxiella*, y evaluar los cambios experimentados en la viabilidad a lo largo del proceso de maduración. Para ello, se seleccionaron 5 quesos que habían mostrado un valor de Ct bajo en PCR a tiempo real, y con una maduración entre 2 y 3,1 meses. Se utilizó el modelo animal BALB/c y cultivo celular, al igual que se hizo en los estudios de viabilidad de *C. burnetii* en muestras de polvo. Se detectaron *C. burnetii* viables el día +14 p.i. en un ratón inoculado con un queso que había mostrado un Ct de 24,1 en PCR a tiempo real, de 3,1 meses de maduración, y procedente de una explotación que había reportado abortos recientes por fiebre Q. El posterior análisis de quesos de diferentes grados de maduración, de esta misma explotación, reveló que ratones que habían sido inoculados con homogeneizados de queso de diferentes grados de curación eran positivos el día +21p.i.. Por lo tanto los resultados de este estudio han proporcionado una de las aportaciones más relevantes de este trabajo de tesis, que es la confirmación de que *C. burnetii* puede mantenerse viable en quesos de hasta casi 9 meses de maduración, en condiciones de pH ácido y con una baja actividad de agua, parámetros que suelen analizarse en el control de calidad de alimentos (Etayo et al., 2006;

Trmcic et al., 2017). Todo ello confirma que *C. burnetii* tiene una alta capacidad de resistencia en pH ácido, similar al que se encuentra en la vacuola parasitófora tardía (pH 4,5) donde se multiplica (EFSA, 2010; Minnick and Raghavan, 2011), además de ser capaz de soportar condiciones de estrés osmótico, y desecación, entre otros factores (EFSA, 2010; Oyston and Davies, 2011). Esta adecuación de *C. burnetii* al pH ácido, es compatible con las observaciones hechas en un estudio reciente que demostró que *Coxiella* muestra un mayor crecimiento a pH comprendido entre 4,5 y 5,5, mientras que a pH 6 o superior, no se detectó crecimiento en medio axénico (Smith et al., 2019).

En el conjunto de todas las infecciones experimentales realizadas en esta tesis (Estudios 2, 3 y 4) para el estudio de la viabilidad de *C. burnetii*, se ha observado que hay una serie de ratones en los que *Coxiella* no se multiplica, a pesar de que los mismos inóculos son capaces de reproducir la infección en otros animales del mismo lote. Esto podría deberse a la sensibilidad intermedia que presentan los ratones BALB/c tal y como se ha comentado anteriormente, y también a que en cada inóculo procedente de muestras de campo (polvo, quesos), habría diferente número de bacterias viables lo que haría que la infección progresara de diferente forma en cada individuo inoculado. La razón por la que en otros estudios no se ha detectado viabilidad de *C. burnetii* en quesos (Eldin et al., 2013) ha podido radicar en que tras la inoculación, han mantenido los ratones con vida hasta el día +7 p.i., y este periodo de tiempo no parece ser suficiente para que se multiplique *C. burnetii* en los tejidos de ratón, tal y como hemos comprobado en los Estudios 3 y 4, donde la multiplicación se ha revelado siempre los días +14 o +21 p.i..

Existen algunos estudios en los que el consumo regular de leche sin pasteurizar de vaca o cabra y queso elaborado con leche cruda de cabra ha dado lugar a seroconversión y/o a síntomas compatibles con fiebre Q en personas con o sin relación con ganado doméstico (Benson et al., 1963; Fishbein and Raoult, 1992; Signs et al., 2012). Las evidencias de que el consumo de *C. burnetii* viable por vía oral ocasione la enfermedad, no son del todo claras (Gale et al., 2015), ya que en ninguno de los trabajos se ha podido descartar la posible co-transmisión por vía aerógena (Fishbein and Raoult, 1992; Signs et al., 2012). A pesar de lo anteriormente expuesto, el riesgo de contagio por vía oral ha sido confirmado recientemente en modelo murino (Miller et al., 2020), si bien parece que la infección es menos severa por esta vía en comparación con la inoculación por vía intraperitoneal, por lo que la diseminación de la infección a través de la vía oral parece ser menos eficiente (Miller et al., 2020). Teniendo en cuenta los resultados de los estudios de viabilidad de *C. burnetii* en leche sin pasteurizar, en los que han detectado bacterias viables (Gale et al., 2015; Loftis et al., 2010; Olivas et al., 2016; To et

al., 1998a), y los obtenidos en esta tesis en muestras de quesos, todos ellos sugieren que, aunque el riesgo de infección con *C. burnetii* por vía oral sea bajo, no habría que descartarlo totalmente (Gale et al., 2015). Por ello, una de las medidas a tomar en rebaños de aptitud lechera, tras un brote por fiebre Q y con un grado de excreción alto de la bacteria en leche, es la pasteurización, tal y como se llevó a cabo en el Estudio 3.

En resumen, los resultados de los cuatro estudios que conforman este trabajo de tesis han aportado información de gran interés sobre la epidemiología de la fiebre Q en los pequeños rumiantes, y sobre los genotipos de *C. burnetii* predominantes en la CAPV, compartidos por estas especies y asociados a casos de fiebre Q humana. También se han aportado novedosos resultados sobre el tiempo que *C. burnetii* permanece viable en el entorno de las explotaciones, así como en los productos derivados de la producción lechera. Además de los trabajos previos realizados por el grupo de Sanidad Animal de NEIKER, los trabajos de esta tesis han aportado cuestiones prácticas de interés tanto para los profesionales de la Salud Pública como para los gestores de la Sanidad Animal desde la perspectiva de una Única Salud (*One Health approach*), que han sido claves para que a fecha de hoy ya se haya publicado un *Plan de Vigilancia y Control de la fiebre Q en Euskadi* (BOPV nº42, 2 de marzo de 2020).

VI. CONCLUSIONES

1. El análisis de muestras de leche de tanque ha mostrado su validez para realizar la vigilancia activa de la infección por *Coxiella burnetii* en el ganado lechero. La prevalencia de *C. burnetii* en la población ovina de la CAPV se ha mantenido estable durante 10 años (2005-2015), periodo en el cual no se han aplicado medidas específicas para el control de la infección y en el que algunos rebaños han pasado por diferentes estatus de infección.
2. El seguimiento de la infección por *C. burnetii* en 4 rebaños ovinos naturalmente infectados durante 4 parideras consecutivas, ha permitido comprobar que, sin la aplicación de medidas de control, higiene y bioseguridad, la infección por *C. burnetii* en el rebaño puede perdurar al menos 5 años. Ciertas actividades del manejo del rebaño, como la entrada de nuevos animales, contribuyen a reactivar la infección.
3. Conforme se va superando la fase inicial de la infección, en las sucesivas parideras la infección por *C. burnetii* se mantiene en la población animal, pero con un bajo porcentaje de animales excretores, y una baja excreción bacteriana, lo que se traduce en un descenso de la contaminación ambiental. Durante este periodo las ovejas adultas presentan seroprevalencias que fluctúan entre el 30 y el 80%. El grupo de primaras, más susceptibles a la infección, puede presentar nuevos repuntes de la infección.
4. Tras el brote de abortos por fiebre Q en el rebaño caprino estudiado, los exudados vaginales y las heces han sido las principales vías de excreción de *C. burnetii*, mientras que la leche ha sido la ruta con menor excreción y la menos duradera. El patrón de infección por *Coxiella* en la especie caprina ha resultado ser similar al observado en estudios previos en la especie ovina.
5. Tras el brote de abortos, la excreción de *C. burnetii* por los animales infectados origina una elevada contaminación ambiental, que se mantiene durante meses en el entorno de la explotación y puede dar lugar a un brote de fiebre Q en personas que accedan a las instalaciones ganaderas, tal y como se ha observado en esta tesis. Sin embargo, la cantidad de *Coxiellas* viables en el ambiente va descendiendo progresivamente hasta alcanzar niveles bajos, no detectables tras inocular muestras de polvo en modelo murino y cultivo celular, una vez transcurridos dos meses desde el final de la paridera.

6. La contaminación ambiental por *C. burnetii* en el entorno de las explotaciones que padecen la infección desde hace varios años, y que muestran un bajo número de animales excretores, es sensiblemente inferior a la hallada en explotaciones que están experimentando un brote de fiebre Q. Sin embargo, a pesar del bajo número de *C. burnetii* en el polvo ambiental, el riesgo de infección existe ya que se han detectado *Coxiellas* viables durante la cuarta paridera en dos de los rebaños ovinos estudiados.
7. Se ha observado una variación temporal de los genotipos de *C. burnetii* que afectan a la población ovina de la CAPV. Los genotipos predominantes son el SNPI y SNP8, que se corresponden con los genotipos MST13 y MST18 respectivamente. En una misma explotación se pueden detectar 2 o 3 genotipos diferentes, situación observada en los rebaños que tienen la práctica de comprar animales.
8. Ninguno de los dos genotipos predominantes en el ganado ovino de la CAPV se han podido asociar, en el transcurso de esta tesis, con porcentajes significativos de abortos. Sin embargo, el genotipo SNPI/MST13 es capaz de causar un elevado número de abortos en el ganado caprino.
9. La prevalencia de ADN de *C. burnetii* en quesos ovinos elaborados con leche cruda está dentro del rango de prevalencias observadas en otros países europeos, y en consonancia con la amplia distribución mundial de la infección por *C. burnetii* en los rumiantes domésticos.
10. El estudio de la viabilidad de *C. burnetii* en muestras de quesos elaborados con leche cruda, procedentes de una explotación ovina que había padecido de forma reciente un brote de fiebre Q, ha mostrado que *C. burnetii* puede permanecer viable a lo largo de todo el periodo de maduración, en condiciones de pH ácido y baja actividad de agua. Estos hallazgos complementan los conocimientos previamente existentes sobre la gran resistencia de *Coxiella* en productos de origen animal.

VII. RESUMEN, SUMMARY, LABURPENA

RESUMEN

La fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial causada por la bacteria *Coxiella burnetii*. Los pequeños rumiantes son los principales reservorios de la infección, y son las especies que se asocian principalmente a los brotes de fiebre Q humana. Por ello, en esta tesis hemos centrado la atención en el estudio de la epidemiología de la infección por *C. burnetii* en estas especies domésticas. Se han realizado cuatro estudios que han intentado alcanzar los objetivos planteados inicialmente. Por un lado, se ha actualizado la información existente sobre la distribución de *C. burnetii* en la población ovina de la CAPV, y se ha comprobado que en un periodo de 10 años no ha habido cambios significativos en la prevalencia. Sin embargo, sí que se ha detectado un cambio temporal de los genotipos predominantes. En este primer estudio se observó cómo algunos rebaños mantenían su positividad a *Coxiella* durante el periodo de estudio (10 años), lo que nos llevó a plantear el segundo estudio, en el que se ha realizado un seguimiento de la infección por *C. burnetii* en cuatro rebaños durante 4 parideras consecutivas. Los resultados han revelado cinéticas diferentes en la población animal de cada rebaño, que ha podido ser consecuencia del momento en que entró inicialmente la infección en cada rebaño, así como de las prácticas de manejo llevadas a cabo en los mismos. Así, la compra de animales puede originar la reactivación de la infección, tal y como se ha visto en este trabajo. Se ha comprobado también como la excreción por vía vaginal y fecal determinan la carga bacteriana ambiental, en aerosoles y polvo respectivamente. Otro resultado relevante ha sido la detección de *Coxiella* viable en el polvo de rebaños durante la cuarta paridera, en cantidad suficiente para propagarse, primero en modelo murino y, posteriormente, en cultivo celular. Así pues, ambos estudios indican que la infección por *C. burnetii* puede permanecer de forma activa en un rebaño durante varios años si no se aplican las medidas de control oportunas.

El impacto de la fiebre Q en la producción animal y en la sanidad humana ha quedado patente en el Estudio 3, en el que un rebaño caprino padeció aproximadamente un 80% de abortos, dando lugar a episodios de fiebre Q entre los trabajadores de la explotación, y entre los visitantes a la misma. La contaminación ambiental por *C. burnetii* originada por los animales abortados a través de placentas, otras excreciones y heces fue muy elevada. Se detectó la presencia de *C. burnetii* viable en el polvo tomado en el periodo álgido de la paridera, pero a los 2, 3 y 4 meses tras la finalización de la paridera ya no se detectó la presencia de bacterias viables en suficiente cantidad como para obtener crecimiento en modelo murino y cultivo celular. Por lo tanto estos resultados son de gran utilidad para hacer recomendaciones relativas al periodo en el que se debe de prohibir la entrada de personal ajeno a una explotación con fiebre Q. Este estudio también mostró que el patrón de infección en la especie caprina es similar al de la

especie ovina, con periodos de excreción de *C. burnetii* prolongados a través de fluidos vaginales y heces, y en menor medida la leche.

Los Estudios 1, 2 y 3 han revelado que los genotipos predominantes en el ganado ovino (SNP1/ MST13 y SNP8/ MST18), y pueden ser compartidos por el ganado caprino, tal y como se ha comprobado en esta tesis y en otros brotes de fiebre Q humanos, ya publicados, y que tuvieron como posible fuente de infección el ganado caprino. Además de estos genotipos predominantes, también se detectaron otros 2 genotipos poco frecuentes en las explotaciones ovinas (SNP4 y SNP5), así como la presencia de 2 o más genotipos diferentes en una misma explotación. En general esta situación se dio en las explotaciones en las que la compra de animales era una práctica habitual.

Por último, la raza Latxa es la principal raza ovina en la CAPV y es de producción lechera, por lo que, el estudio de la viabilidad de *Coxiella burnetii* en los quesos elaborados de forma artesanal con leche cruda ha sido uno de los objetivos de esta tesis. La prevalencia de ADN de *C. burnetii* en quesos de oveja de diferentes orígenes geográficos fue del 30%. El estudio de viabilidad realizado con una selección de quesos positivos por PCR, demostró que *C. burnetii* es una bacteria muy resistente en condiciones de baja actividad de agua y pH ácido, manteniéndose viable a lo largo del periodo de maduración (hasta casi 9 meses). Estos resultados aportan nueva información sobre la persistencia de *C. burnetii* en productos destinados al consumo humano obtenidos en explotaciones que han pasado un brote de fiebre Q de manera reciente. Aunque la infección por vía oral a través de productos contaminados con *C. burnetii* no está plenamente demostrada, el riesgo, aunque bajo, no debe de ignorarse.

Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados de esta tesis, podemos concluir que el ganado ovino y caprino representan un papel importante en el ciclo doméstico de la fiebre Q en la CAPV, por lo que las explotaciones infectadas, en función de la fase de infección en la que se encuentren, pueden suponer un riesgo tanto para para la población animal, como humana. Asimismo, ha quedado de manifiesto la necesidad de la aplicación de medidas de prevención y control para reducir la incidencia de la fiebre Q en la CAPV.

SUMMARY

Q fever is a worldwide distributed zoonosis caused by the bacterium *Coxiella burnetii*. Small ruminants are the main reservoirs of the infection, and they have been primarily associated with Q fever outbreaks in humans. Therefore, this Thesis was focused on the study of the epidemiology of *C. burnetii* infection in these domestic species. Thus, this work gathers the results of four studies that were carried out in order to answer several research questions initially presented. The first study provided updated information about the *C. burnetii* distribution in the ovine population in the Basque Country, and evidenced no significant changes in the prevalence after a 10-year period. However, temporal changes in the predominant genotypes were detected. In this study, some ovine flocks remained positive to *Coxiella* infection during the study period (10 years) that led us to propose the second study, in which *C. burnetii* infection was monitored in four sheep flocks during 4 consecutive lambing seasons. The results revealed different kinetics of infection in the animal population among sheep flocks, possibly due to the time at which the infection initially entered each flock, as well as the management practices implemented in farm. Thus, the purchase of animals may lead to the reactivation of the infection, as seen in this study. It was also proven that vaginal and faecal excretion determined the environmental bacterial load in aerosol and dust, respectively. Another relevant result was the detection of viable *Coxiella* in dust samples collected in farms from the fourth lambing season, at sufficient loads to replicate in a murine model and, later, in cell culture. Therefore, both studies indicated that *C. burnetii* infection can actively remain in a sheep flock during several years if appropriate control measures are not applied.

The impact of Q fever on animal production and human health was highlighted in Study 3, in which a goat herd that suffered approximately an 80% of abortions, led to a Q fever outbreak among farm workers and visitors. The environmental contamination due to *C. burnetii* through placentas, excretion fluids and faeces originated from the aborted animals was very high. Viable *C. burnetii* was detected in dust samples taken during the peak of abortions/parturitions in the lambing season, but levels of viable bacteria able to cause infection in murine model and cell culture were no longer detected at 2,3 and 4 months after the end of the parturitions. Therefore, these results are very useful to make recommendations regarding the period when the entry of non-employees to a farm with Q fever should be restricted. This study also showed that the infection pattern of *C. burnetii* in the caprine species was similar to ovine, with prolonged periods of excretion through vaginal fluids and faeces, and to a lesser extent, through milk.

Studies 1, 2 and 3 identified the predominant genotypes in sheep (SNP1/ MST13 and SNP8/ MST18), and they can be shared with goats, as has been proven in this Thesis and in other human outbreaks of Q fever, already published, and in which the possible source of infection was the caprine. In addition to these predominant genotypes, 2 other genotypes were rarely detected in sheep flocks (SNP4 and SNP5), and the concomitant presence of 2 or more different genotypes in the same farm was also observed. Overall, this situation occurred in those farms where the purchase of animals was a regular practice.

Lastly, Latxa is the main breed of sheep in the Basque Country for dairy production, so the study of the *Coxiella burnetii* viability in cheeses made from raw milk was one of the aims of this Thesis. The prevalence of the *C. burnetii* DNA in cheeses from sheep with different geographical origins was 30%. The viability study carried out with a selection of PCR positive cheeses, demonstrated that *C. burnetii* is highly resistant under conditions of low water activity and acid pH, remaining viable throughout the ripening period (up to almost 9 months). These results provide new information about the persistence of *C. burnetii* in products for human consumption obtained from farms that have recently suffered a Q fever outbreak. Even though the oral infection through contaminated products with *C. burnetii* is not fully demonstrated, the risk, although low, should not be ignored.

Consequently, taking into account the results of this Thesis, we can conclude that sheep and goats play an important role in the domestic cycle of Q fever in the Basque Country. Therefore, infected farms, depending on the phase of infection they are going through, may pose a risk to both the animal and human population. Likewise, the need to apply prevention and control measures to reduce the incidence of Q fever in the Basque Country was highlighted.

LABURPENA

Q sukarra *Coxiella burnetii* bakterioak sortzen duen eta mundo osoan barreiatuak dagoen zoonosia da. Hausnarkari txikiak infekzioaren gordailu nagusi eta batez ere gizakien Q sukarraren agerraldiekin lotzen diren espezieak dira. Honen ondorioz, etxe-abere espezie hauetan *C. burnetii*-ren infekzioaren epidemiologia ikertzea izan da tesi honen helburu nagusia. Erabakitako helburuak betetzeko asmoz lau ikerketa egin dira. Alde batetik, Euskal Autonomia Erkidegoko (EAE) ardi aziendetan dagoen *C. burnetii*-ren intzidentziren informazioa eguneratu da eta 10 urtetan prebalentziaren aldaketa esanguratsurik gertatu ez dela egiaztatu da. Hala eta guztiz ere, denboran zehar genotipo nagusien aldaketa antzeman da. Lehenengo lan honetan, ikertutako denbora tartean (10 urte), artalde batzuk *Coxiella*-ren estatus positiboa mantentzen zutela erreparatu da. Honek bigarren ikerketa antolatzeraz eraman gaitu, bertan lau artalderen elkarren segidako 4 erditze garaien jarraipena egin da. Emaitzek, artalde bakoitzeko animalia populazioan zinetika desberdinak ezagutzera eman dituzte, zinetika hau artalde bakoitzean infekzioaren sarreraren garaia araberakoa izan daiteke, baita hauetan egiten den manejuaren araberakoa ere. Era berean, infekzioaren indarberritzea ekar dezake animalien erosketak, lan honetan jakitera eman den moduan. Gainera inguruneko bakterio kargak, aerosol eta hauts laginetakoak, bagina eta gorozkien bidezko eskrezioren eragina duela egiaztatu da hurrenez hurren. Beste emaitza nabarmenetako bat laugarren erditze garaian jasotako hauts laginetan oraindik *Coxiella* bideragarriak antzematea izan da, barreiatzeko kopuru nahikoan, lehenengo *Muridae* familiako eredueta eta geroago zelulen kultiboetan. Bi ikerketa hauek, artaldeetan kontrol neurri egokiak hartu ezean, *C. burnetii*-ren infekzioak era aktiboan hainbat urte iraun ditzakeela erakutsi dute.

Hirugarren ikerketan gizakien osasunean eta animalien ekoizpenean Q sukarrak izan dezakeen eragina agerikoa izan da, bertan ahuntz-talde batek %80ko ume botatze tasa izan zuen, bertako langileetan eta baita ustialekura joandako bisitarien artean Q sukarrak kasuak sortuz. Ume galtzea izan zuten animalien karearen, gorozkien eta beste eskrezioren bidez sortutako *C. burnetii*-ren ingurunearen kutsadura oso altua izan zen. Erditze garaia punturik gorenean jasotako hauts laginetan *C. burnetii* bideragarriak antzeman ziren kultibo zelularretan eta *Muridae* familiako animaliatan egindako modeluetan, baina erditze garaia bukatu eta 2, 3 eta 4 hilabetetara hartutako hauts laginetan ez zen hazkuntzarik hauteman teknika horiekin. Emaitza hauek laguntza handikoak dira Q sukarra duten ustialekueetan, bertakoak ez diren langile/bisitarien sarreraren debekuaren denbora epearen gomendioak egin ahal izateko. Ikerketa honek erakutsi zuenez ahuntzek ardi-azienden antzeko infekzio ereduak dute, gorotzen

eta fluxu baginalen bidezko *C. burnetii*-ren eskrezio denboraldi luzeekin eta denbora tarte txikiagoan esnearen bidez.

Ardi-aziendetan nagusi diren genotipoak (SNP1/MST13 eta SNP8/MST18) ahuntzekin partekatu daitezkeela jakinarazi dute 1, 2 eta 3 ikerketek, tesian eta gizakien Q sukarraren agerraldietan (dagoeneko argitaratu direnak eta zihurrenik ahutz-aziendak izan dituztenak infekzio iturri) egiaztatu den moduan. Genotipo nagusi hauez gain, ardi ustialekuetan ez ohikoak diren beste 2 genotipo topatu dira (SNP4 eta SNP5), baita 2 genotipo desberdinen edo gehiagoren agerpena ustialeku berdinean. Gehienetan egoera hau animalien erosketa jarduera ohikoa den ustialekuetan gertatu da.

Azkenik, EAE-ko ardi arraza nagusia Latxa ardia izanik eta arraza hau esne ekoizpenerako erabiltzen denez, tesiaren helburuetako bat artisau-eran eta esne gordinarekin egindako gaztetan *Coxiella burnetii*-ren bideragarritasuna ikertzea izan da. Jatorri geografiko desberdineko ardi gazten %30etan antzeman da *C. burnetii*-ren DNA. PCRan positibo ateratako gazten aukeraketa batekin bideragarritasun ikerketa bat egin zen, bertan pH azido eta ur aktibitate baxuko egoeratan oso ondo iraun dezakeen bakterioa dela frogatu da, bideragarri mantenduz gaztaren heltze prozesuan (ia 9 hilabetera arte). Emaitza hauek berriki Q sukarraren agerraldia jasan duten ustialekueetatik lortutako eta gizakiak jateko bideratutako elikagaietan *C. burnetii*-ren iraunkortasunaren inguruko informazioa eranstean dute. Nahiz eta *C. burnetii*-rekin kutsatutako produktuen ondorioz sortutako aho bidezko infekzioa ez dagoen guztiz argi, arriskua, baxua izan arren, ez da alde batera utzi behar.

Hortaz, tesi honetan lortutako emaitzak kontuan izanik, EAEn Q sukarraren etxe-zikloan ahuntz eta ardi abereek duten papera garrantzitsua dela ondorioztatu daiteke. Hori dela eta, ustialeku kutsatuak, aurkitzen diren infekzio garaiaren arabera, animalia eta gizakientzako arriskutsuak izan daitezke. Halaber, garbi dago EAEn Q sukarraren intzidentzia gutxitzeko, beharrezkoa dela kontrol eta prebentzio neurrien ezarpena.

VIII. ANEXOS

ANEXO I: ENVÍO DEL ARTÍCULO/ESTUDIO 2 A LA REVISTA "FRONTIERS IN VETERINARY SCIENCE" (29/03/2020).

---Mensaje original---

De: Frontiers Veterinary Science <veterinaryscience.editorial.office@frontiersin.org>
Enviado: domingo, 29 de marzo de 2020 14:29
Para: Raquel Alvarez Alonso
Asunto: Frontiers: Your manuscript submission - 546679

Dear Dr Alvarez-Alonso,

Frontiers Veterinary Science has sent you a message. Please click 'Reply' to send a direct response

We are pleased to inform you that we have received the manuscript ""Monitoring Coxiella burnetii infection in naturally-infected dairy sheep flocks throughout four lambing seasons and investigation of viable bacteria"" to be considered for publication in Frontiers in Veterinary Science, section Veterinary Infectious Diseases.

You can access the review forum and track the progress of your manuscript using the following link:
<http://www.frontiersin.org/Journal/MySubmission.aspx?stage=100>

If you have already created a Frontiers account using a different email address, please add this one as a secondary email to your Frontiers profile following this link:

<http://loop.frontiersin.org/settings/email>

For any questions on the above, you can contact support@frontiersin.org

You will receive a notification as soon as the interactive review forum is activated and you receive access the review reports. You will then be able to interact directly with the reviewers in the interactive review forum and also re-submit a revised manuscript.

Kind Regards,

Your Frontiers in Veterinary Science team

Frontiers | Editorial Office - Collaborative Peer Review Team
www.frontiersin.org
12 Moorgate,
EC2R 6DA, London, UK
Office T 44 203 5144 082

For technical issues, please contact our IT Helpdesk (support@frontiersin.org) or visit our Frontiers Help Center (zendesk.frontiersin.org/hc/en-us)

-----MANUSCRIPT DETAILS-----

Manuscript title: Monitoring Coxiella burnetii infection in naturally-infected dairy sheep flocks throughout four lambing seasons and investigation of viable bacteria

Manuscript ID: 546679

Submitted By: Ana L. Garcia-Perez

Authors: Raquel Alvarez-Alonso, Ion I. Zendoia, Jesus F. Barandika, Isabel Jado, Ana Hurtado, Ceferino M. López Sánchez, Ana L. Garcia-Perez

Journal: Frontiers in Veterinary Science, section Veterinary Infectious Diseases

Research Topic: The Epidemiology, Diagnosis and Prevention of Infectious Diseases in Livestock

Article type: Original Research

Submitted on: 29 Mar 2020

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdali, F., Hosseinzadeh, S., Berizi, E., Shams, S., 2018. Prevalence of *Coxiella burnetii* in unpasteurized dairy products using nested PCR assay. *Iran J.Microbiol.*, 10 (4): 220-226.
- Abdel-Moein, K.A. and Hamza, D.A., 2018. Rat as an overlooked reservoir for *Coxiella burnetii*: A public health implication. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, 61: 30-33.
- Adzitey, F., Huda, N., Ali, G.R., 2013. Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks. *3 Biotech.*, 3 (2): 97-107.
- Agerholm, J.S., 2013. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals--a critical review. *Acta Vet.Scand.*, 55: 13.
- Alende-Castro, V., Macía-Rodríguez, C., Novo-Veleiro, I., García-Fernández, X., Treviño-Castellano, M., Rodríguez-Fernández, S., González-Quintela, A., 2018. Q fever in Spain: Description of a new series, and systematic review. *PLoS Negl.Trop.Dis.*, 12 (3): e0006338.
- Alonso, E., López-Etxaniz, I., Hurtado, A., Liendo, P., Urbaneja, F., Aspiritxaga, I., Olaizola, J.I. et al., 2015. Q Fever outbreak among workers at a waste-sorting plant. *PLoS One*, 10 (9): e0138817.
- Alonso, E., Eizaguirre, D., López-Etxaniz, I., Olaizola, J.I., Ocabo, B., Barandika, J.F., Jado, I. et al., 2019. A Q fever outbreak associated to courier transport of pets. *PLoS One*, 14 (11): e0225605.
- Álvarez-Alonso, R., Barandika, J.F., Ruíz-Fons, F., Ortega-Araiztegi, I., Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2018a. Stable levels of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy sheep flocks but changes in genotype distribution after a 10-year period in northern Spain. *Acta Vet.Scand.*, 60 (1): 75.
- Álvarez-Alonso, R., Basterretxea, M., Barandika, J.F., Hurtado, A., Idiazabal, J., Jado, I., Beraza, X. et al., 2018b. A Q fever outbreak with a high rate of abortions at a dairy goat farm: *Coxiella burnetii* shedding, environmental contamination, and viability. *Appl.Environ.Microbiol.*, 84 (20): e01650-18.
- 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 (3): 982-988.
- Anastácio, S., Tavares, N., Carolino, N., Sidi-Boumedine, K., da Silva, G.J., 2013. Serological evidence of exposure to *Coxiella burnetii* in sheep and goats in central Portugal. *Vet.Microbiol.*, 167 (3-4): 500-505.
- Anastácio, S., Carolino, N., Sidi-Boumedine, K., da Silva, G.J., 2016. Q Fever Dairy Herd Status Determination Based on Serological and Molecular Analysis of Bulk Tank Milk. *Transbound.Emerg.Dis.*, 63 (2): e293-300.
- Anderson, A.D., Bijlmer, H., Fournier, P.E., Graves, S., Hartzell, J., Kersh, G.J., Limonard, G.J. et al., 2013. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR*, 62 (RR-03): 1-30.
- Anderson, A.D., Szymanski, T.J., Emery, M.P., Kohrs, P.H., Bjork, A.C., Marsden-Haug, N., Nett, R.J. et al., 2015. Epizootiological investigation of a Q fever outbreak and implications for future control strategies. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 247 (12): 1379-1386.
- Angelakis, E. and Raoult, D., 2010. Q fever. *Vet.Microbiol.*, 140 (3-4): 297-309.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet.Res.*, 34 (4): 423-433.
- Arricau-Bouvery, N. and Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet.Res.*, 36 (3): 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 (35): 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H. et al., 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.*, 6: 38.
- Asadi, J., Kafi, M., Khalili, M., 2013. Seroprevalence of Q fever in sheep and goat flocks with a history of abortion in Iran between 2011 and 2012. *Vet Ital.*, 49 (2): 163-168.
- 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 (2): 172-175.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011a. 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 (20): 7405-7407.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011b. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res.Vet.Sci.*, 91 (3): e58-e63.
- Astobiza, I., Barral, M., Ruiz-Fons, F., Barandika, J.F., Gerrikagoitia, X., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2011c. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet.Microbiol.*, 147 (1-2): 190-194.
- Astobiza, I., Ruiz-Fons, F., Piñero, A., Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2012a. Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *J.Dairy Sci.*, 95 (4): 1632-1638.
- Astobiza, I., Tilburg, J.J., Piñero, A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H., 2012b. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. *BMC Vet.Res.*, 8: 241.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2013. Evaluation of the efficacy of oxytetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock. *Vet.J.*, 196 (1): 81-85.
- Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Esteban, C., Gil, H., Escudero, R., Barral, M., Jado, I. et al., 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl.Environ.Microbiol.*, 73 (19): 6166-6171.
- Barandika, J.F., Álvarez-Alonso, R., Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2019. Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk. *Int.J.Food Microbiol.*, 303: 42-45.
- Barlozzari, G., Sala, M., Iacoponi, F., Volpi, C., Polinori, N., Rombola, P., Vairo, F. et al., 2020. Cross-sectional serosurvey of *Coxiella burnetii* in healthy cattle and sheep from extensive grazing system in central Italy. *Epidemiol.Infect.*, 148: e9.
- Bauer, A.E., Olivas, S., Cooper, M., Hornstra, H., Keim, P., Pearson, T., Johnson, A.J., 2015. Estimated herd prevalence and sequence types of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from commercial dairies in Indiana. *BMC Vet.Res.*, 11: 186.

- 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 (7): 2309-2324.
- Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., Williams, K.P. et al., 2009. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect.Immun.*, 77 (2): 642-656.
- Behymer, D.E., 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 (1): 64-70.
- Bellini, C., Magouras, I., Chapuis-Taillard, C., Clerc, O., Masserey, E., Peduto, G., Peter, O. et al., 2014. Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland. *New Microbes New Infect.*, 2 (4): 93-99.
- 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.
- 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 (3-4): 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 (16): 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 (1): 55-60.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J.L., Arricau-Bouvery, N., Russo, P., Pepin, M., Rodolakis, A., 2003. Ovine manure used as a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. *Vet.Rec.*, 153 (9): 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 (23): 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 (17): 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 (1): 47-52.
- Bjork, A., Marsden-Haug, N., Nett, R.J., Kersh, G.J., Nicholson, W., Gibson, D., Szymanski, T. et al., 2014. First reported multistate human Q fever outbreak in the United States, 2011. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 14 (2): 111-117.
- Boarbi, S., Mori, M., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., van Esbroeck, M., Fretin, D., 2014. Prevalence and molecular typing of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk in Belgian dairy goats, 2009-2013. *Vet.Microbiol.*, 170 (1-2): 117-124.
- Boden, K., Wolf, K., Hermann, B., Frangoulidis, D., 2015. First isolation of *Coxiella burnetii* from clinical material by cell-free medium (ACCM2). *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, 34 (5): 1017-1022.

- Bok, J., Hogerwerf, L., Germeraad, E.A., Roest, H.I., Faye-Joof, T., Jeng, M., Nwakanma, D. et al., 2017. *Coxiella burnetii* (Q fever) prevalence in associated populations of humans and small ruminants in The Gambia. *Trop.Med.Int.Health*, 22 (3): 323-331.
- Bond, K.A., Vincent, G., Wilks, C.R., Franklin, L., Sutton, B., Stenos, J., Cowan, R. et al., 2016. One Health approach to controlling a Q fever outbreak on an Australian goat farm. *Epidemiol.Infect.*, 144 (6): 1129-1141.
- 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): 1-5.
- Bontje, D.M., Backer, J.A., Hogerwerf, L., Roest, H.I.J., van Roermund, H.J.W., 2016. Analysis of Q fever in Dutch dairy goat herds and assessment of control measures by means of a transmission model. *Prev.Vet.Med.*, 123: 71-89.
- Boschini, A., Di, P.G., Legnani, D., Fabbri, P., Ballarini, P., Zucconi, R., Boros, S. et al., 1999. Consecutive epidemics of Q fever in a residential facility for drug abusers: impact on persons with human immunodeficiency virus infection. *Clin.Infect.Dis.*, 28 (4): 866-872.
- Brooke, R.J., Kretzschmar, M.E., Muters, N.T., Teunis, P.F., 2013. Human dose response relation for airborne exposure to *Coxiella burnetii*. *BMC Infect.Dis.*, 13: 488.
- Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J., 1996. A dog-related outbreak of Q fever. *Clin.Infect.Dis.*, 23 (4): 753-755.
- Buyse, M., Plantard, O., McCoy, K.D., Duron, O., Menard, C., 2019. Tissue localization of *Coxiella*-like endosymbionts in three European tick species through fluorescence in situ hybridization. *Ticks Tick Borne Dis.*, 10 (4): 798-804.
- 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 (3): 196-201.
- Camuset, P. and Remmy, D., 2008. Q Fever (*Coxiella burnetii*) eradication in a dairy herd by using vaccination with a phase I vaccine. *XXV World Buiatrics Congress: 6-11 July 2008; Budapest (Hungary)*. pp. 80-81.
- Candela, M.G., Caballol, A., Atance, P.M., 2017. Wide exposure to *Coxiella burnetii* in ruminant and feline species living in a natural environment: zoonoses in a human-livestock-wildlife interface. *Epidemiol.Infect.*, 145 (3): 478-481.
- Canevari, J.T., Firestone, S.M., Vincent, G., Campbell, A., Tan, T., Muleme, M., Cameron, A.W. et al., 2018. The prevalence of *Coxiella burnetii* shedding in dairy goats at the time of parturition in an endemically infected enterprise and associated milk yield losses. *BMC Vet.Res.*, 14 (1): 353.
- Cangelosi, G.A. and Meschke, J.S., 2014. Dead or alive: molecular assessment of microbial viability. *Appl.Environ.Microbiol.*, 80 (19): 5884-5891.
- Capuano, F., Mancusi, A., Casalnuovo, F., Perugini, A., Proroga, Y., Guarino, A., Berri, M., 2012. Real-time PCR-based detection of *Coxiella burnetii* in cheeses. *Eur.Food Res.Technol.*, 235 (6): 1181-1186.
- 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 (1): 33-35.
- Cardinale, E., Esnault, O., Beral, M., Naze, F., Michault, A., 2014. Emergence of *Coxiella burnetii* in ruminants on Reunion Island? Prevalence and risk factors. *PLoS Negl.Trop.Dis.*, 8 (8): e3055.

- Carrié, P., Barry, S., Rousset, E., de, C.R., Sala, C., Calavas, D., Perrin, J.B. et al., 2019. Swab cloths as a tool for revealing environmental contamination by Q fever in ruminant farms. *Transbound. Emerg. Dis.*, 66 (3): 1202-1209.
- 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 (3): 468-473.
- 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 (2): 276-278.
- Chitanga, S., Simulundu, E., Simuunza, M.C., Changula, K., Qiu, Y., Kajihara, M., Nakao, R. et al., 2018. First molecular detection and genetic characterization of *Coxiella burnetii* in Zambian dogs and rodents. *Parasit. Vectors*, 11 (1): 40.
- Cilla, G., Montes, M., Pérez-Trallero, E., 2008. Q fever in the Netherlands - what matters is seriousness of disease rather than quantity. *Euro Surveill.*, 13 (37): pii=18975.
- Clark, N.J. and Soares Magalhaes, R.J., 2018. Airborne geographical dispersal of Q fever from livestock holdings to human communities: a systematic review and critical appraisal of evidence. *BMC Infect. Dis.*, 18 (1): 218.
- 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 (21): 7344-7352.
- Courcoul, A., Hogerwerf, L., Klinkenberg, D., Nielen, M., Vergu, E., Beaudreau, F., 2011. Modelling effectiveness of herd level vaccination against Q fever in dairy cattle. *Vet. Res.*, 42 (1): 68.
- Cruz, R., Esteves, F., Vasconcelos-Nobrega, C., Santos, C., Ferreira, A.S., Mega, C., Coelho, A.C. et al., 2018a. A Nationwide Seroepidemiologic Study on Q Fever Antibodies in Sheep of Portugal. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 18 (11): 601-604.
- Cruz, R., Esteves, F., Vasconcelos-Nobrega, C., Santos, C., Ferreira, A.S., Mega, C., Coelho, A.C. et al., 2018b. Outbreaks of abortions by *Coxiella burnetii* in small ruminant flocks and a longitudinal serological approach on archived bulk tank milk suggest Q fever emergence in Central Portugal. *Transbound. Emerg. Dis.*, 65 (4): 972-975.
- D'Amato, F., Rouli, L., Edouard, S., Tyczka, J., Million, M., Robert, C., Nguyen, T.T. et al., 2014. The genome of *Coxiella burnetii* Z3055, a clone linked to the Netherlands Q fever outbreaks, provides evidence for the role of drift in the emergence of epidemic clones. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 37 (5-6): 281-288.
- D'Amato, F., Eldin, C., Raoult, D., 2016. The contribution of genomics to the study of Q fever. *Future Microbiol.*, 11 (2): 253-272.
- Dal Pozzo, F., Renaville, B., Martinelle, L., Renaville, R., Thys, C., Smeets, F., Kirschvink, N. et al., 2016. Single Nucleotide Polymorphism Genotyping and Distribution of *Coxiella burnetii* Strains from Field Samples in Belgium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82 (1): 81-86.
- Davis, G.E. and Cox, H.R., 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Health Rep.*, 53: 2259-2267.
- Davoust, B., Marie, J.L., Pommier, d.S., V, Berenger, J.M., Edouard, S., Raoult, D., 2014. Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.*, 20 (10): 1760-1761.

- Davoust, B., Marié, J.L., Tahir, D., Dahmani, M., Dufour, P., Thiéry, R., Rousset, E., 2019. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in dogs from Southeastern France. *Int.J.Infect.Dis.*, 79: 122.
- de Bruin, A., 2011. Detection of *Coxiella burnetii* by (q) PCR: a comparison of available assays. National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), The Netherlands. <https://www.ela-europe.org/assets/detection-of-coxiella-burnetii-using-q-pcr.pdf>
- de Bruin, A., de Groot, A., de Heer, L., Bok, J., Hamans, M., van Rotterdam, B.J., Wielinga, P.R. et al., 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 (18): 6516-6523.
- de Bruin, A., van der Plaats, R.Q., de Heer, L., Paauwe, R., Schimmer, B., Vellema, P., van Rotterdam, B.J. et al., 2012. Detection of *Coxiella burnetii* DNA on small-ruminant farms during a Q fever outbreak in the Netherlands. *Appl.Environ.Microbiol.*, 78 (6): 1652-1657.
- de Bruin, A., Janse, I., Koning, M., de Heer, L., van der Plaats, R.Q., van Leuken, J.P., van Rotterdam, B.J., 2013. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in the environment during and after a large Q fever epidemic in the Netherlands. *J.Appl.Microbiol.*, 114 (5): 1395-1404.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicolle, P., Ribaud, D., David, V. et al., 2012a. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 64 (1): 120-122.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicolle, P., Ribaud, D., David, V. et al., 2012b. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 64 (1): 104-106.
- de Rooij, M.M., Borlee, F., Smit, L.A., de B.A., Janse, I., Heederik, D.J., Wouters, I.M., 2016. Detection of *Coxiella burnetii* in Ambient Air after a Large Q Fever Outbreak. *PLoS One*, 11 (3): e0151281.
- Delgado Naranjo, J., Alonso Fustel, E., Aspritzaga Gamarra, I., Ezpeleta-Lobato, G., Muniozgueren Agirre, N., 2011. Study and management of a Q fever outbreak among machine tool workers in the Basque country (Spain). *Epidemiol.Res.Int.*, Article ID 136946, 5 pps.
- Denison, A.M., Thompson, H.A., Massung, R.F., 2007. ISIII insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiol.*, 7: 91.
- Desjardins, I., Joulié, A., Pradier, S., Lecollinet, S., Beck, C., Vial, L., Dufour, P. et al., 2018. Seroprevalence of horses to *Coxiella burnetii* in an Q fever endemic area. *Vet.Microbiol.*, 215: 49-56.
- Dijkstra, F., van der Hoek, W., Wijers, N., Schimmer, B., Rietveld, A., Wijkmans, C.J., Vellema, P. et al., 2012. The 2007-2010 Q fever epidemic in The Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 64 (1): 3-12.
- Dolce, P., Belanger, M.J., Tumanowicz, K., Gauthier, C.P., Jutras, P., Masse, R., Montpetit, C. et al., 2003. *Coxiella burnetii* seroprevalence of shepherds and their flocks in the lower Saint-Lawrence River region of Quebec, Canada. *Can.J.Infect.Dis.*, 14 (2): 97-102.
- Dorko, E., Pilipcinec, E., Rimarova, K., Kostovcikova, J., 2010. Serological study of Q fever in sheep in the territory of Eastern Slovakia. *Ann.Agric.Environ.Med.*, 17 (2): 323-325.
- Duncan, C., Kersh, G.J., Spraker, T., Patyk, K.A., Fitzpatrick, K.A., Massung, R.F., Gelatt, T., 2012. *Coxiella burnetii* in northern fur seal (*Callorhinus ursinus*) placentas from St. Paul Island, Alaska. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 12 (3): 192-195.

- Dupuis, G., Petite, J., Peter, O., Vouilloz, M., 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *Int.J.Epidemiol.*, 16 (2): 282-287.
- Duron, O., Binetruy, F., Noel, V., Cremaschi, J., McCoy, K.D., Arnathau, C., Plantard, O. et al., 2017. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol.Ecol.*, 26 (11): 2905-2921.
- Ebani, V.V., Rocchigiani, G., Nardoni, S., Bertelloni, F., Vasta, V., Papini, R.A., Verin, R. et al., 2017. Molecular detection of tick-borne pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. *Acta Trop.*, 172: 197-200.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on Q fever. *EFSA J.*, 8 (5): 1595.
- EFSA and ECDC, 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.*, 17 (12): 243-247.
- Eldin, C., Angelakis, E., Renvoise, A., Raoult, D., 2013. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 88 (4): 765-769.
- Eldin, C., Melenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.L. et al., 2017. From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clin.Microbiol.Rev.*, 30 (1): 115-190.
- Espejo, E., Gil-Díaz, A., Oteo, J.A., Castillo-Rueda, R., García-Álvarez, L., Santana-Baez, S., Bella, F., 2014. Clinical presentation of acute Q fever in Spain: seasonal and geographical differences. *Int.J.Infect.Dis.*, 26: 162-164.
- Etayo, I., Pérez Elortondo, F.J., Gil, P.F., Albisu, M., Virto, M., Conde, S., Rodríguez Barrón, L.J. et al., 2006. Hygienic quality, lipolysis and sensory properties of Spanish Protected Designation of Origin ewe's milk cheeses manufactured with lamb rennet paste. *Lait*, 86 (6): 415-434.
- Ezatkhah, M., Alimolaei, M., Khalili, M., Sharifi, H., 2015. Seroepidemiological study of Q fever in small ruminants from Southeast Iran. *J.Infect.Public Health*, 8 (2): 170-176.
- Fenollar, F. and Raoult, D., 2004. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS*, 112 (11-12): 785-807.
- Fernández-Aguilar, X., Cabezón, Ó., Colom-Cadena, A., Lavín, S., López-Olvera, J.R., 2016. Serological survey of *Coxiella burnetii* at the wildlife-livestock interface in the Eastern Pyrenees, Spain. *Acta Vet.Scand.*, 58: 26.
- Field, P.R., Mitchell, J.L., Santiago, A., Dickeson, D.J., Chan, S.W., Ho, D.W., Murphy, A.M. et al., 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 (4): 1645-1647.
- Filioussis, G., Theodoridis, A., Papadopoulou, D., Gelasakis, A.I., Vouraki, S., Bramis, G., Arsenos, G., 2017. Serological prevalence of *Coxiella burnetii* in dairy goats and ewes diagnosed with adverse pregnancy outcomes in Greece. *Ann.Agric.Enviro.Med.*, 24 (4): 702-705.
- Fishbein, D.B. and 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 (1): 35-40.
- Flint, J., Dalton, C.B., Merritt, T.D., Graves, S., Ferguson, J.K., Osbourn, M., Eastwood, K. et al., 2016. Q fever and contact with kangaroos in New South Wales. *Commun.Dis Intell.Q.Rep.*, 40 (2): E202-E203.
- Fournier, P.E., Marrie, T.J., Raoult, D., 1998. Diagnosis of Q fever. *J.Clin.Microbiol.*, 36 (7): 1823-1834.
- Fournier, P.E. and Raoult, D., 2003. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J.Clin.Microbiol.*, 41 (11): 5094-5098.

- Frangoulidis, D., Spletstoesser, W.D., Landt, O., Dehnhardt, J., Henning, K., Hilbert, A., Bauer, T. et al., 2013. Microevolution of the chromosomal region of acute disease antigen A (*adaA*) in the query (Q) fever agent *Coxiella burnetii*. *PLoS One*, 8 (1): e53440.
- Frentzel, H., Menrath, A., Tomuzia, K., Braeunig, J., Appel, B., 2013. Decontamination of high-risk animal and zoonotic pathogens. *Biosecur.Bioterror.*, 11(Suppl 1): S102-S114.
- Fretz, R., Schaaeren, W., Tanner, M., Baumgartner, A., 2007. Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *Int.J.Food Microbiol.*, 116 (3): 414-418.
- Fujishiro, M.A., Scorza, A.V., Gookin, J.L., Lappin, M.R., 2016. Evaluation of associations among *Coxiella burnetii* and reproductive abnormalities in cats. *J.Feline Med.Surg.*, 18 (4): 344-347.
- Gale, P., Kelly, L., Mearns, R., Duggan, J., Snary, E.L., 2015. Q fever through consumption of unpasteurised milk and milk products - a risk profile and exposure assessment. *J.Appl.Microbiol.*, 118 (5): 1083-1095.
- Galiero, A., Fratini, F., Camma, C., Di, D.M., Curini, V., Baronti, I., Turchi, B. et al., 2016. Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: Screening and genotyping. *Int.J.Food Microbiol.*, 237: 47-54.
- García de Cruz, S., Aldea-Mansilla, C., Nebreda, T., Campos, A., 2010. Family outbreak of Q fever. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.*, 28 (5): 326-327.
- García-Pérez, A.L., Astobiza, I., Barandika, J.F., Atxaerandio, R., Hurtado, A., Juste, R.A., 2009. Investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *J.Dairy Sci.*, 92 (4): 1581-1584.
- Genova-Kalou, P., Vladimirova, N., Stoitsova, S., Krumova, S., Kurchatova, A., Kantardjiev, T., 2019. Q fever in Bulgaria: Laboratory and epidemiological findings on human cases and outbreaks, 2011 to 2017. *Euro Surveill.*, 24 (37): pii=1900119.
- Georgiev, M., Afonso, A., Neubauer, H., Needham, H., Thiery, R., Rodolakis, A., Roest, H. et al., 2013. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill.*, 18 (8): pii=20407.
- Gilsdorf, A., Kroh, C., Grimm, S., Jensen, E., Wagner-Wiening, C., Alpers, K., 2008. Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiol.Infect.*, 136 (8): 1084-1087.
- Giménez, D.F., 1964. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Technol.*, 39: 135-140.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N. et al., 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg.Infect.Dis.*, 11 (8): 1211-1217.
- González, J., González, M.G., Valcárcel, F., Sánchez, M., Martín-Hernández, R., Tercero, J.M., Olmeda, A.S., 2020. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Legionellales: Coxiellaceae) Infection Among Wildlife Species and the Tick *Hyalomma lusitanicum* (Acari: Ixodidae) in a Meso-Mediterranean Ecosystem. *J.Med.Entomol.*, 57 (2): 551-556.
- González-Barrio, D., Maio, E., Vieira-Pinto, M., Ruiz-Fons, F., 2015a. European Rabbits as Reservoir for *Coxiella burnetii*. *Emerg.Infect.Dis.*, 21 (6): 1055-1058.
- González-Barrio, D., Almería, S., Caro, M.R., Salinas, J., Ortiz, J.A., Gortázar, C., Ruiz-Fons, F., 2015b. *Coxiella burnetii* Shedding by Farmed Red Deer (*Cervus elaphus*). *Transbound.Emerg.Dis.*, 62 (5): 572-574.

- González-Barrio, D., Hagen, F., Tilburg, J.J., Ruiz-Fons, F., 2016. *Coxiella burnetii* Genotypes in Iberian Wildlife. *Microb.Ecol.*, 72 (4): 890-897.
- González-Barrio, D. and Ruiz-Fons, F., 2019. *Coxiella burnetii* in wild mammals: A systematic review. *Transbound.Emerg.Dis.*, 66 (2): 662-671.
- Gouriet, F., Fenollar, F., Patrice, J.Y., Drancourt, M., Raoult, D., 2005. Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. *J.Clin.Microbiol.*, 43 (10): 4993-5002.
- 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 (7): E070719.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Ledoux, D., Le Drean, E., Seegers, H., 2007. Risk of false-negative results when delaying PCR from sampling for *Coxiella burnetii* detection in dairy cows. *Revue Méd.Vét.*, 158 (12): 641-644.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine*, 26 (34): 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 (1-2): 1-16.
- Gurtler, L., Bauerfeind, U., Blumel, J., Burger, R., Drosten, C., Groner, A., Heiden, M. et al., 2014. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *Transfus.Med.Hemother.*, 41 (1): 60-72.
- Gyuranecz, M., Sulyok, K., Balla, E., Mag, T., Balazs, A., Simor, Z., Denes, B. et al., 2014. Q fever epidemic in Hungary, April to July 2013. *Euro Surveill.*, 19 (30).
- 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 (8279): 1004-1006.
- Hartley, M.G., Ralph, E., Norville, I.H., Prior, J.L., Atkins, T.P., 2019. Comparison of PCR and Viable Count as a Method for Enumeration of Bacteria in an A/J Mouse Aerosol Model of Q Fever. *Front.Microbiol.*, 10.
- Hatchette, T., Hudson, R.C., Schleich, W.F., Campbell, N.A., Hatchette, J.E., Ratnam, S., Raoult, D. et al., 2001. Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerg.Infect.Dis.*, 7 (3): 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 (5): 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 (1): 11-15.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6 (10): 986-994.
- Heinzen, R.A., 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.
- Hellenbrand, W., Breuer, T., Petersen, L., 2001. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg.Infect.Dis.*, 7 (5): 789-796.
- Hemsley, C.M., O'Neill, P.A., Essex-Lopresti, A., Norville, I.H., Atkins, T.P., Titball, R.W., 2019. Extensive genome analysis of *Coxiella burnetii* reveals limited evolution within genomic groups. *BMC Genomics*, 20 (1): 441.

- Hendrix, L.R., Samuel, J.E., Mallavia, L.P., 1991. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J.Gen.Microbiol.*, 137 (2): 269-276.
- 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(R). *Vaccine*, 29 (15): 2653-2656.
- Herremans, T., Hogema, B.M., Nabuurs, M., Peeters, M., Wegdam-Blans, M., Schneeberger, P., Nijhuis, C. et al., 2013. Comparison of the performance of IFA, CFA, and ELISA assays for the serodiagnosis of acute Q fever by quality assessment. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.*, 75 (1): 16-21.
- Higgins, D. and Marrie, T.J., 1990. Seroepidemiology of Q fever among cats in New Brunswick and Prince Edward Island. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 590: 271-274.
- Hirai, A., Nakama, A., Chiba, T., Kai, A., 2012. Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in cheese samples. *J.Vet.Med.Sci.*, 74 (2): 175-180.
- Hirschmann, J.V., 2019. The Discovery of Q Fever and Its Cause. *Am.J.Med.Sci.*, 358 (1): 3-10.
- Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D. et al., 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, the Netherlands. *Emerg.Infect.Dis.*, 17 (3): 379-386.
- Hogerwerf, L., Borlee, F., Still, K., Heederik, D., van, R.B., de, B.A., Nielen, M. et al., 2012. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in inhalable airborne dust samples from goat farms after mandatory culling. *Appl.Environ.Microbiol.*, 78 (15): 5410-5412.
- Honarmand, H., 2012. Q Fever: an old but still a poorly understood disease. *Interdiscip.Perspect.Infect.Dis.*, Article ID 131932, 8 pps.
- Hoover, T.A., Vodkin, M.H., Williams, J.C., 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J.Bacteriol.*, 174 (17): 5540-5548.
- 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 (5): 924-931.
- Hornstra, H.M., Priestley, R.A., Georgia, S.M., Kachur, S., Birdsell, D.N., Hilsabeck, R., Gates, L.T. et al., 2011. Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One*, 6 (11): e26201.
- 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 a *Coxiella burnetii* during a Q Fever outbreak in The Netherlands. *Appl.Environ.Microbiol.*, 77 (6): 2051-2057.
- Hurtado, A., Alonso, E., Aspritzaga, I., López, E., I, Ocabo, B., Barandika, J.F., Fernández-Ortiz de Murúa JI et al., 2017. Environmental sampling coupled with real-time PCR and genotyping to investigate the source of a Q fever outbreak in a work setting. *Epidemiol.Infect.*, 145 (9): 1834-1842.
- Jado, I., Carranza-Rodríguez, C., Barandika, J.F., Toledo, A., García-Amil, C., Serrano, B., Bolaños, M. et al., 2012. Molecular method for the characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. *BMC Microbiol.*, 12 (1): 91.
- Jager, C., Willems, H., Thiele, D., Baljer, G., 1998. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol.Infect.*, 120 (2): 157-164.
- Jager, C., Lautenschlager, S., Willems, H., Baljer, G., 2002. *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpHI are closely related and likely identical. *Vet.Microbiol.*, 89 (2-3): 161-166.

- Jia, Y., 2012. *Real-Time PCR*. Methods in Cell Biology. Elsevier Inc., pp. 55-68.
- Jones, R.M., Nicas, M., Hubbard, A.E., Reingold, A.L., 2006. The infectious dose of *Coxiella burnetii* (Q fever). *Appl.Biosaf.*, 11 (1): 32-41.
- Joulié, A., Laroucau, K., Bailly, X., Prigent, M., Gasqui, P., Lepetitcolin, E., Blanchard, B. et al., 2015. Circulation of *Coxiella burnetii* in a Naturally Infected Flock of Dairy Sheep: Shedding Dynamics, Environmental Contamination, and Genotype Diversity. *Appl.Environ.Microbiol.*, 81 (20): 7253-7260.
- Joulié, A., Rousset, E., Gasqui, P., Lepetitcolin, E., Leblond, A., Sidi-Boumedine, K., Jourdain, E., 2017a. *Coxiella burnetii* Circulation in a Naturally Infected Flock of Sheep: Individual Follow-Up of Antibodies in Serum and Milk. *Appl.Environ.Microbiol.*, 83 (13).
- Joulié, A., Sidi-Boumedine, K., Bailly, X., Gasqui, P., Barry, S., Jaffrelo, L., Poncet, C. et al., 2017b. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability. *Infect Genet.Evol.*, 48: 142-149.
- Karcher, S., 1995. *Polymerase Chain Reaction*. Molecular Biology. Academic Press, ed., Elsevier Inc., pp. 215-227.
- Keer, J.T. and Birch, L., 2003. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J.Microbiol.Methods*, 53 (2): 175-183.
- Kennerman, E., Rousset, E., Golcu, E., Dufour, P., 2010. Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, 33 (1): 37-45.
- Kersh, G.J., Lambourn, D.M., Self, J.S., Akmajian, A.M., Stanton, J.B., Baszler, T.V., Raverty, S.A. et al., 2010a. *Coxiella burnetii* infection of a Steller sea lion (*Eumetopias jubatus*) found in Washington State. *J.Clin.Microbiol.*, 48 (9): 3428-3431.
- Kersh, G.J., Wolfe, T.M., Fitzpatrick, K.A., Candee, A.J., Oliver, L.D., Patterson, N.E., Self, J.S. et al., 2010b. Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States, 2006 to 2008. *Appl.Environ.Microbiol.*, 76 (13): 4469-4475.
- Kersh, G.J., Oliver, L.D., Self, J.S., Fitzpatrick, K.A., Massung, R.F., 2011. Virulence of Pathogenic *Coxiella burnetii* Strains After Growth in the Absence of Host Cells. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11 (11): 1433-1438.
- Kersh, G.J., Lambourn, D.M., Raverty, S.A., Fitzpatrick, K.A., Self, J.S., Akmajian, A.M., Jeffries, S.J. et al., 2012. *Coxiella burnetii* infection of marine mammals in the Pacific Northwest, 1997-2010. *J.Wildl.Dis.*, 48 (1): 201-206.
- Kersh, G.J., Fitzpatrick, K.A., Self, J.S., Priestley, R.A., Kelly, A.J., Lash, R.R., Marsden-Haug, N. et al., 2013. Presence and persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Appl.Environ.Microbiol.*, 79 (5): 1697-1703.
- Kersh, G.J., Priestley, R.A., Hornstra, H.M., Self, J.S., Fitzpatrick, K.A., Biggerstaff, B.J., Keim, P. et al., 2016. Genotyping and Axenic Growth of *Coxiella burnetii* Isolates Found in the United States Environment. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 16 (9): 588-594.
- Khalili, M. and Sakhaee, E., 2009. An update on a serologic survey of Q Fever in domestic animals in Iran. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 80 (6): 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 (4): 619-621.

- Kittelberger, R., Mars, J., Wibberley, G., Sting, R., Henning, K., Horner, G.W., Garnett, K.M. et al., 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 (5): 262-268.
- Klaasen, M., Roest, H.J., van der Hoek, W., Goossens, B., Secka, A., Stegeman, A., 2014. *Coxiella burnetii* seroprevalence in small ruminants in The Gambia. *PLoS One*, 9 (1).
- 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.
- Knobel, D.L., Maina, A.N., Cutler, S.J., Ogola, E., Feikin, D.R., Junghae, M., Halliday, J.E. et al., 2013. *Coxiella burnetii* in humans, domestic ruminants, and ticks in rural western Kenya. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 88 (3): 513-518.
- Komiya, T., Sadamasu, K., Kang, M.I., Tsuboshima, S., Fukushi, H., Hirai, K., 2003a. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infections among cats in different living environments. *J.Vet.Med.Sci.*, 65 (9): 1047-1048.
- Komiya, T., Sadamasu, K., Toriniwa, H., Kato, K., Arashima, Y., Fukushi, H., Hirai, K. et al., 2003b. Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *J.Infect.Chemother.*, 9 (2): 151-155.
- Korbie, D.J. and Mattick, J.S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat.Protoc.*, 3 (9): 1452-1456.
- Korner, S., Makert, G.R., Mertens-Scholz, K., Henning, K., Pfeffer, M., Starke, A., Nijhof, A.M. et al., 2020. Uptake and fecal excretion of *Coxiella burnetii* by *Ixodes ricinus* and *Dermacentor marginatus* ticks. *Parasit.Vectors*, 13 (1): 75.
- Kosatsky, T., 1984. Household outbreak of Q-fever pneumonia related to a parturient cat. *Lancet*, 2 (8417-8418): 1447-1449.
- Kovacova, E., Kazar, J., Simkova, 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 (12): 867-869.
- Kuley, R., Smith, H.E., Frangoulidis, D., Smits, M.A., Jan Roest, H.I., Bossers, A., 2015. Cell-free propagation of *Coxiella burnetii* does not affect its relative virulence. *PLoS One*, 10 (3): e0121661.
- Kuley, R., Smith, H.E., Janse, I., Harders, F.L., Baas, F., Schijlen, E., Nabuurs-Franssen, M.H. et al., 2016. First Complete Genome Sequence of the Dutch Veterinary *Coxiella burnetii* Strain NL3262, Originating from the Largest Global Q Fever Outbreak, and Draft Genome Sequence of Its Epidemiologically Linked Chronic Human Isolate NLhu3345937. *Genome Announc.*, 4 (2): e00245-16.
- La Scola B. and Raoult, D., 2001. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin.Microbiol.Infect.*, 7 (2): 75-79.
- Lagier, J.C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., Raoult, D., 2015. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin.Microbiol.Rev.*, 28 (1): 208-236.
- Lang, G., Waltner-Toews, D., Menzies, P., 1991. The seroprevalence of coxiellosis (Q fever) in Ontario sheep flocks. *Can.J.Vet.Res.*, 55 (2): 139-142.
- Lang, G.H., 1988. Serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in dairy goat herds in Ontario. A comparison of two methods of enzyme-linked immunosorbent assay. *Can.J.Vet.Res.*, 52 (1): 37-41.

- Langley, J.M., Marrie, T.J., Covert, A., Waag, D.M., Williams, J.C., 1988. Poker players' pneumonia. An urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *N.Engl.J.Med.*, 319 (6): 354-356.
- Lockhart, M., Islam, A., Graves, S., Fenwick, S., Stenos, J., 2012. Detecting and measuring small numbers of viable *Coxiella burnetii*. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 64 (1): 61-65.
- Lockhart, M.G., Islam, A., Fenwick, S.G., Graves, S.R., Stenos, J., 2013. Growth Yields of Four *Coxiella burnetii* Isolates in Four Different Cell Culture Lines. *Adv.Microbiol.*, 3 (01): 88-90.
- Loftis, A.D., Priestley, R.A., Massung, R.F., 2010. Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne Pathog.Dis.*, 7 (12): 1453-1456.
- Long, C.M., Beare, P.A., Cockrell, D.C., Larson, C.L., Heinzen, R.A., 2019. Comparative virulence of diverse *Coxiella burnetii* strains. *Virulence.*, 10 (1): 133-150.
- 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 (7): 199-204.
- Ma, G.C., Norris, J.M., Mathews, K.O., Chandra, S., Slapeta, J., Bosward, K.L., Ward, M.P., 2020. New insights on the epidemiology of *Coxiella burnetii* in pet dogs and cats from New South Wales, Australia. *Acta Trop.*, 205: 105416.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M., Weinstein, R.A., 2003. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect.Dis.*, 3 (11): 709-721.
- Magouras, I., Hunninghaus, J., Scherrer, S., Wittenbrink, M.M., Hamburger, A., Stark, K.D., Schupbach-Regula, G., 2017. *Coxiella burnetii* Infections in Small Ruminants and Humans in Switzerland. *Transbound.Emerg Dis*, 64 (1): 204-212.
- Marenzoni, M.L., Stefanetti, V., Papa, P., Casagrande, P.P., Bietta, A., Coletti, M., Passamonti, F. et al., 2013. Is the horse a reservoir or an indicator of *Coxiella burnetii* infection? Systematic review and biomolecular investigation. *Vet Microbiol.*, 167 (3-4): 662-669.
- Mares-Guia, M.A.M.M., Guterres, A., Rozental, T., Ferreira, M.D.S., Lemos, E.R.S., 2018. Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element ISIII associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. *Braz.J.Microbiol.*, 49 (1): 138-143.
- Marrie, T.J., van Buren, J., Fraser, J., Haldane, E.V., Faulkner, R.S., Williams, J.C., Kwan, C., 1985. Seroepidemiology of Q fever among domestic animals in Nova Scotia. *Am.J.Public Health*, 75 (7): 763-766.
- Marrie, T.J., MacDonald, A., Durant, H., Yates, L., McCormick, L., 1988a. An outbreak of Q fever probably due to contact with a parturient cat. *Chest*, 93 (1): 98-103.
- Marrie, T.J., Durant, H., Williams, J.C., Mintz, E., Waag, D.M., 1988b. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *J.Infect.Dis.*, 158 (1): 101-108.
- Marrie, T.J., Langille, D., Papukna, V., Yates, L., 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 (1): 119-127.
- Marrie, T.J., 1990. Q fever - a review. *Can.Vet.J.*, 31 (8): 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 (5): 613-615.

- Martinov, S., 2007. Contemporary state of the problem Q fever in Bulgaria. *Biotechnol.Biotechnol.Equip.*, 21 (3): 353.
- 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 (3-4): 301-305.
- Massung, R.F., Cutler, S.J., Frangoulidis, D., 2012. Molecular Typing of *Coxiella burnetii* (Q Fever). *Adv.Exp.Med.Biol.*, 984: 381-396.
- Maurin, M. and Raoult, D., 1999. Q fever. *Clin.Microbiol.Rev.*, 12 (4): 518-553.
- Mazurek, G.H., Reddy, V., Marston, B.J., Haas, W.H., Crawford, J.T., 1996. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *J.Clin.Microbiol.*, 34 (10): 2386-2390.
- McCaughey, C., Murray, L.J., McKenna, J.P., Menzies, F.D., McCullough, S.J., O'Neill, H.J., Wyatt, D.E. et al., 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol.Infect.*, 138 (1): 21-27.
- McCaul, T.F. and Williams, J.C., 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J.Bacteriol.*, 147 (3): 1063-1076.
- McCaul, T.F., Banerjee-Bhatnagar, N., Williams, J.C., 1991. Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect.Immun.*, 59 (9): 3243-3253.
- Meadows, S., Jones-Bitton, A., McEwen, S., Jansen, J., Menzies, P., 2015. *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in goats in Ontario, Canada. *Prev.Vet.Med.*, 121 (3-4): 199-205.
- Medic, A., Dzelalija, B., Punda, P., V, Gjenero, M., I, Turkovic, B., Gilic, V., 2005. Q fever epidemic among employees in a factory in the suburb of Zadar, Croatia. *Croat.Med.J.*, 46 (2): 315-319.
- Meiklejohn, G., Reimer, L.G., Graves, P.S., Helmick, C., 1981. Cryptic epidemic of Q fever in a medical school. *J.Infect.Dis.*, 144 (2): 107-113.
- Melenotte, C., Caputo, A., Bechah, Y., Lepidi, H., Terras, J., Kowalczywska, M., Di, P.F. et al., 2019. The hypervirulent *Coxiella burnetii* Guiana strain compared in silico, *in vitro* and *in vivo* to the Nine Mile and the German strain. *Clin.Microbiol.Infect.*, 25 (9): 1155.
- Meredith, A.L., Cleaveland, S.C., Denwood, M.J., Brown, J.K., Shaw, D.J., 2015. *Coxiella burnetii* (Q-Fever) Seroprevalence in Prey and Predators in the United Kingdom: Evaluation of Infection in Wild Rodents, Foxes and Domestic Cats Using a Modified ELISA. *Transbound.Emerg.Dis.*, 62 (6): 639-649.
- Milborrow, S., 2019. rpart.plot: Plot 'rpart' Models: An Enhanced Version of 'plot.rpart'. R package version 3.0.8. <https://CRAN.R-project.org/package=rpart.plot>
- Millar, J.A., Beare, P.A., Moses, A.S., Martens, C.A., Heinzen, R.A., Raghavan, R., 2017. Whole-Genome Sequence of *Coxiella burnetii* Nine Mile RSA439 (Phase II, Clone 4), a Laboratory Workhorse Strain. *Genome Announc.*, 5 (23): e00471-17.
- Miller, H.K., Priestley, R.A., Kersh, G.J., 2020. Transmission of *Coxiella burnetii* by ingestion in mice. *Epidemiol.Infect.*, 148: e21.
- Minnick, M.F. and Raghavan, R., 2011. Genetics of *Coxiella burnetii*: on the path of specialization. *Future Microbiol.*, 6 (11): 1297-1314.
- 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.

- Mori, M., Boarbi, S., Michel, P., Bakinahe, R., Rits, K., Wattiau, P., Fretin, D., 2013. *In vitro* and *in vivo* infectious potential of *Coxiella burnetii*: a study on Belgian livestock isolates. *PLoS One*, 8 (6): e67622.
- Mori, M., Mertens, K., Cutler, S.J., Santos, A.S., 2017. Critical Aspects for Detection of *Coxiella burnetii*. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 17 (1): 33-41.
- Mori, M. and Roest, H.J., 2018. Farming, Q fever and public health: agricultural practices and beyond. *Arch.Public Health*, 76: 2.
- Muema, J., Thumbi, S.M., Obonyo, M., Wanyoike, S., Nanyingi, M., Osoro, E., Bitek, A. et al., 2017. Seroprevalence and Factors Associated with *Coxiella burnetii* Infection in Small Ruminants in Baringo County, Kenya. *Zoonoses Public Health*, 64 (7): e31-e43.
- Muleme, M., Campbell, A., Stenos, J., Devlin, J.M., Vincent, G., Cameron, A., Graves, S. et al., 2017. A longitudinal study of serological responses to *Coxiella burnetii* and shedding at kidding among intensively-managed goats supports early use of vaccines. *Vet.Res.*, 48 (1): 50.
- 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 (3): 79.
- 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. and Hirai, K., 1999. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol.Lett.*, 180 (2): 249-254.
- Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper, A.K., 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J.Microbiol.Methods*, 67 (2): 310-320.
- Nusinovici, S., Hoch, T., Widgren, S., Joly, A., Lindberg, A., Beaudeau, F., 2014. Relative contributions of neighbourhood and animal movements to *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle herds. *Geospat.Health*, 8 (2): 471-477.
- Obaidat, M.M. and Kersh, G.J., 2017. Prevalence and Risk Factors of *Coxiella burnetii* Antibodies in Bulk Milk from Cattle, Sheep, and Goats in Jordan. *J.Food Prot.*, 80 (4): 561-566.
- OIE, 2018. OIE Terrestrial Manual:Q fever (Chapter 3.1.16). https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.16_Q_FEVER.pdf
- Olivas, S., Hornstra, H., Priestley, R.A., Kaufman, E., Hepp, C., Sonderegger, D.L., Handady, K. et al., 2016. Massive dispersal of *Coxiella burnetii* among cattle across the United States. *Microb.Genom.*, 2 (8): e000068.
- Omsland, A., Cockrell, D.C., Howe, D., Fischer, E.R., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F. et al., 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 106 (11): 4430-4434.
- Omsland, A., Beare, P.A., Hill, J., Cockrell, D.C., Howe, D., Hansen, B., Samuel, J.E. et al., 2011. Isolation from animal tissue and genetic transformation of *Coxiella burnetii* are facilitated by an improved axenic growth medium. *Appl.Environ.Microbiol.*, 77 (11): 3720-3725.
- Omsland, A., 2012. Axenic growth of *Coxiella burnetii*. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 984: 215-229.

- 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.
- Oyston, P.C. and Davies, C., 2011. Q fever: the neglected biothreat agent. *J.Med.Microbiol.*, 60 (Pt 1): 9-21.
- 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 (2): 60-61.
- Pandit, P., Hoch, T., Ezanno, P., Beaudeau, F., Vergu, E., 2016. Spread of *Coxiella burnetii* between dairy cattle herds in an enzootic region: modelling contributions of airborne transmission and trade. *Vet.Res.*, 47: 48.
- Pape, M., Bouzalas, E.G., Koptopoulos, G.S., Mandraveli, K., Arvanitidou-Vagiona, M., Nikolaidis, P., Alexiou-Daniel, S., 2009. The serological prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and goats in northern Greece. *Clin.Microbiol.Infect.*, 15(Suppl 2): 146-147.
- Parisi, A., Fracalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Capuano, F. et al., 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Vet.Microbiol.*, 118 (1-2): 101-106.
- Parker, N.R., Barralet, J.H., Bell, A.M., 2006. Q fever. *Lancet*, 367 (9511): 679-688.
- Pascual, V.F., Borobio Enciso, M.V., González, L.Z., Carrascosa, P.M., 1996. Clinical presentation of acute Q fever in lanzarote (Canary Islands): a 2-year prospective study. *Scand.J.Infect.Dis.*, 28 (5): 533-534.
- Pascual-Velasco, F., 2010. *Coxiella burnetii* Infections in domestic ruminants in Canary Islands (Spain). *Transbound.Emerg.Dis.*, 57 (6): 464.
- Pearson, T., Hornstra, H.M., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Olivas, S.M., Birdsell, D.M., Hall, C.M. et al., 2014. High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. *BMC Microbiol.*, 14: 41.
- Pérez-Arellano, J.L., Carranza-Rodríguez, C., Gutiérrez, C., Bolaños, M., 2018. Epidemiología de la fiebre Q en España (2018). *Rev.Esp.Quimioter.*, 31 (5): 386-405.
- Pexara, A., Solomakos, N., Govaris, A., 2018. Q fever and seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants. *Vet.Ital.*, 54 (4): 265-279.
- Piñero, A., Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2014a. Evaluation of *Coxiella burnetii* status in dairy cattle herds with bulk-tank milk positive by ELISA and PCR. *Transbound.Emerg.Dis.*, 61 (2): 163-168.
- Piñero, A., Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2014b. Progression of *Coxiella burnetii* infection after implementing a two-year vaccination program in a naturally infected dairy cattle herd. *Acta Vet.Scand.*, 56 (1): 47.
- Piñero, A., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Barandika, J.F., Atxaerandio, R., García-Pérez, A.L., 2014c. Changes in the dynamics of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle: An approach to match field data with the epidemiological cycle of *C. burnetii* in endemic herds. *J.Dairy Sci.*, 97 (5): 2718-2730.
- Piñero, A., Barandika, J.F., García-Pérez, A.L., Hurtado, A., 2015. Genetic diversity and variation over time of *Coxiella burnetii* genotypes in dairy cattle and the farm environment. *Infect.Genet.Evol.*, 31: 231-235.

- Pinsky, R.L., Fishbein, D.B., Greene, C.R., Gensheimer, K.F., 1991. An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *J.Infect.Dis.*, 164 (1): 202-204.
- Plummer, P.J., McClure, J.T., Menzies, P., Morley, P.S., van den Brom, R., Van Metre, D.C., 2018. Management of *Coxiella burnetii* infection in livestock populations and the associated zoonotic risk: A consensus statement. *J.Vet Intern.Med.*, 32 (5): 1481-1494.
- Porten, K., Rissland, J., Tigges, A., Broll, S., Hopp, W., Lunemann, M., van Treeck, U. et al., 2006. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infect.Dis.*, 6: 147.
- Porter, S.R., Czaplicki, G., Mainil, J., Guatteo, R., Saegerman, C., 2011. Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int.J.Microbiol.*, 2011: 248418.
- Psaroulaki, A., Hadjichristodoulou, C., Loukaides, F., Soteriades, E., Konstantinidis, A., Papastergiou, P., Ioannidou, M.C. et al., 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 (9): 576-586.
- Psaroulaki, A., Chochlakakis, D., Angelakis, E., Ioannou, I., Tselentis, Y., 2014. *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 108 (10): 625-631.
- R Core Team, 2019. A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/>
- Rahaman, M.R., Milazzo, A., Marshall, H., Bi, P., 2019. Is a One Health Approach Utilized for Q Fever Control? A Comprehensive Literature Review. *Int.J.Environ.Res Public Health*, 16 (5).
- Rahimi, E., Doosti, A., Ameri, M., Kabiri, E., Sharifian, B., 2010. Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. *Zoonoses Public Health*, 57 (7-8): e38-e41.
- 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 (8): 512.
- Raoult, D., Vestris, G., Enea, M., 1990. Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *J.Clin.Microbiol.*, 28 (11): 2482-2484.
- Reichel, R., Mearns, R., Brunton, L., Jones, R., Horigan, M., Vipond, R., Vincent, G. et al., 2012. Description of a *Coxiella burnetii* abortion outbreak in a dairy goat herd, and associated serology, PCR and genotyping results. *Res.Vet.Sci.*, 93 (3): 1217-1224.
- Reimer, L.G., 1993. Q fever. *Clin.Microbiol.Rev.*, 6 (3): 193-198.
- Reusken, C.B., van der Plaats, R.Q., 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 (1-2): 124-130.
- Rizzo, F., Vitale, N., Ballardini, M., Borromeo, V., Luzzago, C., Chiavacci, L., Mandola, M.L., 2016. Q fever seroprevalence and risk factors in sheep and goats in northwest Italy. *Prev.Vet.Med.*, 130: 10-17.
- Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C., Blanchard, B. et al., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J.Dairy Sci.*, 90 (12): 5352-5360.
- 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 (1-2): 66-67.

- Roest, H.I., Tilburg, J.J., van der Hoek, W., Vellema, P., van Zijderveld, F.G., Klaassen, C.H., Raoult, D., 2011a. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol.Infect.*, 139 (1): 1-12.
- Roest, H.I., Ruuls, R.C., Tilburg, J.J., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H., Vellema, P., van den Brom, R. et al., 2011b. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg.Infect.Dis.*, 17 (4): 668-675.
- Roest, H.I., Bossers, A., van Zijderveld, F.G., Rebel, J.M., 2013a. Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *Vet.Q.*, 33 (3): 148-160.
- Roest, H.I., Post, J., van Gelderen, B., van Zijderveld, F.G., Rebel, J.M., 2013b. Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. *Vet.Res.*, 44 (1): 67.
- Roest, H.J., van Gelderen, B., Dinkla, A., Frangoulidis, D., van Zijderveld, F.G., Rebel, J., van Keulen, L., 2012. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One*, 7 (11): e48949.
- Rousset, E., Durand, B., Berri, M., Dufour, P., Prigent, M., Russo, P., Delcroix, T. et al., 2007. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet.Microbiol.*, 124 (3-4): 286-297.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A. et al., 2009a. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl.Environ.Microbiol.*, 75 (2): 428-433.
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M. et al., 2009b. Efficiency of a phase I vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin.Microbiol.Infect.*, 15(Suppl 2): 188-189.
- Rowbotham, T.J., 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J.Clin.Pathol.*, 33 (12): 1179-1183.
- Ruiz Tellez, A., Muñiz 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.
- Ruiz-Fons, F., Rodríguez, O., Torina, A., Naranjo, V., Gortázar, C., de la, F.J., 2008. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet.Microbiol.*, 126 (1-3): 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 (10): 1631-1636.
- Ruiz-Fons, F., 2017. A Review of the Current Status of Relevant Zoonotic Pathogens in Wild Swine (*Sus scrofa*) Populations: Changes Modulating the Risk of Transmission to Humans. *Transbound.Emerg.Dis.*, 64 (1): 68-88.
- Ryan, E., Kirby, M., Clegg, T., Collins, D.M., 2011. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and goats in the Republic of Ireland. *Vet.Rec.*, 169 (11): 280.

- Saglam, A.G. and Sahin, M., 2016. *Coxiella burnetii* in samples from cattle herds and sheep flocks in the Kars region of Turkey. *Vet.Med.*, 61 (1): 17-22.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. et al., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487-491.
- Sakhaee, E. and Khalili, M., 2010. The first serologic study of Q fever in sheep in Iran. *Trop.Anim.Health Prod.*, 42 (7): 1561-1564.
- Salinas-Meléndez, J.A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., Fimbres-Durazo, H., 2002. Serologic survey in animals of Q fever in Nuevo Leon. *Rev.Latinoam.Microbiol.*, 44 (2): 75-78.
- Samuel, J.E., Frazier, M.E., Mallavia, L.P., 1985. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect.Immun.*, 49 (3): 775-779.
- Sandoz, K.M., Popham, D.L., Beare, P.A., Sturdevant, D.E., Hansen, B., Nair, V., Heinzen, R.A., 2016. Transcriptional Profiling of *Coxiella burnetii* Reveals Extensive Cell Wall Remodeling in the Small Cell Variant Developmental Form. *PLoS One*, 11 (2).
- Santoro, D., Giura, R., Colombo, M.C., Antonelli, P., Gramegna, M., Gandola, O., Gridavilla, G., 2004. Q fever in Como, Northern Italy. *Emerg.Infect.Dis.*, 10 (1): 159-160.
- 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 (4): 279-293.
- Schets, F.M., de Heer, L., de Roda Husman, A.M., 2013. *Coxiella burnetii* in sewage water at sewage water treatment plants in a Q fever epidemic area. *Int.J.Hyg.Envirn.Health*, 216 (6): 698-702.
- Schimmer, B., Luttikholt, S., Hautvast, J.L., Graat, E.A., Vellema, P., Duynhoven, Y.T., 2011. Seroprevalence and risk factors of Q fever in goats on commercial dairy goat farms in the Netherlands, 2009-2010. *BMC Vet.Res.*, 7: 81.
- Schimmer, B., Lenferink, A., Schneeberger, P., Aangenend, H., Vellema, P., Hautvast, J., van, D.Y., 2012. Seroprevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) seropositivity in dairy goat farmers' households in The Netherlands, 2009-2010. *PLoS One*, 7 (7).
- Schimmer, B., de Lange, M.M., Hautvast, J.L., Vellema, P., van Duynhoven, Y.T., 2014a. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors on commercial sheep farms in The Netherlands. *Vet.Rec.*, 175 (1): 17.
- Schimmer, B., Schotten, N., van, E.E., Hautvast, J.L., Schneeberger, P.M., van Duijnhoven, Y.T., 2014b. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk for humans on dairy cattle farms, the Netherlands, 2010-2011. *Emerg.Infect.Dis.*, 20 (3): 417-425.
- Schleenvoigt, B.T., Sprague, L.D., Mertens, K., Moog, U., Schmoock, G., Wolf, G., Neumann, M. et al., 2015. Acute Q fever infection in Thuringia, Germany, after burial of roe deer fawn cadavers (*Capreolus capreolus*): a case report. *New Microbes New Infect.*, 8: 19-20.
- Schneeberger, P.M., Hermans, M.H., van Hannen, E.J., Schellekens, J.J., Leenders, A.C., Wever, P.C., 2010. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clin.Vaccine Immunol.*, 17 (2): 286-290.
- Schneeberger, P.M., Wintenberger, C., van der Hoek, W., Stahl, J.P., 2014. Q fever in the Netherlands - 2007-2010: what we learned from the largest outbreak ever. *Med.Mal.Infect.*, 44 (8): 339-353.

- Scott, G.H. and Williams, J.C., 1990. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 590: 291-296.
- Scrimgeour, E.M., Al-Ismaily, 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.
- Sekeyova, Z., Roux, V., Raoult, D., 1999. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *comI* and *mucZ* sequence comparison. *FEMS Microbiol.Lett.*, 180 (1): 61-67.
- Selim, A., Ali, A.F., Moustafa, S.M., Ramadan, E., 2018. Molecular and serological data supporting the role of Q fever in abortions of sheep and goats in northern Egypt. *Microb.Pathog.*, 125: 272-275.
- Selvaggi, T.M., Rezza, G., Scagnelli, M., Rigoli, R., Rattu, M., De Lalla, F., Pellizzer, G.P. et al., 1996. Investigation of a Q-fever outbreak in Northern Italy. *Eur.J.Epidemiol.*, 12 (4): 403-408.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L. et al., 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 100 (9): 5455-5460.
- Shapiro, A.J., Bosward, K.L., Heller, J., Norris, J.M., 2015. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domesticated and feral cats in eastern Australia. *Vet.Microbiol.*, 177 (1-2): 154-161.
- Shi, M., Zhang, C., Stewart, D., 2018. Quantitation of viable *Coxiella burnetii* in milk products using a liquid medium-based MPN-PCR assay. *J.Dairy Res.*, 85 (4): 482-486.
- Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Fernandes, I., Marro, S., Thiery, R., 2009. Evaluation of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Coxiella burnetii* ruminant strains isolated in France. *Clin.Microbiol.Infect.*, 15(Suppl 2): 194-195.
- Sidi-Boumedine, K. and Rousset, E., 2011. Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. *Euroreference*, 5: 30-37.
- Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Prigent, M., Yang, E., Joulié, A., Thiery, R., Rousset, E., 2015. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. *Microbes Infect.*, 17 (11-12): 789-794.
- Signs, K.A., Stobierski, M.G., Gandhi, T.N., 2012. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011. *Clin.Infect.Dis.*, 55 (10): 1387-1389.
- Smith, C.B., Evavold, C., Kersh, G.J., 2019. The Effect of pH on Antibiotic Efficacy against *Coxiella burnetii* in Axenic Media. *Sci.Rep.*, 9 (1): 18132.
- Soltau, J.B., Einax, E., Klengel, K., Katholm, J., Failing, K., Wehrend, A., Donat, K., 2017. Within-herd prevalence thresholds for herd-level detection of mastitis pathogens using multiplex real-time PCR in bulk tank milk samples. *J.Dairy Sci.*, 100 (10): 8287-8295.
- Sondgeroth, K.S., Davis, M.A., Schlee, S.L., Allen, A.J., Evermann, J.F., McElwain, T.F., Baszler, T.V., 2013. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Washington State domestic goat herds. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 13 (11): 779-783.
- Souza, E.A.R., Castro, E.M.S., Oliveira, G.M.B., Azevedo, S.S., Peixoto, R.M., Labruna, M.B., Horta, M.C., 2018. Serological diagnosis and risk factors for *Coxiella burnetii* in goats and sheep in a semi-arid region of Northeastern Brazil. *Rev.Bras.Parasitol.Vet.*, 27 (4): 514-520.
- Splino, M., Beran, J., Chlibek, R., 2003. Q fever outbreak during the Czech Army deployment in Bosnia. *Mil.Med.*, 168 (10): 840-842.

- Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Loukaides, F., Antoniou, M., Hadjichristodolou, 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 (1): 86-90.
- Stein, A. and Raoult, D., 1993. Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microb.Pathog.*, 15 (3): 177-185.
- Stevenson, S., Gowardman, J., Tozer, S., Woods, M., 2015. Life-threatening Q fever infection following exposure to kangaroos and wallabies. *BMJ Case Rep.*, 2015.
- Stewart, D., Shieh, Y.C., Tortorello, M., Kukreja, A., Shazer, A., Schlessner, J., 2015. Quantitation of viable *Coxiella burnetii* in milk using an integrated cell culture-polymerase chain reaction (ICC-PCR) assay. *J.Dairy Res.*, 82 (4): 478-484.
- Sting, R., Molz, K., Philipp, W., Bothe, F., Runge, M., Ganter, M., 2013. Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats. *Vet.Microbiol.*, 167 (3-4): 600-608.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol.Lett.*, 254 (2): 268-274.
- Szymanska-Czerwinska, M., Jodelko, A., Iuta, M., Owalik, S., Iemczuk, K., 2017. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* among domestic ruminants and horses in Poland. *Acta Virol.*, 61 (3): 369-371.
- Tatsumi, N., Baumgartner, A., Qiao, Y., Yamamoto, I., Yamaguchi, K., 2006. Detection of *Coxiella burnetii* in market chicken eggs and mayonnaise. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1078: 502-505.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows. *Vet.Microbiol.*, 159 (3-4): 432-437.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Lehebel, A., Joly, A., Beaudeau, F., 2014. Vaccination using phase I vaccine is effective to control *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy cattle herds. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, 37 (1): 1-9.
- Tellez, 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 (4): 444-446.
- Therneau, T. and Atkinson, B., 2019. rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees. R package version 4.1-15. <https://CRAN.R-project.org/package=rpart>
- Thiele, D., Willems, H., Kopf, 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 (4): 419-425.
- Thiele, D. and Willems, H., 1994. Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in 'acute' and 'chronic' isolates still valid? *Eur.J.Epidemiol.*, 10 (4): 427-434.
- Tigertt, W.D., Benenson, A.S., Gochenour, W.S., 1961. Airborne Q fever. *Bacteriol.Rev.*, 25: 285-293.
- Tilburg, J.J., Roest, H.J., Buffet, S., Nabuurs-Franssen, M.H., Horrevorts, A.M., Raoult, D., Klaassen, C.H., 2012. Epidemic genotype of *Coxiella burnetii* among goats, sheep, and humans in the Netherlands. *Emerg.Infect.Dis.*, 18 (5): 887-889.
- Tissot-Dupont, H., Thirion, X., Raoult, D., 1994. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.*, 1 (2): 189-196.

- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am.J.Epidemiol.*, 150 (1): 67-74.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg.Infect.Dis.*, 10 (7): 1264-1269.
- Tissot-Dupont, H. and Raoult, D., 2008. Q fever. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, 22 (3): 505-514.
- 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 (7): 859-861.
- To, H., Sakai, R., Shirota, K., Kano, C., Abe, S., Sugimoto, T., Takehara, K. et al., 1998b. Coxiellosis in domestic and wild birds from Japan. *J.Wildl.Dis.*, 34 (2): 310-316.
- Tokarevich, N.K., Panferova, Y.A., Freylikhman, O.A., Blinova, O.V., Medvedev, S.G., Mironov, S.V., Grigoryeva, L.A. et al., 2019. *Coxiella burnetii* in ticks and wild birds. *Ticks Tick Borne Dis.*, 10 (2): 377-385.
- Topcuoglu, N., Paltura, C., Kulekci, M., Ustek, D., Kulekci, G., 2013. Real-time polymerase chain reaction versus conventional PCR: A comparison between two methods for the detection of *Fusobacterium nucleatum* in saliva, nasopharyngeal secretion and middle ear effusion samples. *Biotechnol.Biotechnol.Equip.*, 27 (3): 3825-3828.
- Trmcic, A., Ralyea, R., Meunier-Goddik, L., Donnelly, C., Glass, K., D'Amico, D., Meredith, E. et al., 2017. Consensus categorization of cheese based on water activity and pH-A rational approach to systemizing cheese diversity. *J.Dairy Sci.*, 100 (1): 841-847.
- Vaidya, V.M., Malik, S.V., 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 (4): 307-321.
- Valkova, D. and Kazar, J., 1995. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol.Lett.*, 125 (2-3): 275-280.
- van Asseldonk, M.A., Prins, J., Bergevoet, R.H., 2013. Economic assessment of Q fever in the Netherlands. *Prev.Vet.Med.*, 112 (1-2): 27-34.
- van Asseldonk, M.A., Bontje, D.M., Backer, J.A., Roermund, H.J., Bergevoet, R.H., 2015. Economic aspects of Q fever control in dairy goats. *Prev.Vet Med.*, 121 (1-2): 115-122.
- van den Brom, R., van, E.E., Luttikholt, S., Moll, L., van, M.K., Vellema, P., 2012. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from dairy goat and dairy sheep farms in The Netherlands in 2008. *Vet.Rec.*, 170 (12): 310.
- van den Brom, R., Moll, L., van, S.G., Vellema, P., 2013. Demography of Q fever seroprevalence in sheep and goats in The Netherlands in 2008. *Prev.Vet.Med.*, 109 (1-2): 76-82.
- van den Brom, R., van, E.E., Roest, H.I., van der Hoek, W., Vellema, P., 2015a. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet.Microbiol.*, 181 (1-2): 119-129.
- van den Brom, R., Santman-Berends, I., Luttikholt, S., Moll, L., van, E.E., Vellema, P., 2015b. Bulk tank milk surveillance as a measure to detect *Coxiella burnetii* shedding dairy goat herds in the Netherlands between 2009 and 2014. *J.Dairy Sci.*, 98 (6): 3814-3825.
- van den Brom, R., Roest, H.J., de, B.A., Dercksen, D., Santman-Berends, I., van der Hoek, W., Dinkla, A. et al., 2015c. A probably minor role for land-applied goat manure in the transmission of *Coxiella burnetii* to humans in the 2007-2010 Dutch Q fever outbreak. *PLoS One*, 10 (3): e0121355.

- van der Hoek, W., Morroy, G., Renders, N.H., Wever, P.C., Hermans, M.H., Leenders, A.C., Schneeberger, P.M., 2012. Epidemic q Fever in humans in the Netherlands. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 984: 329-364.
- van Schaik, E.J. and Samuel, J.E., 2012. Phylogenetic diversity, virulence and comparative genomics. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 984: 13-38.
- van Woerden, H.C., Mason, B.W., Nehaul, L.K., Smith, R., Salmon, R.L., Healy, B., Valappil, M. et al., 2004. Q fever outbreak in industrial setting. *Emerg.Infect.Dis.*, 10 (7): 1282-1289.
- Varela-Castro, L., Zuddas, C., Ortega, N., Serrano, E., Salinas, J., Castella, J., Castillo-Contreras, R. et al., 2018. On the possible role of ticks in the eco-epidemiology of *Coxiella burnetii* in a Mediterranean ecosystem. *Ticks Tick Borne Dis.*, 9 (3): 687-694.
- Villagra-Blanco, R., Esquivel-Suárez, A., Wagner, H., Romero-Zúñiga, J.J., Taubert, A., Wehrend, A., Hermosilla, C. et al., 2018. Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii*-, *Neospora caninum*- and *Coxiella burnetii*-infections in dairy goat flocks from Costa Rica. *Vet.Parasitol.Reg.Stud.Reports.*, 14: 79-84.
- Villari, S., Galluzzo, P., Arnone, M., Alfano, M., Geraci, F., Chiarenza, G., 2018. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection (Q fever) in sheep farms located in Sicily (Southern Italy) and related risk factors. *Small rumin.res.*, 164: 82-86.
- Vranakis, I., Kokkini, S., Yachnakis, E., Tselentis, Y., Chochlakis, D., Psaroulaki, A., 2020. Q fever in Greece: Findings of a 13 years surveillance study. *Comp.Immunol.Microbiol.Infect.Dis.*, 69: 101340.
- Walter, M.C., Ohrman, C., Myrtennas, K., Sjodin, A., Bystrom, M., Larsson, P., Macellaro, A. et al., 2014. Genome sequence of *Coxiella burnetii* strain Namibia. *Stand.Genomic.Sci.*, 9: 22.
- Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L. et al., 1989. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J.Bacteriol.*, 171 (8): 4202-4206.
- Whelan, J., Schimmer, B., de, B.A., van Beest Holle, M.R., van der Hoek, W., Ter, S.R., 2012. Visits on 'lamb-viewing days' at a sheep farm open to the public was a risk factor for Q fever in 2009. *Epidemiol.Infect.*, 140 (5): 858-864.
- Willems, H., Ritter, M., Jager, C., Thiele, D., 1997. Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* Scurry Q217. *J.Bacteriol.*, 179 (10): 3293-3297.
- Wilson, L.E., Couper, S., Prempeh, H., Young, D., Pollock, K.G., Stewart, W.C., Browning, L.M. et al., 2010. Investigation of a Q fever outbreak in a Scottish co-located slaughterhouse and cutting plant. *Zoonoses Public Health*, 57 (7-8): 493-498.
- Woldehiwet, Z., 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res.Vet.Sci.*, 77 (2): 93-100.
- Zahid, M.U., Hussain, M.H., Saqib, M., Neubauer, H., Abbas, G., Khan, I., Mansoor, M.K. et al., 2016. Seroprevalence of Q Fever (Coxiellosis) in Small Ruminants of Two Districts in Punjab, Pakistan. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis*, 16 (7): 449-454.
- Zemtsova, G.E., Montgomery, M., Levin, M.L., 2015. Relative sensitivity of conventional and real-time PCR assays for detection of SFG *Rickettsia* in blood and tissue samples from laboratory animals. *PLoS One*, 10 (1): e0116658.
- Zeng, D., Chen, Z., Jiang, Y., Xue, F., Li, B., 2016. Advances and Challenges in Viability Detection of Foodborne Pathogens. *Front.Microbiol.*, 7.

- Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1997. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*comI*) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiol.Immunol.*, 41 (11): 871-877.
- Zhang, G.Q., Nguyen, S.V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Kim, H.J. et al., 1998. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *J.Clin.Microbiol.*, 36 (1): 77-80.
- Zhang, G.Q., To, H., Russell, K.E., Hendrix, L.R., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K. et al., 2005a. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect.Immun.*, 73 (3): 1561-1567.
- Zhang, J., Wen, B., Chen, M., Zhang, J., Niu, D., 2005b. 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.

X. AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

No sé cómo, pero han pasado casi 4 años desde que llegué a vivir a Derio. Este tiempo ha pasado rápido, pero a la vez lento. Nunca sé si esa sensación es buena o mala. Supongo que buena porque eso es que lo has disfrutado y te ha cundido, pero a la vez mala porque te das cuenta que los años vuelan. Estos agradecimientos no son solamente agradecimientos de tesis, son de vida. Porque cuando comencé la tesis, comencé también un cambio de etapa y de vida, cambiando de comunidad autónoma, de idioma, de gente, de costumbres, por lo que tengo mucho que agradecer.

Gracias en primer lugar a mi directora de tesis, Ana L. García Pérez por haberme dado la oportunidad de formarme en el campo de la fiebre Q, y por ayudarme tanto a lo largo de estos cuatro años, especialmente en el sprint final de la tesis. Gracias por dedicarme tantas horas de tu tiempo, a pesar de todas tus ocupaciones, y por ayudarme a mejorar más y más esta tesis. Sin tu ayuda no lo habría conseguido.

También estoy muy agradecida al grupo de participantes del proyecto de fiebre Q, Jesse Barandika, Ana Hurtado, Inés Povedano y Ion I. Zendoia, y a otros compañeros/as del laboratorio de Diagnóstico del Departamento de Sanidad de NEIKER, en especial a Itziar del Pozo y a Gorka Aduriz. Todos vosotros me habéis ayudado en las tareas de campo, en el laboratorio, en las infecciones experimentales o en la elaboración de los artículos de esta tesis. Vuestra ayuda ha sido fundamental en este trabajo de tesis.

A INIA-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, por financiar el proyecto RTA2013-00051-C02-01, origen de esta tesis, y por facilitar el contrato predoctoral asociado a este proyecto y del cual he sido beneficiaria.

También tengo que agradecer la oportunidad que me ha dado INIA de realizar estancias de formación nacionales en el Laboratorio de Referencia e Investigación en Patógenos Especiales del Instituto de Salud Carlos III, bajo la dirección de la Dra. Isabel Jado, así como tres estancias internacionales. He tenido la suerte de experimentar en diferentes aspectos de la fiebre Q en tres instituciones diferentes, en el Instituto de Microbiología de la Universidad de Erlangen (Alemania) bajo la dirección de la Dra. Anja Lührmann, en el Bundeswehr Institute of Microbiology de Munich (Alemania), bajo la dirección del Dr. Dimitrios Frangoulidis, y finalmente, en el CDC-Center for Disease Control and Prevention, de Atlanta (EEUU), bajo la dirección del Dr. Gilbert Kersh. A todos mis supervisores os doy las gracias por todo el tiempo que me habéis dedicado y por la formación recibida, en especial a la Dra. Isabel Jado, por enseñarme todo lo que se sabe sobre el genotipado de *Coxiella*.

El Departamento de Desarrollo Económico e Infraestructuras del Gobierno Vasco, al cual pertenece NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, merece una mención especial. Gracias por crear las infraestructuras y por proporcionar los medios necesarios que hacen posible que éste y otros trabajos de tesis se lleven a cabo. Gracias también a Joseba Garrido, Jefe del Departamento de Sanidad Animal de NEIKER, por la supervisión cercana que ha realizado del desarrollo de la tesis a lo largo de estos cuatro años, y por todos sus consejos.

Al Servicio de Ganadería de la Diputación Foral de Bizkaia por proporcionar las autorizaciones necesarias para llevar a cabo los trabajos experimentales llevados a cabo en esta tesis. Muchísimas gracias también a Mariví Geijó, por facilitar siempre el trabajo, dentro y fuera de las instalaciones BSL3 de NEIKER.

A los compañeros/as de la Unidad de Epidemiología de la Subdirección de Salud Pública de Bizkaia, perteneciente al Departamento de Salud del Gobierno Vasco, y en especial a la Dra. Eva Alonso Fustel, que nos ha

dado la oportunidad a lo largo de estos años de participar en la investigación de tres brotes humanos de fiebre Q, de los cuales he aprendido las lecciones de cómo trabajar dentro del concepto *One Health*.

Un papel fundamental en esta tesis lo han tenido los cinco ganaderos que nos han abierto las puertas de sus explotaciones para tomar muestras a lo largo de estos años. Sin su interés en la fiebre Q y sin su colaboración, este trabajo no hubiera sido posible. Muchas gracias. También agradezco la colaboración de Artzai Gazta, que organizó el muestreo y envió de muestras del primer estudio de esta tesis. Gracias a todos por vuestro interés y ayuda desinteresada.

Gracias también al Programa de Doctorado de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la UPV/EHU por haberme aceptado en el programa, y por toda la dedicación y ayuda recibida por parte de mi tutora, la Dra. Lucilia Madariaga.

Y ahora va la parte más extensa de mis agradecimientos:

Además de agradecer a la Dra. Isabel Jado el haberme acogido en su grupo para realizar mis estancias nacionales, quiero agradecerles de todo corazón, tanto a ella como a Manuela Rodríguez, el haberme dedicado ambas todo su tiempo, tan valioso como el del resto, mientras que yo estaba allí para enseñarme todo lo que sabían en genotipado de *C. burnetii* además de viabilidad en cultivos celulares. Gracias también a todo su grupo, el que me acogió como una más desde el primer minuto, lo que hizo que les cogiera un cariño enorme desde el primer día. Habéis sido una parte importante y fundamental en este periodo. Tanta estancia a Madrid, que ahora se echa de menos ir a la “capi”. Gracias también a mis amigos del bus de Madrid a Majadahonda, por amenizar los viajes.

Por otro lado, tres de las experiencias más importantes de mi vida a nivel profesional y personal. Mis estancias tanto en Erlangen y Munich en Alemania, como mi estancia en Estados Unidos. Me disculparéis si dedico unas palabras en su idioma (alemán e inglés) para que lo puedan comprender:

Ich bin Frau Dr. Anja Lührmann vom Mikrobiologischen Institut des Universitätsklinikums Erlangen sowie Herr Dr. Dimitrios Frangoulidis vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München zu tiefstem Dank verpflichtet. Ich möchte mich auch bei den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern beider Zentren (Jan Schulze-Lührmann, Martha Ölke, Andrea Helbich, Claudia Kahlhofer, Lidia Chitimia-Dobler...) für ihre Unterstützung bedanken. Thank you to Dr. Gilbert Kersh from the CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta), his research group (Rachael Priestley, Halie Miller, Cody Smith, Tracy y Lynnette) and the rest of the people of the Division of Vector-Borne Diseases. Thank you to all of the research groups for having given me the opportunity to work in laboratories abroad, improving my knowledge in this manner about *Coxiella burnetii*, and to teach me new techniques and ways to work. It has been a big effort for all of us, but I hope it has a good effect in my future. It has already been important in my personal life.

Thanks also to the people (PhD students, medical doctors,...) who I met in Erlangen and Atlanta. When I arrived in Erlangen, they included me in their group like if I had been friend of them during their whole lives, and I appreciated it very much and I will be very grateful the rest of my life. Dank auch an Michael, Arne, Max, Elisa, Jenny,... weil ihr meinen Aufenthalt in Erlangen zu einer noch positiveren Erfahrung gemacht habt und weil ihr mich im zweiten Teil meines Abenteuers in München besucht habt. Ich hätte nie gedacht, dass ich, ohne ein Wort Deutsch zu sprechen, so enge und liebevolle Freunde in Deutschland finden würde. Ich vermisse euch alle! And, now, Villa International. A multicultural guest house in which you share your life with other researchers and medical doctors, and despite everybody there was far from their houses, we were happy doing what we like the most, working in Centers which have a great prestige around the world and we understood each other due to we were in the same

education phase. Thank you for telling me about your cultures and for all of the times in the library, excursions, celebrations and our after-dinner conversations (Demet, Paul, Philipp, Nicolas, Anna, Fabio, Maura, Matteo, Beni, Oihane, Cris y Tania, Catherine, Juliana, Dani, Yina, Elizabeth, James, Lina, Emily, Saugat, Mathi, Ana, Jesus, Selene, Diana, Malena, Jialin, Katie, Diana, Shiva, Kashif, Sheena, Nafissatou, Mamadou, Sadia, Las Marías,...), and to Camille, Maureen, Jay and all volunteers in Villa for your generosity and maintaining Villa alive.

Gracias a toda gente de NEIKER. Todos y cada uno de vosotros habéis dejado una huella en mí. Gracias sobre todo a mis “Becarias precarias + Ion” (Rakel, Miriam de Eguidua, Miriam Serrano, María, Iraia, Maitane, Olalla, Sofia, Lucía, Medelin, Fátima, Ione y por supuesto el hombre del grupo Ion. Lo siento amigo pero ya sabes que somos mayoría, pero ¡bendito seas entre todas nosotras!). Una vez me dijeron que la gente de tu trabajo es tu segunda familia, de hecho pasas bastante más tiempo con ellos que en casa, por lo que gracias a todas por hacerme la vida más fácil en NEIKER y aguantar mis nervios y días difíciles (que en Ciencia no son pocos), arrancándome una sonrisa cuando más lo necesitaba. Además, gracias por ayudarme y solventarme dudas, sobre todo las que ya sois Doctoras, en esta última etapa de la tesis. Me ha ayudado mucho. Os deseo a las que ya os hayáis ido/vayáis de NEIKER un futuro prometedor fuera de aquí, y a las que os habéis quedado que sois pocas que ¡ojalá os dure mucho tiempo! ¡Se os quiere!

Gracias Inés por siempre tener buena cara y alegría, que aunque te he tenido abandonada esta última temporada con tanto trabajo de ordenador, siempre que bajo es una alegría verte. Gracias por las charlas sobre danzas y algún cante que se te oía por el laboratorio. Gracias también Bea y Nekane por todo, por vuestra inestimable ayuda fuera la hora que fuera, tuvierais la prisa que tuvierais. Hacen falta más personas como vosotras, que no esperen nada a cambio. Sois estupendas dentro y fuera de NEIKER. Gracias también a Iratxe, del laboratorio de Diagnóstico, que al igual que Itziar, me recibían siempre con buena cara cuando les llevaba muestras.

Quiero hacer una mención especial a Amaia Etxezarreta. En NEIKER a penas coincidimos trabajando, pero quiero darte las gracias porque desde el primer día te portaste bien conmigo. Me abriste las puertas de tu casa para lo que necesitara y nunca olvidaré que aquel día lluvioso en Aristébanos estuvisteis allí tu familia y tú. Y por otro lado, Xeiider que también ha estado ahí siempre con palabras de ánimo. ¡Cuidad de esos nenos tan guapos que tenéis!

Ahora llega el turno de mi mesa favorita. ¡La mia!. Ione, sentada enfrente de mí. ¿Qué decir de Ione? Eres la alegría personificada. Contigo es imposible enfadarse por nada. Me disgusté mucho cuando tomaste la decisión de irte, pero sabiendo que estás bien, creo que fue la mejor que pudiste tomar. ¡Espero que te sientas realizada y disfrutes como tú sabes! Y nunca se me olvidará el cordón de San Blas con los colores del Athletic que tuve que llevar puesto 9 días. Eskerrik asko por todo!. En el otro lado, pero también en frente (ambas aliadas en contra de Jesse y de mi) mi querida y vieja amiga Medelin. Larga historia la que compartimos Medelin y yo. La historia se remonta a septiembre 2007 en León. Una chica nueva de un pueblo de montaña llega a la residencia “La Asunción” a vivir y cuando habla con la indonesia (medio vasca), esta última no la entendía porque hablaba “cerrao” y ella sabía muy poco español... ¿os parece un chiste? Pues no lo es. Éramos Medelin y yo. Luego llegaron vivencias varias por la residencia, y años más tarde el destino quiso que nos volviéramos a encontrar siendo compañeras en NEIKER y uno de mis mayores apoyos. Si enumerara todo lo vivido contigo y todo lo que te quiero tendría para escribir otra tesis, así que resumiendo Terimakasih banyak a ti y a Sergio. Cuando celebréis los 25 años de casados quiero volver a cantaros ¿eh?. En el bando contrario, una nueva incorporación, Fátima que junto con Ion (o también llamado *Jesse 2.0*) son los nuevos “parásitos”, aunque en el buen sentido de la palabra, que no vamos a ser nosotros los de tirarnos piedras contra nuestro propio tejado. Me encantaría estar con una cámara vigilándoos y riéndome, porque seguro que ahora

mismo os estáis picando mutuamente. Mucho ánimo, fuerza y paciencia para vuestro doctorado, que como habréis visto es como una montaña rusa, pero que yo sepa nadie ha muerto en el intento.

Jesse, Jesse, Jesse...creo que lo digo todo si digo que has sido un segundo padre, aunque eso te haga sentir mayor, pero ya sabes que es mentira, que eres un jovenzuelo. Que aunque nos vacilemos y pienses que no te hago caso...como a mi padre...en el fondo lo hago aunque me cueste cambiar. Son muchos años siendo “necia” (para los que sois vascos, “necio” yo lo uso como persona terca, cabezota y testaruda, no con tono despectivo. Que ya hemos tenido esta misma “discusión” y por otros usos y significados de otras palabras). Gracias por tu compañerismo, por tus riñas, por tus consejos, por tu aguante y paciencia...aunque en esto creo que con mis manías del orden y “lo que puedas hacer hoy, no lo dejes para mañana”, la paciencia a veces era más la mía. Ha sido un verdadero placer haberte conocido y haber podido aprender cosas de ti y te echaré de menos. Mila esker!

Gracias a los “autores de la autora”, es decir, mis padres. Gracias a ellos estoy donde estoy, y aunque la tesis va a llevar mi nombre (como cualquiera de las notas del colegio o el título de la universidad), creo que se lo debo. No sé qué me deparará el futuro, es imposible poder imaginar donde acabará uno, y eso lo sabemos bien en nuestra casa, pero ojalá pueda hacerme un hueco en este ámbito para el que me he preparado gracias a ellos. Gracias a su amor tanto por mi como por mi hermana Laura, a su paciencia desde que éramos pequeñas, ayudándonos a hacer los deberes y exigiéndonos más porque ellos sabían que podíamos hacerlo, porque la suerte no existe, se trabaja, y muchas veces hace falta que los padres crean que realmente los hijos pueden conseguir las cosas. Gracias a su protección en los momentos más duros en los que la vida parecía estar en contra de uno, por querer que sus hijas fueran independientes y estuvieran preparadas para salir al mundo, y un largo etcétera. Pero sobre todo, y para que nos vamos a mentir, gracias por el aporte económico para poder formarnos. Porque sin eso, y seamos realistas, no se hace nada. Y este es un gracias grande porque no es fácil formar a dos hijas seguidas en edad, lejos del pueblo, con recursos muchas veces escasos y sufriendo huelgas desde que nacimos, viéndolos ir a trabajar a la mina de carbón nuestro padre, y a nuestra madre en todo lo que se le ponía delante, daba igual el estado de salud, con fiebre, sin dormir por cuidarnos, de día, de noche,...sin darse jamás un capricho ni un lujo, todo por darnos un futuro. Así que GRACIAS de nuevo por todo.

Gracias por supuesto también a mi “l.luceiru guapu”, mi hermana Laura. Gracias por todo, por estar ahí, por aguantarme. Con suerte seremos dos doctoras en la familia dentro de poco, aunque como alguien se ponga malo y pidan un doctor lo llevamos claro... Y que aunque estemos lejos una de la otra desde hace ya unos años, se te sigue echando muchísimo de menos.

Gracias a Ángel. Tampoco hay nada que no te haya dicho ya en más de 11 años que llevamos juntos, y que espero que no cumplamos los 12 sin haber podido defender esta tesis (veremos a ver si deja el COVID-19). Gracias por estar ahí a pesar de la distancia. No es plato de buen gusto tener que irte de tu tierra, dejando familia, amigos y pareja con la que quieres vivir y ser feliz todos los días de tu vida compartiendo tu vida, tus días buenos y sobre todo los malos cuando necesitas hablar con alguien y distraerte. Pero cuando no hay trabajo en la tierra, hay que salir a buscarlo. Así que gracias por tu comprensión, aunque no siempre es fácil mantener la calma ni paciencia, supongo que el amor todo lo puede, o eso dicen.

Gracias a toda la gente que he conocido estos 4 años, y que han hecho que mi estancia aquí fuera más llevadera. A María y romaní, otro caso como el de Medelin, reencontrándonos años después en la misma tierra. A Vero e Isma por acogerme en Derio. A las chicas de Dantzás. A Arantza y su familia. A Jon Ander, Jagoba y toda la gente que fui conociendo en el mundo de la música y que me alegraron el alma y sobre todo a Ander. Ander, siempre

ahí. Y que aunque las agendas de ambos siempre estaban ocupadas, siempre había un hueco para poder verse. A Kepa, Rubén y Fernan. Para mí un pack indisoluble. La vida da muchas vueltas, y como dice mi madre “hay que intentar ser feliz” porque siempre pueden pasar desgracias. Gracias Kepa por tu música, tu generosidad conmigo y ojalá te pongas bien pronto. A Rubén también por animar siempre y llevarme a los conciertos, que se echan de menos, y a ti Fernan por haberme hecho sentir una Deriolarra más, siempre pendiente de todos y tu felicidad siempre presente, no cambies.

Por último me gustaría mencionar a los profesores que marcaron en cierta forma mi vida desde el colegio hasta la universidad, y que siguen ahí con el paso de los años y de los que aprendí que ser buen profesor es más que explicar bien (que también lo hacían). Es ser buena persona. Mis buenos profesores siempre buscaron que aprendiéramos, eso era lo primero, pero también mostraron empatía, aunque no por ello eran menos exigentes, y siempre ayudando dentro y fuera del aula. No puedo nombrarlos a todos, pero quiero mencionar a algunos de ellos como María Jesús, Ana Ferreras, Don Jesús, Murias, María Teresa...Algunos de ellos fueron mi salvación en muchos aspectos, y otros como los de biología (Andrés, Fina y Joaquín) hicieron que amara esta rama y me quisiera dedicar a ello gracias a la pasión que mostraban. Además del famoso saludo de Joaquín todos días antes de clase “Científicos y científicas del mañana”, que por lo que se ve dio fruto en más de uno de sus alumnos del instituto, entre ellos mi amigo y compañero Héctor Ruíz Villar, gran biólogo al que quiero dar las gracias también por la maravillosa portada de tesis que me ha dibujado. O profesores como Rafael Santamaría de matemáticas en la Universidad, uno de esos profesores que no se muerden la lengua y dicen verdades como puños, y que hace no mucho me dio unos cuantos consejos de vida. Me quedaré con la frase que una vez otro profesor le dijo a él: “quien resiste, gana”. Os dedico esta tesis, y sobre todo mis palabras de agradecimiento por haber sido los profesionales que necesita el sistema.

¡MUCHAS GRACIAS! MILA ESKER! THANK YOU VERY MUCH! VIELEN DANK!

