

TESIS DOCTORAL

# Epidemiología de la fiebre Q en rumiantes domésticos en la zona central de la península ibérica



Teresa García-Seco Romero

Departamento de Sanidad Animal

**Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense Madrid**

Servicio de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos

**Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense Madrid**

Madrid, 2017



**CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Sanidad Animal

**CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET)**

Servicio de Zoonosis Emergentes, de Baja Prevalencia y Agresivos Biológicos



**TESIS DOCTORAL**

**Epidemiología de la fiebre Q en rumiantes domésticos  
en la zona central de la península ibérica**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por  
**María Teresa García-Seco Romero**

Bajo la dirección de los Doctores:

**Julio Álvarez Sánchez**

**Marta Pérez Sancho**

**Joaquín Goyache Goñi**

Madrid, 2017





FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
MADRID**

D. Joaquín Goyache Goñi, Profesor titular del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria e investigador del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense Madrid, D. Julio Álvarez Sánchez, *Assistant Professor* del *Veterinary Population Medicine Department, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota* y Dña. Marta Pérez Sancho, investigadora del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense Madrid.

**CERTIFICAN:**

Que la tesis doctoral que lleva por título “**Epidemiología de la fiebre Q en rumiantes domésticos en la zona central de la península ibérica**” ha sido realizada por la licenciada en Veterinaria Dña. María Teresa García-Seco Romero en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

**Fdo. Joaquín Goyache**

**Fdo. Julio Álvarez**

**Fdo. Marta Pérez**



*La realización la presente tesis doctoral ha sido posible gracias a:*



## **Comunidad de Madrid**

Consejería de Medio Ambiente, Administración  
Local y Ordenación del Territorio  
Dirección general de Agricultura y Ganadería  
Área de Ganadería



## **Junta de Castilla y León**

Consejería de Agricultura y Ganadería  
Dirección General de Producción Agropecuaria  
e Infraestructuras Agrarias  
Servicio de Sanidad Animal



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

Contrato predoctoral de Personal Investigador en Formación  
Convocatoria UCM 2011



A mis padres





## AGRADECIMIENTOS

Una de las cosas buenas que tiene llegar al final de este largo camino, es, sin duda, tener la oportunidad de dar las gracias a todas las personas que de un modo u otro han hecho posible esta tesis y a las que, por ello, también les pertenece.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis tres directores, que para mí han sido mucho más que eso:

A Joaquín, quien se acordó de mí hace ya más de ocho años y me propuso incorporarme al grupo NED. De no ser por ti, no estaría ahora escribiendo estas líneas. Muchas gracias por tu atención, tu cariño y por tener siempre tu puerta abierta para escuchar. Gracias también por tu inestimable ayuda con cuestiones administrativas fundamentales a lo largo de todo este tiempo.

A Marta, ejemplo absoluto de superación y compromiso y punto de apoyo imprescindible para mí en cada uno de los días y etapas de este largo periodo. Qué suerte haberte tenido al lado (o a muchos kilómetros, pero siempre Skype mediante) y haber contado con tus consejos tanto en lo profesional como en lo personal.

A Julio, verdadero motor de esta tesis y al que se la debo totalmente. Del que he aprendido tanto, aunque no siempre compartamos la misma visión de las cosas. Hubiera sido imposible llegar a este punto sin tus ideas, tus conocimientos, y, sobre todo, sin tu tiempo, ese que decidiste dedicarme de la manera más paciente y generosa, a pesar de no disponerlo para ti, y, además, sin perder el buen humor. ¡Siempre estaré en deuda contigo, muchas gracias!

Mi más sincero agradecimiento también a Lucas, por haber confiado siempre en mí desde el principio (¡más que yo misma!) y haberme dado plena libertad para trabajar. Gracias por ese entusiasmo contagioso, esa capacidad para ver el lado bueno de todas las situaciones y por ser una fuente de ideas inagotable.

Gracias también a Lucía y a Bea, por haber tomado el relevo en esta nueva etapa del Centro de forma tan valiente y generosa. Espero que os podamos dar muchas alegrías entre todos.

Por supuesto, gracias a todos los integrantes del grupo NED, donde inicié mis pasos en VISAVET y del que siempre me sentiré parte, sean cuales sean los caminos profesionales futuros que vayan surgiendo. Gracias a Nerea, por su optimismo, su buen humor, la alegría que transmite y por esa capacidad innata para hacer sentir a gusto a todo aquel que tiene la oportunidad de trabajar junto a ella. Gracias a Irene, quien me llevó de la mano en mis primeros pasos en el laboratorio enseñando con paciencia una persona de naturaleza despistada como yo, y donde nació una complicidad que ahora nos permite

ponernos al día en cinco minutos. Gracias a Sergio, por esa manera especial suya de hacerse querer y por ayudar siempre. Gracias también a Javi, compañero de despacho, de comidas y sobremesas y ahora también de grupo, ¡veremos qué nos depara el futuro! Gracias también a los compañeros que trabajaron mano a mano conmigo a lo largo de los años y que todos, sin excepción, hicieron más fácil un camino que se hizo duro a ratos, y que, aunque sus resultados no se recojan en esta tesis, yo considero sin duda parte fundamental de mi aprendizaje predoctoral. Gracias a Pilar, Álvaro, Paola, y muy especialmente, a Álex, no hay persona con mejor disposición y humor que tú, por largo que sea el día de muestreo, un placer trabajar contigo, ¡eres mi fichaje estrella! Gracias también a Alberto y su imprescindible ayuda, por ser experto en solucionar problemas y aportar soluciones ante los imprevistos más variopintos, sin perder nunca un ápice de la calma que le caracteriza.

Gracias a los chicos del Servicio de Informática y Comunicación, a Edu, a Carlos y especialmente a Javi, por haberme ayudado pacientemente con mis numerosas dudas y haber encontrado solución a problemas que me parecían insalvables con mis inacabables bases de datos, programas y mapas.

Gracias, en general, a todo el personal de VISAVET, a los de la vieja escuela, a los que se han ido incorporando y a los que ya no están, porque todos me han prestado su ayuda cuando la he necesitado, denominador común de este Centro que ya siento como mi casa (¡quizá por haber pasado más horas en él que en la mía propia!).

Gracias al personal del Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León (a Olga Mínguez, Anna Grau, Yolanda González y Luis Miguel Fernández), del Área de Ganadería de la Comunidad de Madrid (a Rosa Díaz, Enrique Pagés y Yolanda Soriano) y del Laboratorio Regional de Sanidad Animal de Colmenar (a Fernando Mirat y a José Manuel González), por facilitarnos el acceso a la información y muestras tan valiosas que ha permitido hacer posible esta tesis, por confiar en nosotros y por tratarnos siempre tan bien.

Gracias a Andrés Pérez, por haberme dado la oportunidad de realizar mi estancia en el *Department of Veterinary Population Medicine* de la Universidad de Minnesota.

Gracias a la Universidad Complutense de Madrid, cuyo programa de becas predoctorales me ha permitido llevar a cabo esta tesis.

Gracias también al personal de la biblioteca y hemeroteca de la Facultad de Veterinaria, que tan diligentemente me han facilitado toda la documentación que les he solicitado a lo largo de todo el proceso de escritura.

Como no, gracias a Carmen, siempre presente en las jornadas que no se acababan nunca, por estar siempre dispuesta a ayudar sin preguntar ni para qué, por tu cariño

desbordante, por tus muchos detalles (aunque yo los escatime) y por haber hecho de centinela en la distancia durante esta última etapa para asegurarte de que todo iba bien. Gracias a Lucía, Manuel y Pablo, por esa amistad forjada a lo largo de ya muchos años, por poder compartir con vosotros desde las más grandes chorradas a las preocupaciones más serias, me siento muy afortunada de que forméis parte de mi vida. Manuel, eres lo mejorcito que ha dado nuestra Encrucijada de la Mancha, y me alegro de que Pablo y Lucía hayan tenido oportunidad de comprobarlo.

Gracias a mis padres, por su amor incondicional, su abnegación, por anteponer siempre mis necesidades a las suyas, por haberse esforzado tanto por darme siempre lo mejor y por hacerme sentir que, gracias a ellos, haga lo que haga, siempre salto con red.

Finalmente, gracias a Jesús, por haber crecido conmigo y haberme acompañado en todo este camino, por apoyarme siempre, por esforzarse en hacerme reír de mil maneras en los momentos de estrés, por disculparme los (muchos) olvidos, por entenderme y respetarme a pesar del antagonismo que nos caracteriza y por haber sido tan generoso y paciente en todos estos años.

Muchas gracias a todos.



# ÍNDICE

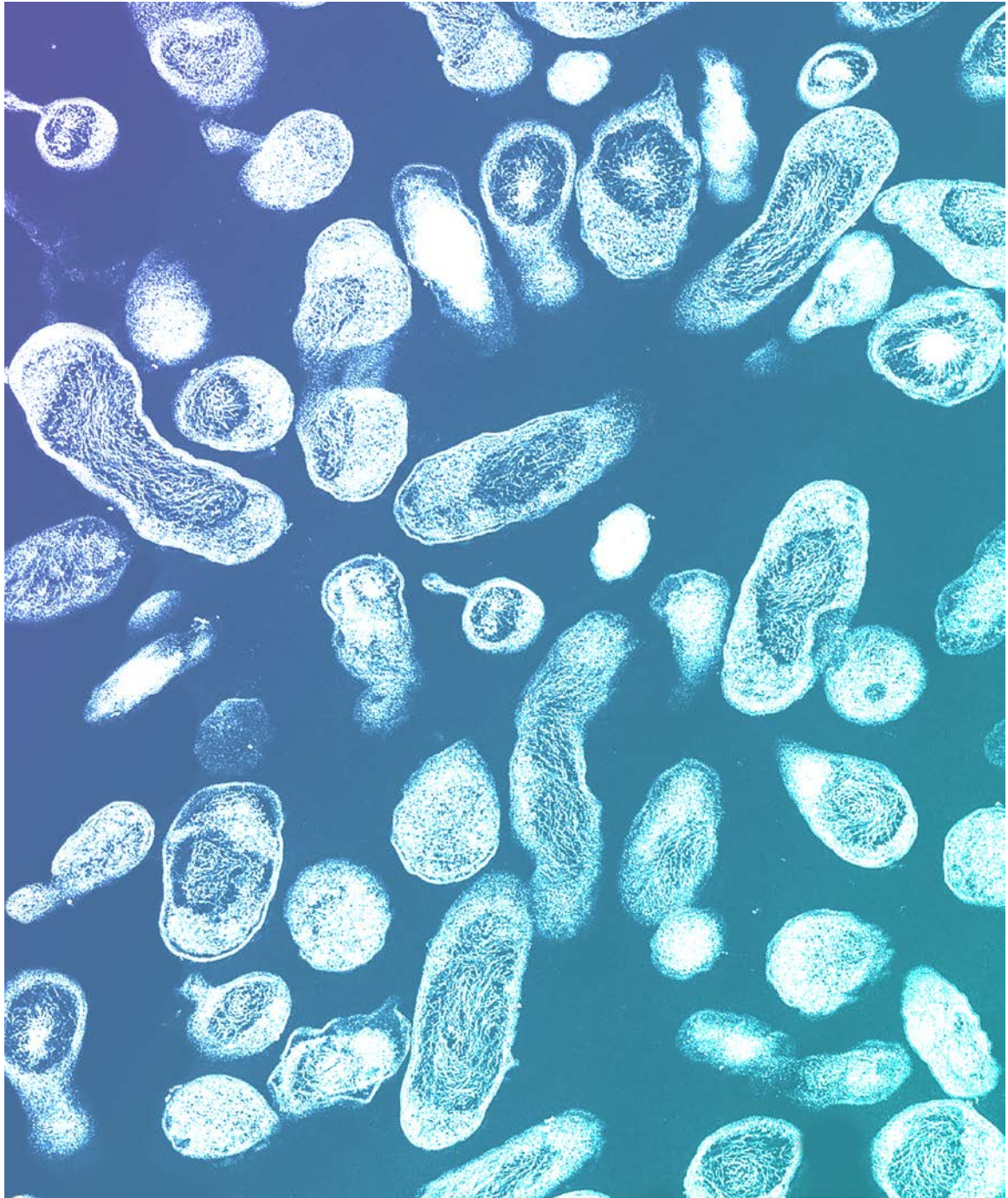
<b>1. RESUMEN / SUMMARY .....</b>	<b>19</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>29</b>
2.1. FIEBRE Q. GENERALIDADES .....	29
2.1.1. Descripción del agente etiológico: <i>Coxiella burnetii</i> .....	29
2.1.1.1. Reseña histórica.....	29
2.1.1.2. Generalidades y encuadre taxonómico.....	29
2.1.1.3. Características genéticas, estructurales y de resistencia .....	33
2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD .....	41
2.2.1. Distribución geográfica y rango de hospedadores.....	41
2.2.2. Excreción .....	53
2.2.3. Transmisión .....	57
2.2.3.1. Papel de las garrapatas en la transmisión de <i>C. burnetii</i> .....	61
2.2.4. FACTORES DE RIESGO PARA LA TRANSMISIÓN DE <i>C. BURNETII</i> EN RUMIANTES DOMÉSTICOS .....	63
2.2.4.1. Factores de riesgo asociados al hospedador.....	63
2.2.4.2. Factores de riesgo relacionados con el manejo .....	65
2.2.4.3. Factores medioambientales .....	72
2.3. PATOGENIA.....	74
2.3.1. Manifestaciones clínicas, lesiones y respuesta inmune .....	74
2.3.1.1. Pequeños rumiantes.....	74
2.3.1.2. Bovino.....	82
2.4. DIAGNÓSTICO DE FIEBRE Q .....	86
2.4.1. Pruebas basadas en la detección del agente .....	87
2.4.1.1. Tinción .....	87
2.4.1.2. Pruebas inmunohistoquímicas .....	87
2.4.1.3. Cultivo.....	88
2.4.1.4. Pruebas de detección molecular .....	90
2.4.1.5. Pruebas de caracterización molecular .....	93
2.4.2. Pruebas basadas en la respuesta inmune del hospedador.....	95
2.4.2.1. Fijación del complemento .....	96
2.4.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	98
2.4.2.3. Test ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....	99
2.4.3. Particularidades, utilidad y limitaciones de las técnicas basadas en la detección de anticuerpos en el diagnóstico de la fiebre Q en rumiantes domésticos .....	105
2.4.4. Diagnóstico de fiebre Q en el rebaño.....	107
2.5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA FIEBRE Q EN RUMIANTES DOMÉSTICOS.....	109

2.5.1.	Prevención en explotaciones negativas.....	110
2.5.2.	Medidas ante la presencia de infección.....	111
2.5.2.1.	Medidas generales .....	111
2.5.2.2.	Medidas específicas .....	115
2.6.	LA FIEBRE Q COMO ZONOSIS .....	123
2.7.	IMPACTO ECONÓMICO DE LA ENFERMEDAD.....	128
2.8.	SITUACIÓN ACTUAL DE LA FIEBRE Q EN ESPAÑA.....	131
2.8.1.	Fiebre Q y salud pública en España.....	131
2.8.2.	Particularidades geográficas y medioambientales de las distintas regiones españolas .....	142
2.8.3.	Situación de la fiebre Q en humanos en las regiones de estudio de la presente tesis	147
2.8.4.	Fiebre Q en rumiantes domésticos .....	148
<b>3.</b>	<b>ORGANIZACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>165</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>169</b>
4.1.	POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	169
4.1.1.	Estudio 1. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a <i>C. burnetii</i> en ganado ovino de Castilla y León .....	169
4.1.2.	Estudio 2. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a <i>C. burnetii</i> en ganado bovino de la Comunidad de Madrid .....	175
4.1.3.	Estudio 3. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a <i>C. burnetii</i> en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid.....	176
4.2.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	178
4.2.1.	Estudio 1. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a <i>C. burnetii</i> en ganado ovino de Castilla y León .....	178
4.2.2.	Estudio 2. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a <i>C. burnetii</i> en ganado bovino de la Comunidad de Madrid .....	180
4.2.3.	Estudio 3. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a <i>C. burnetii</i> en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid.....	181
4.3.	ANÁLISIS DE LABORATORIO .....	182
4.4.	ANÁLISIS DE DATOS.....	185
4.4.1.	Estimación de los niveles de seroprevalencia de fiebre Q.....	185
4.4.1.1.	Estudio 1.....	185
4.4.1.2.	Estudio 2.....	185
4.4.1.3.	Estudio 3.....	186
4.4.2.	Detección de agrupamientos ( <i>clusters</i> ) en el espacio .....	186
4.4.2.1.	Estudio 1.....	186
4.4.2.2.	Estudio 2.....	187
4.4.1.1.	Estudio 3.....	187

4.4.3.	Análisis de factores de riesgo .....	188
4.4.3.1.	Estudio 1 .....	188
4.4.3.2.	Estudio 2 .....	191
4.4.3.3.	Estudio 3 .....	193
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>197</b>
5.1.	ESTUDIO 1. SEROPREVALENCIAS, DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN A <i>C. burnetii</i> DEL GANADO OVINO DE CASTILLA Y LEÓN .....	197
5.1.1.	Análisis descriptivo .....	197
5.1.2.	Análisis espacial .....	202
5.1.3.	Análisis de regresión logística a nivel de rebaño.....	203
5.1.3.1.	Análisis univariable .....	203
5.1.3.2.	Análisis multivariable.....	205
5.2.	ESTUDIO 2. SEROPREVALENCIAS, DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN A <i>C. burnetii</i> EN GANADO BOVINO DE LA COMUNIDAD DE MADRID 209	
5.2.1.	Análisis descriptivo .....	209
5.2.2.	Análisis espacial .....	210
5.2.3.	Análisis de factores de riesgo a nivel de rebaño .....	212
5.2.1.	Análisis de factores de riesgo a nivel individual .....	212
5.3.	ESTUDIO 3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SEROPREVALENCIA, DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN A <i>C. burnetii</i> EN PEQUEÑOS RUMIANTES DE LA COMUNIDAD DE MADRID.....	215
5.3.1.	Análisis descriptivo .....	216
5.3.1.1.	Resultados serológicos .....	218
5.3.2.	Análisis espacial .....	223
5.3.3.	Análisis de regresión logística a nivel de rebaño.....	224
5.3.3.1.	Análisis univariable .....	224
5.3.3.2.	Análisis multivariable.....	225
5.3.4.	Análisis de regresión logística a nivel individual .....	226
5.3.4.1.	Análisis univariable .....	226
5.3.4.2.	Análisis multivariable.....	227
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>231</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>261</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>265</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>307</b>
9.1.	ANEXO I. LISTA DE ABREVIATURAS.....	307
9.2.	ANEXO II. LISTA DE FIGURAS .....	308
9.3.	ANEXO III. LISTA DE TABLAS.....	311







## **RESUMEN / SUMMARY**



## 1. RESUMEN

*Coxiella burnetii* es el agente etiológico de la fiebre Q, zoonosis que presenta una distribución mundial y cuyo principal reservorio y fuente de infección para el hombre son los rumiantes domésticos. En estos, la principal consecuencia de la infección es el aborto, especialmente en el caso de pequeños rumiantes, estando más asociada a problemas de fertilidad en el bovino. Tradicionalmente se ha considerado que la fiebre Q tenía un impacto menor en la producción animal dada su frecuente presentación en forma de infecciones inaparentes. Sin embargo, a lo largo de los años ha quedado demostrada la capacidad de esta enfermedad para producir importantes brotes clínicos en rumiantes, y de hecho actualmente se considera una de las principales causas de aborto infeccioso en rumiantes domésticos. Los animales infectados excretan un elevado número de bacterias en el momento del parto o del aborto, que contaminan el ambiente y pueden dar lugar a nuevas infecciones de individuos susceptibles. La baja dosis infectiva de *C. burnetii*, su gran resistencia ambiental y su capacidad para desplazarse largas distancias con el viento la convierten en un patógeno altamente contagioso y cuya transmisión puede llegar a ser difícil de controlar. La transmisión al hombre se produce principalmente por vía aerógena a través de la inhalación de aerosoles contaminados.

Si bien en humanos la fiebre Q también se caracteriza por dar lugar a un alto porcentaje de infecciones inaparentes (en torno al 60% de los casos), la complicación de determinadas formas clínicas de la enfermedad puede llegar a producir la muerte. Además, su carácter crónico también puede dar lugar a cuadros clínicos altamente invalidantes. Todo ello, junto con el incremento del número de casos comunicados en la última década, tanto esporádicos como incluidos en amplios brotes que han llegado a afectar a miles de personas (normalmente asociados a rumiantes domésticos), ha puesto de manifiesto las importantes consecuencias que esta enfermedad tradicionalmente desatendida puede llegar a tener en salud pública.

Por todo ello, en los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de los distintos aspectos de esta enfermedad, promoviéndose la investigación y la vigilancia de la misma por parte de administraciones públicas y diversos organismos internacionales. Sin embargo, a pesar de que actualmente la fiebre Q es una enfermedad de declaración obligatoria tanto en animales como en el hombre en un gran número de países, no está sometida a planes de monitorización oficiales en la mayoría de ellos. Esto hace que la situación de la enfermedad en rumiantes domésticos no se conozca con precisión en muchas regiones, y que su prevalencia se considere en general subestimada. Además,

siguen existiendo aún aspectos de su epidemiología que no están plenamente caracterizados.

En el caso de España, existen regiones endémicas como el País Vasco o Canarias en las que se han detectado numerosos casos e incluso brotes humanos en las últimas décadas, que han propiciado el estudio de la fiebre Q en los rumiantes domésticos en las mismas. Sin embargo, en muchas otras zonas del país la información sobre la situación de la cabaña ganadera respecto a esta enfermedad es escasa o incluso inexistente, a pesar de que se han detectado casos humanos en todo el territorio español. En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo determinar la situación epidemiológica de la fiebre Q en rumiantes domésticos en la zona de la meseta central - en concreto las comunidades autónomas de Castilla y León y Madrid - región de alta producción ganadera, pero en la que la información disponible sobre la enfermedad es prácticamente inexistente.

Para ello, se han llevado a cabo tres estudios recogidos en la presente tesis: el estudio 1 se realizó en ganado ovino de Castilla y León entre los años 2009 y 2012, el estudio 2 en ganado bovino de la Comunidad de Madrid en 2009 y el estudio 3 en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid en 2011.

En el estudio 1 los ovinos a incluir en el trabajo se seleccionaron entre aquellos muestreados en el marco del Procedimiento Integral de Investigación Epidemiológica de Tularemia y otras Zoonosis Asociadas a Roedores Silvestres y Lagomorfos de la comunidad autónoma de Castilla y León. En los estudios 2 y 3 los animales a incluir en el estudio se seleccionaron de entre aquellos muestreados en el marco de las campañas de saneamiento ganadero de los Planes Nacionales de Erradicación de la Brucelosis Bovina en el caso del estudio 2 y de la de los Pequeños Rumiantes en el caso del estudio 3.

En los tres estudios, la muestra de elección para la determinación del grado de exposición a *C. burnetii* fue el suero. Dichas muestras de suero fueron analizadas mediante el empleo de un kit ELISA comercial, cuyos resultados permitieron estimar los niveles de seroprevalencia en las especies seleccionadas en sus correspondientes regiones de estudio. Por otro lado, también se recogió información referente a las características de los animales muestreados (estudios 2 y 3) así como respecto a las explotaciones (estudios 1, 2 y 3) y a los municipios (estudio 1) de origen de los mismos, además de la localización geográfica de estos (municipios en el caso del estudio 1 y explotaciones en los estudios 2 y 3).

Los resultados de los tres trabajos demostraron una amplia distribución del patógeno en las especies de rumiantes domésticos de las áreas en estudio. Así, en el estudio 1 se observaron unas prevalencias de rebaño mayores del 50% y del 10% a nivel individual durante 2009-2012, si bien se observó un aumento particularmente notable en 2012, con un 76% de prevalencia de rebaño y un 21% individual.

En los estudios 2 y 3, las prevalencias de rebaño estimadas fueron del 30% en bovino y del 47% en explotaciones de pequeños rumiantes. Las prevalencias individuales fueron del 7% en bovino, 14% en ovino y 22% en caprino, sugiriendo un grado mayor de exposición a *C. burnetii* en pequeños rumiantes que en bovino.

Los resultados serológicos obtenidos, junto con la información geográfica recogida sirvieron para evaluar la distribución espacial de la fiebre Q en ganado ovino de Castilla y León (estudio 1) y de ganado bovino (estudio 2), ovino y caprino (estudio 3) de la Comunidad de Madrid, así como para la determinación de patrones de agregación espacial tanto a nivel global como local en cada caso, mediante el empleo de herramientas de geoprocésamiento en GIS (*Geographic Information System*).

En el estudio 1 se observó que los resultados de explotaciones y animales positivos a nivel de municipio presentaban una agregación espacial tanto local como global en los cuatro años de estudio, de modo que los municipios vecinos a un municipio clasificado como positivo presentaban una probabilidad mayor de ser positivos (hasta el cuarto nivel de vecindad). Asimismo, se identificó un *cluster* de alta incidencia en cada año de estudio localizado siempre en la misma zona, en la región occidental del estudio, si bien, con base en la información disponible en el estudio, no pudieron determinarse los factores asociados a la aparición de dichas áreas de alta incidencia.

En el caso de los resultados en la Comunidad de Madrid, el patrón espacial observado fue menos evidente que en Castilla y León, observándose únicamente una asociación espacial global de las explotaciones positivas hasta el primer nivel de vecindad en el caso de los rebaños de bovino, pero no así en los de pequeños rumiantes. Tampoco se detectaron evidencias de agrupamientos locales al analizar toda la población de bovino o pequeños rumiantes en estudio. Este hecho podría relacionarse con el alto porcentaje de explotaciones positivas distribuidas en toda la comunidad autónoma de forma homogénea, lo dificultaría la identificación de ningún patrón espacial, al estar la enfermedad ampliamente extendida en la región en estas especies.

Los resultados serológicos obtenidos junto con la información recogida referente a las características de los animales, explotaciones y municipios en estudio se emplearon para llevar a cabo un estudio de factores de riesgo mediante el empleo de modelos de regresión multivariantes, utilizando una aproximación bayesiana para el estudio 1 y una frecuentista en los estudios 2 y 3.

En el estudio 1 se determinó que el riesgo de seropositividad en ganado ovino de Castilla y León se asoció, dependiendo del año, a la aptitud productiva (2009-2011), el tamaño de rebaño (2009-2011), y el grado de intensificación del manejo productivo (2011 y 2012), de modo que se identificó un mayor riesgo en animales pertenecientes a explotaciones de leche, intensivas/de manejo mixto y de mayor censo, de acuerdo a lo descrito en otros estudios sobre fiebre Q llevados a cabo en rumiantes domésticos. Este análisis permitió también identificar un patrón espacial marcado en la distribución de los casos positivos, de acuerdo a lo observado en el análisis espacial, explicado solo en parte por la densidad de pequeños rumiantes en el municipio de origen de la explotación.

En los estudios 2 y 3, el riesgo de positividad en explotaciones de ganado bovino y pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid se asoció, como en el caso de los resultados de Castilla y León, a la aptitud productiva, sugiriendo un mayor riesgo en explotaciones de aptitud láctea. Además, en el caso de explotaciones bovinas, también se identificó un mayor riesgo en explotaciones de mayor censo. Por otro lado, en cuanto a las variables a nivel individual, se identificó la edad como factor de riesgo, de modo que los animales de mayor edad presentaban un riesgo de positividad superior al de los más jóvenes, relacionándose con una mayor probabilidad de contacto con *C. burnetii* a lo largo de la vida del animal. También este factor de riesgo ha sido identificado previamente en otros trabajos.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la amplia exposición a *C. burnetii* en las especies de rumiantes domésticos estudiadas tanto en Castilla y León como en la Comunidad de Madrid, así como la influencia de factores espaciales en la distribución de los casos en menor o mayor grado dependiendo del estudio y de la región, siendo esta influencia mucho más marcada en Castilla y León. Esta información, junto con la referente a los factores de riesgo identificados, compartidos hasta cierto punto en aquellos evaluados en más de un estudio, podría ser de utilidad a la hora de diseñar planes de vigilancia de la enfermedad en las zonas de estudio con el fin de evitar un aumento de los niveles de prevalencia, así como, llegado el caso, para el correcto diseño de planes de control de brotes si estos tuvieran lugar.

## SUMMARY

*Coxiella burnetii* is the aetiological agent of Q fever, a worldwide distributed zoonosis whose main reservoirs and source of infection for humans are domestic ruminants. The main clinical sign associated with *C. burnetii* infection is late-term abortion in small ruminants, and fertility problems in cattle. However, the impact of Q fever in animal production has been traditionally considered limited since infection is more commonly unapparent. Still, its ability to cause important clinical outbreaks has become evident in the last years, so that nowadays it is considered one of the main causes of abortion in domestic ruminants. Infected animals may excrete high amounts of bacteria during the abortion/parturition, contaminating the environment and potentially leading to new infections in susceptible individuals. The control of *C. burnetii* is difficult due to its low infective dose, its high environmental resistance and the potential for airborne transmission events over long distances when conditions are favorable. In fact, airborne transmission due to inhalation of contaminated aerosols is considered the main route of infection in humans.

In humans, *C. burnetii* infection is also normally silent (in about 60% of the cases). However, in a proportion of causes it may cause acute and chronic infections that, in occasions, may be highly incapacitating. Moreover, in certain cases the complication of clinical signs may be fatal. These characteristics, together with the increasing number of reported cases during the last decade (both sporadic as well as part of outbreaks affecting thousands of people, generally associated to domestic ruminants) have revealed the potential clinical consequences this traditionally neglected disease can have in public health. Nevertheless, there are numerous knowledge gaps in several relevant clinical and epidemiological aspects of the disease.

Thus, in the last years there has been a growing interest in assessing different aspects of Q fever, leading to an increase in research and surveillance activities by public agencies and international organizations. However, although Q fever is current a disease subjected to mandatory reporting in many countries, in most of them there are no official surveillance programs, what results in a lack of knowledge about the real situation of Q fever in domestic ruminants in many regions where the prevalence of the disease is considered subestimated.

Several regions in Spain, such as the Basque Country or the Canary Islands, have reported multiple human cases in the last decades, sometimes as outbreaks. Because of this there has been a stronger focus on the study of Q fever in domestic ruminants in these



areas. However, there are many other regions in Spain where the information about Q fever in domestic ruminants is lacking in spite of the multiple human cases notified in them.

In this context, the objective of the present work was to determine the epidemiological situation of Q fever in domestic ruminants in the central region of Spain - Castilla y León and Madrid regions –, areas with an important livestock activity but in which the information about Q fever was almost inexistent.

In order to achieve this objective three studies were performed: study 1, focused on sheep from Castilla y León from 2009 to 2012; study 2, in cattle from Madrid in 2009; and study 3, in small ruminants from Madrid in 2011.

Sheep included in the study 1 were selected among those included in the framework of a tularemia surveillance program in lagomorphs and other species ("*Procedimiento Integral de Investigación Epidemiológica de Tularemia y otras Zoonosis Asociadas a Roedores Silvestres y Lagomorfos de la Comunidad Autónoma de Castilla y León*") in 2009-2012. Animals included in studies 2 and 3 were selected among those sampled in the framework of the National Programs of eradication of bovine and small ruminant brucellosis, respectively.

All three studies were based on the analysis serum samples to determine the level of exposure to *C. burnetii* in the livestock populations. Samples were tested using a commercial ELISA kit, allowing to estimate the seroprevalence of *C. burnetii* infection in the selected species and regions of study. In addition, we collected information about the location of the farms and the characteristics of the animals (studies 2 and 3) and farms (studies 1, 2 and 3) sampled, as well as of counties from which the farms originated (study 1).

The results of the three studies demonstrated that exposure to *C. burnetii* in all domestic ruminant populations evaluated was widespread. In study 1 we observed during the 2009-2012 period prevalences around 50% and 10% at the herd and individual level, respectively, although a particularly high value was detected in 2012 (76% and 21% at the herd and individual level).

In studies 2 and 3 the herd-level estimated prevalence rates were around 30% in cattle and 47% in small ruminant. Prevalence values at the individual level were 7% in cattle, 14% in sheep and 22% in goats, suggesting a higher level of exposure to *C. burnetii* in small ruminants than in cattle.

The serological results were analyzed in combination with the data on the geographic location of the farms to evaluate the spatial distribution of Q fever in sheep in Castilla y León (study 1) and cattle (study 2), sheep and goats (study 3) in Madrid. In addition, the possible presence of clustering at the global and local levels was also assessed.

In study 1 we observed that the distribution of positive sheep and flocks at the county level was indicative of global and local spatial clustering during the four years of the study, so that neighboring counties of a positive county had a higher probability of testing positive (up to the fourth level of neighborhood). Also, a high incidence cluster located in the same region was identified in all four years.

The spatial pattern observed in Madrid was less clear than in Castilla y León. The presence of global clustering in the distribution of positive cattle herds was identified up to the first level of neighborhood, but no evidence of global clustering was found for small ruminants. Similarly, no significant local clusters were found for both all cattle and small ruminant herds. This fact could be due in part to the high percentage of positive farms in the Madrid region, what could hamper the ability of the tests to identify spatial patterns.

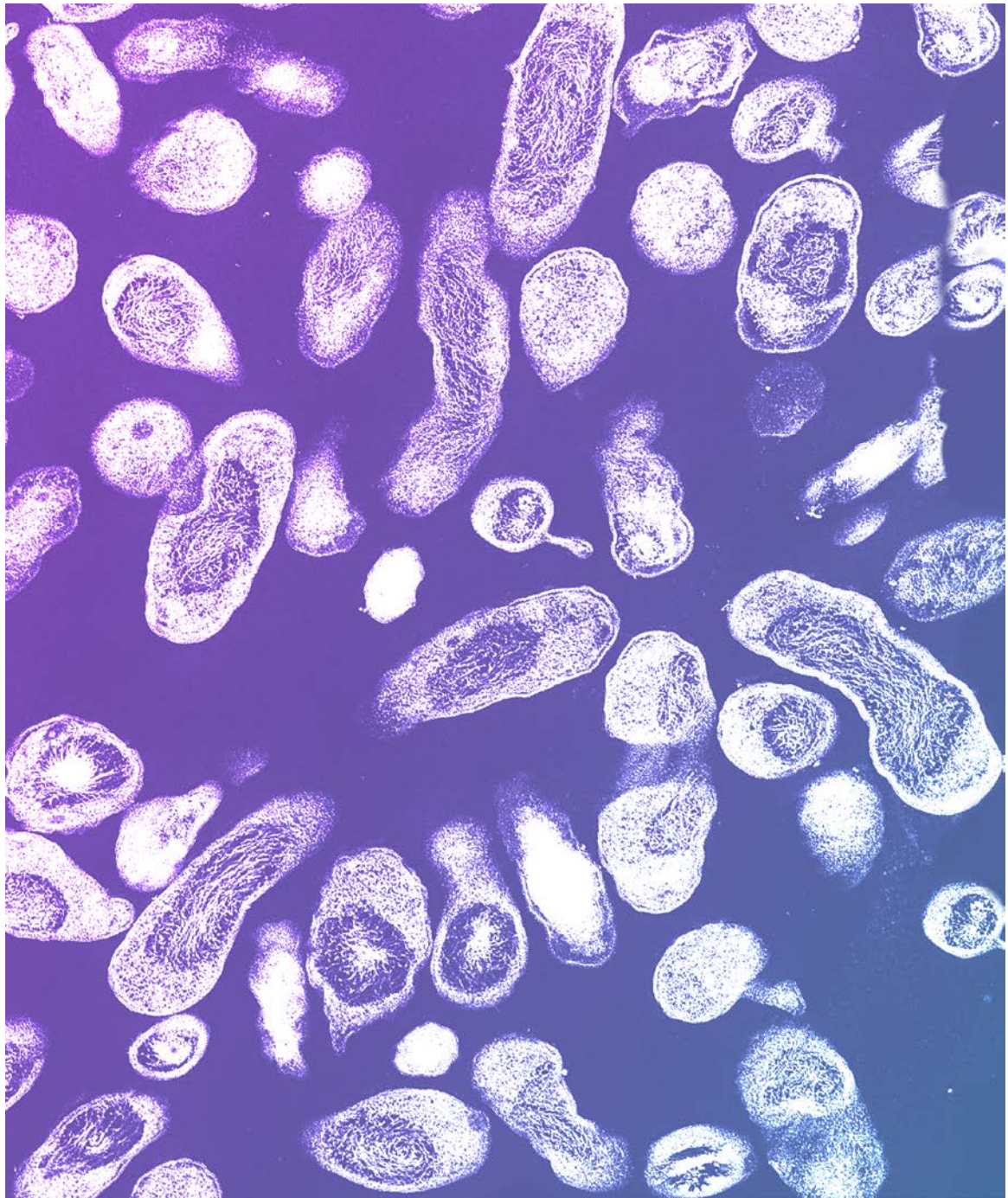
Finally, a risk factor analysis was conducted in the three studies by looking at county, herd and individual characteristics potentially associated with the results obtained in the serological analysis. A Bayesian approach was applied in study 1 while frequentist multivariable models were fitted for studies 2 and 3.

In study 1, the risk of seropositivity in sheep of Castilla y León was associated, depending on the year, to the productive type (2009-2011), flock size (2009-2011) and intensive management practices (2011 and 2012). Thus, a higher risk was identified in sheep from dairy flocks, under an intensive/mixed management and with a higher census, which is in accordance with other studies on Q fever performed in domestic ruminants. This analysis also allowed us to identify a spatial pattern in the distribution of positive cases, which was only partially explained by the density of small ruminants from the county of origin of the farm.

In studies 2 and 3 the risk of seropositivity in cattle and small ruminant farms from Madrid was associated, with the productive type, suggesting a higher risk in dairy farms as also found in Castilla y León. In addition, larger census was also identified as a significant risk factor for bovine herds. Regarding the individual variables, only the age of the animals was found to be significantly associated with the serological status, so that older animals had an increased risk of testing positive in the ELISA assay, what could be related with a longer

chance of exposure to *C. burnetii*. This risk factor has also been previously reported in other studies.

Overall our results demonstrate that exposure to *C. burnetii* in the domestic ruminants' species studied in Castilla y León and Madrid is widespread. In addition, a spatially uneven distribution of the risk of seropositivity was observed, particularly in the case of Castilla and Leon. This information, together with the risk factors identified in each of the areas of study, could be useful to design surveillance programs for Q fever with the purpose of controlling and decreasing the exposure to the bacteria as well as preventing potential transmiss



## INTRODUCCIÓN



## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. FIEBRE Q. GENERALIDADES

#### 2.1.1. Descripción del agente etiológico: *Coxiella burnetii*

##### 2.1.1.1. Reseña histórica

El aislamiento de la bacteria *Coxiella burnetii*, agente etiológico de la fiebre Q, tuvo lugar de manera casi simultánea en dos regiones geográficas muy alejadas entre sí, Australia y Estados Unidos, descubriéndose poco después que se trataba del mismo agente, como se describe a continuación.

Los primeros casos de fiebre Q fueron descritos por primera vez en agosto del año 1935 en Australia (Derrick, 1937). Fue concretamente en la localidad de Brisbane (Queensland), donde tuvo lugar un brote epidémico de una enfermedad febril de etiología desconocida en los trabajadores de un matadero de la citada localidad. Los análisis laboratoriales realizados resultaron negativos para todos los patógenos conocidos hasta la fecha (Baboudieri, 1959). Ante esta situación, Edward Holbrook Derrick fue requerido para investigar la etiología de dicho brote en su calidad de director del Laboratorio de Microbiología y Patología del Departamento de Salud de Queensland. Para ello, Derrick llevó a cabo una serie de pruebas experimentales consistentes en la inoculación intraperitoneal de sangre de los enfermos en cobayas de laboratorio observando que desarrollaban, al igual que los humanos, un cuadro febril. Asimismo, al inocular sangre y otros fluidos de las cobayas infectadas a cobayas sanas, estas desarrollaban la misma sintomatología, poniéndose así de manifiesto la implicación de un agente infeccioso desconocido hasta la fecha en el cuadro clínico observado en los trabajadores del matadero (Baboudieri, 1959). Dos años después, en 1937, Derrick publicó los resultados de sus investigaciones, donde denominó a la nueva enfermedad descrita *Q fever* (fiebre Q), donde la Q procedía del inglés *query*, duda o pregunta, debido a todos los interrogantes que aún quedaban por resolver respecto al agente infeccioso en ese momento (Derrick, 1937).

Inicialmente se pensó que el agente causal de la enfermedad podía ser un virus, dado que en un principio el microorganismo no pudo ser aislado y ni siquiera visualizado (Burnet y Freeman, 1983). Sin embargo, en ese mismo año, 1937, los investigadores Mcfarlane Burnet y Mavis Freeman, trabajando en colaboración con Derrick, consiguieron observar por primera vez el microorganismo causante de la enfermedad a partir de muestras del bazo de ratones infectados empleando distintas técnicas de tinción. Los organismos

observados formaban agregados de bacterias similares a rickettsias, por lo que inicialmente se denominó al agente como *Rickettsia burnetii* (Burnet y Freeman, 1983).

Paralelamente a los estudios de Derrick, Burnet y Freeman en Australia, los investigadores Herald Rea Cox y Gordon Davis investigaban el agente causal de la fiebre de las montañas rocosas en la localidad de Hamilton (Montana, EE.UU.). Estos investigadores detectaron un microorganismo filtrable a partir de una garrapata de la especie *Dermacentor andersoni* recogida en la localidad de Nile Mile Creek (Montana, EE.UU.). Sin embargo, al contrario de lo que inicialmente pensaron, no se trataba del agente causal de la fiebre de las montañas rocosas, ya que, al llevar a cabo infecciones experimentales en cobayas a partir de garrapatas infectadas, estas desarrollaban un cuadro febril sin otros síntomas típicos de dicha enfermedad (Davis, 1938). Dicho microorganismo, al que inicialmente llamaron *Nine Mile*, tenía la capacidad de transmitirse a cobayas sanas mediante la inoculación intraperitoneal de sangre de cobayas infectadas produciendo cuadros de fiebre y esplenomegalia. Dicho patógeno era una bacteria Gram-negativa y mostraba un pleomorfismo intracelular y extracelular similar al de una rickettsia, además de presentar en común con estas su naturaleza intracelular, así como tener también a las garrapatas como reservorio. Por ello, finalmente este patógeno fue incluido dentro el género *Rickettsia* y fue denominado como *Rickettsia diaporica*, por su capacidad para atravesar los filtros (donde *diaporica* hace referencia al término griego que designa la capacidad para pasar a través de un filtro) (Cox, 1939a; Davis, 1938; Wentworth, 1955). En 1938, Cox consiguió aislar y cultivar la bacteria por primera vez mediante el empleo de huevos embrionados (Cox, 1939b).

En un principio, este agente (*Rickettsia diaporica*) no se relacionó con el descrito por Derrick en Australia (*Rickettsia burneti*), siendo una infección adquirida en el laboratorio la que permitió asociar ambos aislados. En 1938, el doctor Rolla Eugene Dyer, director del *National Institute of Health* de Estados Unidos, visitó a Cox en el laboratorio de Hamilton interesándose por el uso de huevos embrionados como método de cultivo del agente. Como consecuencia de dicha visita, el doctor desarrolló días después un cuadro febril producido por la infección con el microorganismo, como se demostró al inocular la sangre del enfermo a cobayas sanas, detectándose la bacteria en el bazo de estas. Además, también se observó la existencia de inmunidad cruzada en las cobayas infectadas experimentalmente con *Rickettsia diaporica* frente al agente aislado en la sangre de Dyer. Este presentó un cuadro clínico febril muy similar al que había sido descrito previamente en los trabajadores del matadero de Brisbane, aquejados de fiebre Q debido a la infección por *Rickettsia burneti* (Marrie, 1990c; Maurin y Raoult, 1999).

La asociación definitiva entre ambos agentes pudo establecerse cuando Burnet envió a Dyer bazos de ratón infectados con *Rickettsia burneti*, el agente causal de la fiebre Q aislado en Australia, comprobándose que cuando ratones sanos de laboratorio eran infectados con dicha bacteria, quedaban protegidos frente a una segunda infección experimental con el agente previamente aislado de la sangre de Dyer, *Rickettsia diaporica*. Esta inmunidad cruzada puso de manifiesto que ambas bacterias eran en realidad dos aislados de un mismo patógeno, el agente etiológico de la fiebre Q. Finalmente, en 1938, Cornelious B. Philip propuso la creación de un nuevo género, el género *Coxiella*, formado únicamente por esta nueva especie que pasó a denominarse *Coxiella burneti*, y finalmente *Coxiella burnetii*, en honor de los investigadores Cox y Burnet (Philip, 1948a).

A partir de la información obtenida, Derrick y sus colaboradores continuaron con sus investigaciones sobre de la enfermedad. Por un lado, el cuadro clínico de la fiebre Q humana fue detallado y ampliado en una revisión publicada en el año 1973 (Derrick, 1973). Por otro lado, describieron la capacidad de esta bacteria para infectar a distintas especies de animales silvestres (Derrick, 1939; Smith, 1940) y el posible papel de los artrópodos como vectores de la enfermedad (Smith, 1940). Así, sugirieron la implicación de la especie de garrapata *Haemaphysalis humerosa* en el ciclo silvestre de la fiebre Q y su capacidad para transmitir la infección al ganado (Derrick, 1939). Asimismo, en el año 1959, una amplia revisión llevada a cabo por Baboudieri puso de manifiesto que *C. burnetii* se había detectado prácticamente en todo el reino animal (Baboudieri, 1959), si bien los rumiantes domésticos demostraron ser el principal reservorio y fuente de infección para el hombre (Baboudieri, 1959; EFSA, 2010; Marrie, 1990b). En lo que respecta a su transmisión al hombre, en 1940 se demostró que la principal ruta de transmisión era la vía inhalatoria y que algunos casos catalogados como “neumonía atípica” podían ser en realidad casos de fiebre Q (Marrie, 1990b). Por otro lado, no fue hasta 1951, en un estudio llevado a cabo en 180 casos humanos por Clark y colaboradores, cuando se observó que la fiebre Q, además de la presentación aguda observada hasta la fecha, también podía presentarse de forma crónica (Clark *et al.*, 1951). En esta línea, la primera vez que se asoció esta enfermedad con la aparición de endocarditis fue en 1960 (Marmion *et al.*, 1960), confirmándose dicha asociación en estudios posteriores (Andrews y Marmion, 1959; Evans *et al.*, 1959; Robson y Shimmin, 1959), y dando lugar a un estudio más detallado de la forma crónica de la fiebre Q.

En los primeros años tras su descripción en humanos se consideró a la fiebre Q como una enfermedad característica de Australia, describiéndose 176 casos en siete años



(Gallaher, 1961 revisado por González Sinde, 1995). Sin embargo, la posterior descripción de casos en distintas partes del mundo puso de manifiesto la amplia distribución geográfica de la enfermedad. En este sentido, se pueden destacar las epidemias de fiebre Q en tropas de soldados alemanes, así como de países aliados durante la Segunda Guerra Mundial (1941 - 1945), que adquirían la enfermedad a su paso por diversos países mediterráneos como Italia y Grecia, siendo denominada fiebre de los Balcanes (Robbins *et al.*, 1946). Sin embargo, las personas residentes en esas regiones parecían ser resistentes a la infección y, de hecho, presentaban una alta tasa de anticuerpos frente a *C. burnetii*. Esta situación puso de manifiesto que la fiebre Q ya era endémica en la cuenca mediterránea cuando fue descrita por primera vez en Australia (Wentworth, 1955). En el año 1955 la enfermedad había sido descrita en un amplio número de países y regiones en todos los continentes (Kaplan y Bertagna, 1955), ampliándose dicho número en años sucesivos hasta incluir prácticamente todo el mundo, con la posible excepción de Nueva Zelanda (Greenslade *et al.*, 2003) y la Antártida (Woldehiwet, 2004).

#### 2.1.1.2. Generalidades y encuadre taxonómico

*Coxiella burnetii* es una bacteria intracelular obligada, inmóvil y no encapsulada. A pesar de clasificarse como Gram-negativa, debido a que posee una pared celular muy similar a la de dichas bacterias (Burton *et al.*, 1975), *C. burnetii* presenta algunas peculiaridades estructurales [como la capa de peptidoglicano resistente a la lisozima adherida a la cara interna de la membrana externa de la pared celular (Burton *et al.*, 1975)], responsables de que no se tiña adecuadamente mediante la tinción de Gram (Maurin y Raoult, 1999). Por ello tradicionalmente se ha utilizado para su tinción el método Giménez (Giménez, 1965) y, en menor medida, las técnicas de Giemsa, Machiavello y Stamp (Alayo-Arrugaeta, 1986). Morfológicamente se trata de un cocobacilo de pequeño tamaño y altamente pleomórfico, con unas dimensiones de 0,2-0,4  $\mu\text{m}$  de anchura y 0,4-1  $\mu\text{m}$  de longitud (Drancourt y Raoult, 2005; Maurin y Raoult, 1999).

En cuanto a la clasificación taxonómica actual de *Coxiella burnetii* basada en la secuenciación del ARNr 16S, esta especie se encuadra dentro del filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Legionellales*, familia *Coxiellaceae* (que comprende los géneros *Coxiella*, *Rickettsiella* y *Aquicella*) y género *Coxiella* (Drancourt y Raoult, 2015; Maurin y Raoult, 1999).

Actualmente *C. burnetii* es la única especie incluida dentro de su género, aunque otra especie putativa, *C. cheraxi*, ha sido descrita en cangrejos de río (Tan y Owens, 2000).

Además, en los últimos años se ha descrito la existencia de microorganismos similares a *Coxiella* (*Coxiella-like*), que presentan un elevado grado de identidad con *C. burnetii* (91-98% de homología en la secuencia de ARNr 16S) y que hasta la fecha no han podido ser aislados en cultivo puro (Zhong, 2012). Estas bacterias han sido descritas principalmente como endosimbiontes de garrapatas, tanto ixódidos como argásidos, estando ampliamente distribuidas en estos ectoparásitos (Machado-Ferreira *et al.*, 2016). En general, se considera que el potencial patógeno de estas bacterias es limitado para hospedadores vertebrados, atribuyéndose a su genoma reducido y falta de genes de virulencia (Smith *et al.*, 2015). Sin embargo, recientemente ha demostrado la capacidad uno de estos endosimbiontes, *Candidatus* *Coxiella massiliensis*, para producir enfermedad en humanos a través de su transmisión por picadura de garrapata (Angelakis *et al.*, 2016). Asimismo, también se ha descrito la capacidad de estas bacterias similares a *Coxiella* para producir enfermedad grave en aves (Shivaprasad *et al.*, 2008; Vapniarsky *et al.*, 2012; Woc-Colburn *et al.*, 2008).

Recientemente se ha determinado mediante la técnica *multilocus DNA sequencing* que el género *Coxiella* está subdividido en cuatro clados o ramas altamente divergentes (A-D), estando *C. burnetii* incluida en el clado A. Asimismo, siguiendo los resultados obtenidos en las investigaciones filogenéticas basadas en técnicas de secuenciación masiva, se ha formulado la hipótesis de que *C. burnetii* pudiera haberse originado a partir de una bacteria *Coxiella-like* endosimbionte de garrapatas blandas y perteneciente al clado A. El material genético necesario para desarrollar sus características como patógeno de vertebrados podría haber sido adquirido por mutaciones espontáneas o bien por la incorporación de genes de virulencia transferidos por otro patógeno coinfectante de la garrapata (Duron *et al.*, 2015a).

### **2.1.1.3. Características genéticas, estructurales y de resistencia**

El genoma de *C. burnetii* fue secuenciado de forma completa por primera vez en 2003 a partir de la cepa original aislada de muestras de garrapatas por Cox y Davis en 1938 (cepa *Nine Mile* IRSA493). Hasta la fecha se ha descrito el genoma completo de otras ocho cepas más: NL3262, NLhu334593 [implicadas en el brote de Holanda (Kuley *et al.*, 2016)], Namibia, NC\_009727, NC\_010117, NC\_002971, NC\_011528 y NC\_011527 (Sidi-Boumedine, 2011; Walter *et al.*, 2014).

El genoma presenta un cromosoma circular (Seshadri *et al.*, 2003) de un tamaño reducido que oscila entre 1,5 y 2,5 Mb, dependiendo de la cepa (Porter *et al.*, 2011; Willems *et al.*, 1998). Asimismo, posee un porcentaje de G + C de entre el 41 y el 43% y está constituido

por unas 2134 secuencias codificantes de las cuales 719 (33,7%) son hipotéticas (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

En cuanto a las peculiaridades genéticas de *C. burnetii*, se han descrito cuatro tipos de plásmidos, presentes en la mayoría de los aislados y que suponen el 2% de la información del genoma: QpH1 (36 Kb) (Samuel *et al.*, 1983), QpRS (39Kb) (Mallavia, 1991), QpDG (42Kb) (Mallavia, 1991) y QpDV (33kb) (Valkova y Kazar, 1995). Aquellas cepas que carecen de alguno de estos plásmidos presentan secuencias homólogas integradas en el cromosoma (QpRS-like plasmid) (Willems *et al.*, 1998). Aunque los plásmidos parecen ser un importante factor de virulencia, su significación biológica no se conoce completamente (Porter *et al.*, 2011). Estos plásmidos se asociaron inicialmente con diferencias en la patogenicidad de las cepas en humanos (Frazier *et al.*, 1992), si bien posteriormente se demostró la inconsistencia de estas observaciones (Stein y Raoult, 1993; Thiele y Willems, 1994).

Por otro lado, a diferencia de otros patógenos intracelulares similares como *Rickettsia* (Ogata *et al.*, 2001) o *Chlamydia* (Seshadri *et al.*, 2003), *C. burnetii* posee numerosas secuencias de inserción presentes en un elevado número de repeticiones. Dichas secuencias están asociadas a la plasticidad genómica de *C. burnetii* (Beare *et al.*, 2009), que a su vez se relaciona con la virulencia, como se ha observado en otros microorganismos intracelulares como *Yersinia pestis* (Parkhill *et al.*, 2001). Así, cabe destacar la secuencia de inserción IS1111, con un número de copias altamente variable entre cepas que oscila entre siete y 110 (Klee *et al.*, 2006b) y que constituye la diana más frecuentemente utilizada para la detección de *C. burnetii* mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real (Jones *et al.*, 2011; Klee *et al.*, 2006b).

Por otra parte, cabe destacar que *C. burnetii* puede presentarse en **dos formas antigénicas diferentes** que muestran distinto grado de virulencia: fase I y fase II. Este cambio de fase se basa en la capacidad de variación antigénica del lipopolisacárido (LPS) de superficie de la membrana externa de la pared celular, fenómeno descrito también en ciertas enterobacterias (Amano y Williams, 1984) y otras bacterias Gram-negativas como *Brucella* spp. (Cardoso *et al.*, 2006).

La fase I, virulenta y altamente infecciosa, se caracteriza por presentar el LPS completo en su superficie (Moos y Hackstadt, 1987), denominado LPS liso en otras bacterias Gram-negativas. Este LPS completo es capaz de inducir la producción de citoquinas inflamatorias en macrófagos (Dellacasagrande *et al.*, 2000; Tujulin *et al.*, 1999), si bien su capacidad endotóxica es entre 100 y 1000 veces menor a la descrita para el LPS de las

enterobacterias (Amano *et al.*, 1987). Esta es la fase natural que se encuentra en individuos infectados (personas y animales, incluidos artrópodos) (Setiyono *et al.*, 2005).

La fase II, por su parte, presenta una virulencia reducida y un LPS incompleto, que correspondería con el LPS rugoso en las bacterias Gram-negativas. Este LPS se caracteriza por la pérdida de las cadenas de azúcares de virenosa, dihidrohidroxiestreptosa y galactosaminuronil- $\alpha$ -glucosamina disacárido presentes en la cadena O del LPS propio de la fase I (Hoover *et al.*, 2002; Hotta *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003; Toman *et al.*, 2009).

Este cambio de fase se produce por una deleción genética espontánea de 25 992 pares de bases en la que están implicados distintos genes y regiones (Hoover *et al.*, 2002; Setiyono *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2003) que se produce durante la multiplicación de la bacteria (Delsing *et al.*, 2011) y que se puede inducir mediante pasajes seriados en cultivos celulares no inmunocompetentes o en huevos embrionados (Denison *et al.*, 2007a; Setiyono *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2003). La transición entre las dos fases es quizá una estrategia empleada por *C. burnetii* para eludir la respuesta inmune del hospedador; así la fase I es internalizada con dificultad por los monocitos y los macrófagos, aunque posee la capacidad de sobrevivir y multiplicarse eficazmente dentro de estos (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Raoult *et al.*, 2005). Por el contrario, la fase II es fagocitada de forma eficiente por dichas células, pero a su vez es rápidamente eliminada en el fagolisosoma (Mege *et al.*, 1997). Estas diferencias en la capacidad de sobrevivir dentro de los monocitos y macrófagos se han asociado al tipo de receptor a través del que se produce la entrada de cada fase antigénica en la célula: el receptor CR3 en el caso de la fase II y los complejos LRI (*leucocyte response integrin*,  $\alpha_v\beta_3$ ) e IAP (*integrin-associated protein*) en el caso de la fase I (Mege *et al.*, 1997).

Esta variación de fase posee importancia tanto en el diagnóstico serológico como en la elaboración de vacunas. Así, aunque ambas fases son microscópicamente indistinguibles, pueden diferenciarse mediante anticuerpos específicos: en las fases agudas de la infección se detectan altos niveles de anticuerpos (IgG e IgM) anti fase II, dirigidos frente a proteínas de superficie (Marrie y Raoult, 1997), que se producen de forma más precoz y en mayor cantidad que los anticuerpos anti fase I, dirigidos frente al LPS, que se detectan principalmente en la fase crónica de la infección (Setiyono *et al.*, 2005) y presentan una mayor capacidad protectora.

Este fenómeno se debe a que, aunque en los organismos de fase I también están presentes las citadas proteínas de superficie, el LPS completo de la fase I de *C. burnetii*

bloquea la unión de los anticuerpos frente a dichas proteínas (Hackstadt, 1988), lo que dificulta la acción de una respuesta inmune humoral eficaz. Por ello, la infección aguda está marcada por el desarrollo de IgG dirigidas principalmente frente a antígenos de fase II. Cuando la infección no es eliminada por el sistema inmune y la fase I de *C. burnetii* persiste (en la infección aguda), se desarrollan altos títulos frente a la fase I de la bacteria (Delsing *et al.*, 2011).

Cabe citar que las vacunas inactivadas producidas a partir de organismos de fase II ofrecen una protección muy limitada, por lo que para la producción de vacunas actualmente se utiliza la fase I de la bacteria (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; van den Brom *et al.*, 2015c).

Por otro lado, en el ciclo vital de *C. burnetii* están descritas tres variantes celulares: la variante celular grande o LCV (del inglés *large cell variant*), la variante celular pequeña o SCV (del inglés *Small Cell Variant*) y la variante celular pequeña y densa o SDC (del inglés *Small Dense Cell*) (Heinzen *et al.*, 1999; McCaul y Williams, 1981; McCaul *et al.*, 1991b). Estas variantes presentan diferencias morfológicas, antigénicas y de resistencia a agentes físicos y químicos (Heinzen *et al.*, 1999). El LPS anteriormente citado está presente en todas las variantes, si bien está principalmente asociado a la SCV. Esta formación de diferentes formas celulares es una estrategia característica de *C. burnetii* para sobrevivir tanto fuera como dentro del hospedador (Coleman *et al.*, 2007). Así, cada una de estas formas expresa diferentes antígenos proteicos que son reconocidos por anticuerpos producidos durante la infección (Heinzen *et al.*, 1991; Heinzen *et al.*, 1999; Hellenbrand *et al.*, 2001b; Seshadri *et al.*, 1999). Este cambio de expresión de unos antígenos a otros permite a la bacteria eludir la respuesta inmune del hospedador (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; McCaul y Williams, 1981).

La SCV es la forma extracelular y metabólicamente inactiva, que se encuentra en el medioambiente. Presenta una longitud de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ , forma bacilar y posee un núcleo electrodenso (McCaul y Williams, 1981; Seshadri *et al.*, 1999). Asimismo, presenta un 32% de peptidoglicano en el espacio periplasmático localizado entre la membrana externa y la interna de la pared celular (a diferencia de la variante LCV, que contiene únicamente un 2%), lo que le confiere estabilidad y resistencia ambiental (Amano y Williams, 1984) (McCaul y Williams, 1981). La forma SDC, también presente en el medioambiente y metabólicamente inactiva, es muy similar morfológicamente a la SCV, si bien presenta una mayor estabilidad física (McCaul *et al.*, 1991a). Ambas variantes son la que infectan a los hospedadores, siendo fagocitadas por los monocitos en primera instancia y

penetrando en el interior de los macrófagos de los tejidos, que son las principales células diana para *C. burnetii* (Amara *et al.*, 2012). Así, se produce una unión de la membrana de la bacteria a la membrana de la célula eucariota, se forma un lisosoma que se fusiona con un fagosoma, diferenciándose las SCV y SDC a LCV en el interior del mismo por fisión binaria. Este proceso tiene lugar en un ambiente ácido (pH 4,5 - 5,5) que permite la activación del metabolismo de la bacteria, siendo esta necesidad de desarrollarse en un medio ácido teóricamente adverso característico de *C. burnetii* y *Francisella tularensis*, entre otras bacterias (Hackstadt y Williams, 1981; Howe y Mallavia, 2000). Ambas formas, SCV y SDC, están también consideradas como formas de persistencia en el hospedador, como se describe más adelante (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

La LCV por su parte presenta una forma pleomórfica y un tamaño de aproximadamente 1-2  $\mu\text{m}$ , con una estructura similar a las bacterias Gram-negativas en lo referente a su pared celular, presentando el LPS de la membrana externa de la pared celular expuesto a la superficie. Esta es la forma intracelular, metabólicamente activa y replicativa de *C. burnetii*. Durante la fase de multiplicación exponencial de la bacteria en el interior de la célula las formas LCV se transforman en SCV, que se localizan en el espacio periplasmático, y en SDC, que pueden visualizarse dentro de las LCVs como endosporas o pseudoendosporas (*spore-like* en inglés) situadas en los polos de las LCV (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; McCaul y Williams, 1981). De hecho, se considera que la formación de estas SDC se asemeja a un proceso similar al de la esporulación clásica, habiéndose descrito en la cepa *Nine Mile* la existencia de una secuencia con gran homología con el gen *spoIIIE*, implicado en la esporulación de *Bacillus subtilis*. Sin embargo, estas endosporas presentan importantes diferencias respecto a los esporos de las bacterias Gram-positivas, ya que no se tiñen con los tintes utilizados para la visualización de estas y carecen de ácido dipicolínico, componente presente en los esporos de las Gram-positivas (McCaul y Williams, 1981).

Finalmente, ambas formas SDV y SDC son liberadas de la célula por exocitosis o por la lisis de las LCV, cerrando el ciclo biológico de *C. burnetii*. Cabe citar que aún a día de hoy existen bastantes incógnitas respecto a cuál es el proceso que induce el paso de LCV a SCV y SDC. Asimismo, se desconoce cuáles de estas formas son las que se excretan en la leche, heces o placenta de los animales infectados (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

Como se ha citado previamente, *C. burnetii* presenta una alta **resistencia en el medioambiente**, lo cual puede dar lugar a la aparición de brotes asociados a un

determinado origen mucho tiempo después a la excreción por parte de un hospedador infectado (van Woerden *et al.*, 2004). Así, las formas de resistencia ambientales SCV y SDC de la bacteria son capaces de sobrevivir a la acción de distintos agentes físicos y químicos, como las altas temperaturas, la desecación, la radiación UV, la sonicación, la presión, el estrés osmótico y oxidativo, la acidez y la salinidad (Amano y Williams, 1984; EFSA, 2010).

Asimismo *C. burnetii* también es capaz de resistir la acción de ciertos desinfectantes, especialmente si el tiempo de contacto no es el suficiente, como el hipoclorito sódico al 0,5% (100 mg de cloro activo por litro), el etanol al 50% y el lysol al 5%. También se ha demostrado que una exposición a un 5% de formalina durante 24 horas a 24°C no inactiva la bacteria (McCaul y Williams, 1981; Ransom y Huebner, 1951; Scott y Williams, 1990). Solo una exposición a concentraciones iguales o mayores al 5% durante al menos 24-48 horas, o bien una concentración del 0,5% durante 72 horas al permite inactivar el patógeno (Scott y Williams, 1990). En esta misma línea, Maurin, Raoult y colaboradores (Maurin y Raoult, 1999) comprobaron que para conseguir la inactivación completa de un inóculo de  $10^8$  unidades de inclusión por ml era necesaria la aplicación de un 10% de formalina durante toda la noche. Incluso el tratamiento con vapores de formaldehído (adecuado para inactivar esporos de *Bacillus* spp.) puede llegar a ser ineficaz para la inactivación de *C. burnetii* si no se mantiene una alta humedad relativa (del 80%) durante la aplicación del mismo (Scott y Williams, 1990).

Teniendo en cuenta lo anterior, las recomendaciones actuales disponibles en cuanto a descontaminación son la siguientes: según la Opinión Científica de la EFSA (*European Food Safety Authority*) (EFSA, 2010) *C. burnetii* puede ser inactivada mediante una exposición de 30 minutos a peróxido de hidrógeno al 5%, hipoclorito de sodio al 0,5%, etanol al 70% o cloroformo al 5% (Frangoulidis, 2010; Waag *et al.*, 1997). Por otra parte, en el Reino Unido los manuales de la Agencia de Protección de la Salud sugieren el uso de formaldehído al 2%, lysol al 1%, peróxido de hidrógeno al 5%, etanol al 70% o cloroformo al 5% para la descontaminación de superficies. Para derrames o para descontaminar material recomiendan el uso de peróxido al 5% o bien soluciones basadas en fenol (Porter *et al.*, 2011). En cualquier caso, ha de tenerse en cuenta que la eficacia de los distintos desinfectantes puede verse limitada por la presencia de materia orgánica en aquellos materiales y superficies que sean sometidos a un tratamiento químico.

En cuanto a su supervivencia en el medio ambiente, *C. burnetii* es capaz de mantener su capacidad infectiva desde meses a años en el polvo (Delsing *et al.*, 2011; NABC., 2010)

y en el suelo (Frangoulidis, 2010 revisado por EFSA, 2010). Otros ejemplos de su capacidad de supervivencia en distintos medios incluyen periodos de 30 días en esputo, 49 días en orina desecada, 12 meses en purines, 16 meses en lana, 36 meses en agua y hasta dos años en heces de garrapatas (revisado por Pascual-Velasco, 1996; NABC., 2010 revisado en EFSA, 2010; Piñero *et al.*, 2014a). *C. burnetii* puede mantenerse viable durante meses también en los equipos de trabajo en explotaciones infectadas, en prendas de ropa y cazado contaminados, así como en el heno (EFSA, 2010). Cabe citar a este respecto también un estudio (Kersh *et al.*, 2013) donde se evaluó mediante PCR la presencia del ADN de la bacteria en el aire en las inmediaciones de una explotación de cabras un año después de un brote, detectándose niveles de 98 equivalentes de genoma por cada 500 litros de aire. Por otro lado, también se ha observado la capacidad de *C. burnetii* para sobrevivir, multiplicarse y dar lugar a las formas de resistencia extracelular de la bacteria en el interior de amebas de vida libre (La Scola y Raoult, 2001) de manera similar a lo descrito para las bacterias del género *Legionella* (Rowbotham, 1980), filogenéticamente próximo a *C. burnetii* (Weisburg *et al.*, 1985). De este modo, las amebas de vida libre podrían actuar como reservorio de *C. burnetii* en la naturaleza e incluso se ha sugerido la posible transmisión de la enfermedad a través del aire acondicionado de manera similar a lo descrito para la legionelosis (Raoult, 2010).

*C. burnetii* es capaz de sobrevivir en la leche, una importante vía de excreción de la bacteria (Maurin y Raoult, 1999), hasta 42 días a 4-6°C (NABC., 2010). Estudios realizados durante la década de los 50 pusieron de manifiesto también la capacidad de *C. burnetii* de sobrevivir hasta 60 días en mantequilla, y alrededor de los 40 días en queso (Babudieri y Moscovici, 1950; Sipka, 1958), si bien no se conoce con exactitud cómo afectan los procesos de maduración del queso a la bacteria (Gale *et al.*, 2015).

*C. burnetii* también es capaz de sobrevivir a bajas (-20°C durante más de dos años) (Baboudieri, 1959) y altas temperaturas, incluyendo los antiguos métodos de pasteurización de leche de vaca basados en la aplicación de 61,66°C durante 30 minutos y eficaces en la eliminación de otros microorganismos (Enright *et al.*, 1957). Estudios realizados para determinar la combinación de temperatura y tiempo adecuados para poder eliminar el patógeno en leche demostraron que un tratamiento de 71,66°C durante 15 segundos (Enright *et al.*, 1957) o de 85°C durante siete segundos (revisado por Pascual-Velasco, 1996) permitía la eliminación de la bacteria. Actualmente existen dos métodos de pasteurización internacionalmente aceptados que son capaces de inactivar completamente a *C. burnetii*: el método UHT (*ultra-high temperature*, 72°C durante no menos de 16 segundos), y el método HTST (*high temperature/short time*, 63°C durante



no menos de 30 minutos) (Anonymous, 2004). El efecto de determinados aspectos como el contenido en grasa y los sólidos de los productos lácteos en la eficacia del tratamiento térmico no ha sido caracterizado en detalle, si bien se ha descrito que en el caso de la crema de leche (40% de materia grasa) o el chocolate con leche (4% de materia grasa y 22,5% de sólidos), la aplicación de un tratamiento de 71,66°C durante 15 segundos no inactiva la bacteria a diferencia de lo que sucede con la leche, lo que hace necesaria una pasteurización de 74,4°C durante 15 segundos (EFSA, 2010).

La supervivencia de *C. burnetii* en estiércol tiene también gran importancia dada la excreción de la bacteria en heces y orina de animales infectados (Maurin y Raoult, 1999). Para conseguir la inactivación de la bacteria en el mismo se recomienda el tratamiento con cal viva o cianamida cálcica al 0,4% (Arricau-Bouvery *et al.*, 2001), o bien la realización de un tratamiento de compostaje durante seis a nueve meses realizado bajo una cobertura plástica (EFSA, 2010; Ganter, 2015)]. Precisamente la aplicación de este tipo de tratamientos al estiércol de las explotaciones caprinas del brote de Holanda de 2007 a 2011 se ha relacionado con la escasa influencia en la transmisión de *C. burnetii* a humanos que tuvieron las labores de aplicación de estiércol en los campos de labor (van den Brom *et al.*, 2015a). Para evitar la dispersión del patógeno se recomienda evitar la distribución de estiércol en el campo en días ventosos (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Se recomienda también incinerar o enterrar con cal viva los restos de fetos y placentas de animales abortados y otros materiales altamente contaminados para asegurar la total destrucción de la bacteria (Oyston y Davies, 2011).

La citada resistencia de la bacteria, su capacidad de transmitirse por vía aerógena (Baboudieri, 1959), la posibilidad de ser transportada largas distancias por el viento en forma de aerosoles [hasta 18 km (Hawker *et al.*, 1998)], su baja dosis infectiva [una única bacteria es capaz de dar lugar a la enfermedad por vía aerógena tanto en cobayas como en personas según distintos estudios (Brooke *et al.*, 2013; Jones, 2006; Tigertt *et al.*, 1961), mientras que respecto a humanos Brooke y colaboradores estimaron la dosis mínima infectiva en personas en diez o menos bacterias (Brooke *et al.*, 2015)] y su capacidad de producir brotes en personas dando lugar a un cuadro clínico debilitante (Schneeberger *et al.*, 2014), son las características que hacen que *C. burnetii* sea considerada como un arma biológica potencial (Oyston y Davies, 2011), motivo por el que está incluida en la lista B de agentes que podrían ser usados en un ataque bioterrorista del Centro de Control de Enfermedades (CDC, *Center For Disease Control and Prevention*) de los Estados Unidos (<https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp>). Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que si se aerosolizan 50 kg de *C.*

*burnetii* en un área urbana con 500 000 habitantes, podrían tener lugar 125 000 casos de fiebre Q aguda, 9000 casos de fiebre Q crónica y 150 muertes (World Health Organization, 1970).

## **2.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD**

### **2.2.1. Distribución geográfica y rango de hospedadores**

La fiebre Q es una enfermedad ampliamente distribuida que se ha descrito tanto en el hombre como en animales en prácticamente todo el mundo (Maurin y Raoult, 1999) con la excepción de Nueva Zelanda y la Antártida, como se ha citado previamente (Greenslade *et al.*, 2003). Esta enfermedad afecta sobre todo al hombre y al ganado caprino, ovino y bovino, de hecho, actualmente *C. burnetii* se considera un patógeno endémico en estas especies animales en toda Europa (EFSA, 2010), que son a su vez los principales reservorios y fuente de infección para el ser humano (EFSA, 2010; Maurin y Raoult, 1999; OIE, 2016). Sin embargo, *C. burnetii* tiene un amplio rango de hospedadores y está presente en prácticamente todo el reino animal (Baboudieri, 1959; Maurin y Raoult, 1999). Así, existen evidencias de infección por esta bacteria en otros rumiantes domésticos como búfalos (Perugini *et al.*, 2009) o camélidos (Mentaberre *et al.*, 2013; Njeru *et al.*, 2016), y también en otros mamíferos domésticos como gatos, perros, conejos, caballos, palomas o cerdos que, con excepción de estos últimos, también han mostrado su capacidad de transmisión de la fiebre Q al hombre en determinados escenarios (Buhariwalla *et al.*, 1996; El-Mahallawy *et al.*, 2016a; Marenzoni *et al.*, 2013; Shapiro *et al.*, 2016; Stein y Raoult, 1999). De hecho, los gatos domésticos han demostrado tener un papel epidemiológico relevante en la transmisión de la fiebre Q al hombre en Canadá (Marrie *et al.*, 1988). La presencia de la enfermedad también se ha descrito en distintas especies de aves domésticas, como gallinas (Muramatsu *et al.*, 2006; Tatsumi *et al.*, 2006), pavos, gansos y patos (Raska y Syrucek, 1956; To *et al.*, 1998b). Por otro lado, el contacto con *C. burnetii* también se ha observado en multitud de especies silvestres de distintos tipos de ecosistemas (revisado por González-Barrio, 2016), bien de forma directa por detección de la bacteria o indirectamente por la presencia de anticuerpos específicos en gran variedad de especies silvestres en todo el mundo, principalmente rumiantes, pero también jabalíes, carnívoros (como zorros, coyotes, felinos, visones, mapaches, osos, nutrias, focas y leones marinos), murciélagos, canguros, perezosos, conejos, liebres y roedores (como ratones, ratas, topes y ardillas) (revisado por González-Barrio, 2016). Asimismo, también se ha observado la presencia de *C. burnetii* en aves silvestres de distintas especies (desde aves rapaces, acuáticas, palomas, córvidos y numerosas passeriformes) (revisado por González-Barrio, 2016).

Puntualmente también se ha descrito el contacto con *C. burnetii* en anfibios y reptiles, así como en peces (revisado por González-Barrio, 2016). En la mayoría de los casos los animales silvestres son portadores asintomáticos que, si bien no desarrollan sintomatología clínica, actúan como reservorios y contribuyen a mantener y dispersar la bacteria en el medio ambiente, aunque el papel epidemiológico de muchas especies en el ciclo de la enfermedad es aún desconocido. Además, este patógeno también está presente en artrópodos, principalmente en numerosas especies de garrapatas duras y blandas (revisado por González-Barrio, 2016) [pudiendo afectar a más de 40 especies según un estudio realizado a mediados del siglo pasado (Baboudieri, 1959)] y cuyo papel en la epidemiología de la enfermedad se recoge en la sección 2. 2. 3. 1. Puntualmente también ha podido detectar la presencia de *C. burnetii* en pulgas recogidas en ratas, liebres y zorros (revisado por González-Barrio, 2016), moscas (Nelder *et al.*, 2008) y ácaros (Baboudieri, 1959), aunque se desconoce el papel de estos artrópodos en el ciclo de la enfermedad.

En España, la infección por *C. burnetii* se ha descrito mediante detección por PCR en distintas especies silvestres, como en ciervo rojo (Astobiza *et al.*, 2011c; González-Barrio *et al.*, 2015c), jabalí (Astobiza *et al.*, 2011c; González-Barrio *et al.*, 2015a), mapache (González-Barrio, 2016), conejo (González-Barrio *et al.*, 2015b), liebre (Astobiza *et al.*, 2011c), rata (Jado *et al.*, 2012), ratón de campo (González-Barrio *et al.*, 2016a), buitre leonado (Astobiza *et al.*, 2011c) y milano negro (Astobiza *et al.*, 2011c). Asimismo, en otras especies de rumiantes silvestres como en la cabra montés (Santiago-Moreno *et al.*, 2011) y el muflón (López-Olvera *et al.*, 2009) se ha evidenciado el contacto con el patógeno ante la detección de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii*.

Por otro lado, y en relación con la alta resistencia y persistencia ambiental de *C. burnetii* anteriormente descrita, la bacteria también ha sido ampliamente detectada en muestras ambientales como suelo, polvo y aire tomadas en distintas regiones geográficas y en diversas localizaciones, tanto asociadas a explotaciones de rumiantes como no asociadas, incluyendo zonas urbanas (Alonso *et al.*, 2015; Bielawska-Drozd *et al.*, 2014; de Rooij *et al.*, 2016; Kersh *et al.*, 2013; Nusinovici *et al.*, 2015c; Piñero *et al.*, 2015; Shabbir *et al.*, 2016; Tozer *et al.*, 2014).

En términos generales, la información disponible sobre la distribución y niveles de prevalencia de *C. burnetii* en distintas regiones en distintas especies ha sido limitada, dado que tradicionalmente se consideraba que esta enfermedad tenía un impacto económico menor en la producción de rumiantes domésticos (Woldehiwet, 2004), si bien

ha demostrado ser capaz de producir importantes fallos reproductivos en determinadas circunstancias, como se desarrolla en la sección 2. 3. Además, no fue hasta el importante brote de fiebre Q humana asociado a cabras en Holanda iniciado en 2007, con más de 4000 casos diagnosticados (Morroy *et al.*, 2016), cuando se tomó verdadera consciencia de las importantes consecuencias que esta enfermedad puede ocasionar en salud pública y el papel los rumiantes domésticos en la misma. Así, a partir de dicho brote se incrementó el interés en el estudio de la fiebre Q por parte de la comunidad científica y las administraciones públicas. Esto se tradujo en un incremento de los trabajos de investigación sobre este patógeno, incluyendo los relacionados con la distribución y prevalencia de la bacteria en diferentes regiones, principalmente en caprino, ovino y bovino (Guatteo *et al.*, 2010), pero también en diversas especies salvajes. Así, en las Tablas 1 - 6 se recogen algunos de los principales trabajos sobre prevalencia de la enfermedad en las tres citadas especies domésticas en distintos países del mundo, con excepción de España, donde la información disponible se resume en las Tablas 12 - 14 de la sección 3. 8. Como puede observarse, las prevalencias en las tres especies son ampliamente variables dependiendo de la región de estudio. Así, en el caso del ganado bovino, los valores medios de acuerdo a los resultados mostrados por los estudios aquí recogidos (incluyendo los datos de España), fueron del 20% individual (95% IC = 10,5% - 29,6%) y del 43% en rebaño (95% IC = 25,9% - 60,9%). En el caso del ganado ovino, por su parte, dichas prevalencias medias fueron del 13% individual (95% IC = 9,7% - 15,6%) y del 38% en rebaño (95% IC = 27,1% - 49,9%). Finalmente, en cuando al caprino, los niveles medios fueron del 19% individual (95% IC = 15,1% - 23,4%) y 33% en rebaño (95% IC = 15,7% - 43,9%).

Un trabajo de revisión (Guatteo *et al.*, 2010) en el que se evaluaban los distintos estudios de seroprevalencias disponibles hasta 2010, mostró valores similares para el caso del bovino (20% individual y 37,7% en rebaño), y ligeramente más bajos que los actuales para pequeños rumiantes (con un 15% y 25% de seroprevalencia media individual y de rebaño, respectivamente).

En cualquier caso, la ausencia de programas de vigilancia y control de la fiebre Q en rumiantes domésticos en la mayoría de los países hace que siga sin conocerse con exactitud la verdadera distribución de la enfermedad y en general se considera que su prevalencia está subestimada (Guatteo *et al.*, 2010). Asimismo, la falta de armonización respecto al diseño de los estudios (que en una importante proporción de casos presentan limitaciones), a las técnicas diagnósticas empleadas y a los criterios de interpretación de las mismas, hacen que la comparación entre los mismos sea complicada (Guatteo *et al.*,

2010). Así, la EFSA en su Opinión Científica sobre fiebre Q señalaba como una de sus recomendaciones la necesidad de armonizar el diagnóstico de la enfermedad en rumiantes domésticos (EFSA, 2010).

**Tabla 1.** Resumen de los principales estudios basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en muestras de suero de ganado bovino en distintas regiones del mundo. AG = aglutinación. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

País	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Referencia	
	Individual (nº de muestras analizadas)	Rebaño (nº de rebaños analizados)			
América	Canadá	33 (75)	-	IFI	(Hatchette <i>et al.</i> , 2002)
		24 (214)	-	IFI	(Lang, 1989)
		-	67 (200)	ELISA	(Lang, 1988)
	México	28 (450)	-	ELISA	(Salinas-Melédez <i>et al.</i> , 2002)
	Trinidad y Tobago	4 (256)	-	AG	(Adesiyun y Cazabon, 1996)
	Ecuador	13 (2668)	47 (386)	ELISA	(Carbonero <i>et al.</i> , 2015)
Europa	Colombia	25 (357)	-	FC	(de Ruiz, 1977)
		5 (524)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)
	Irlanda	6 (444)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
		6 (1582)	48 (273)	ELISA	(McCaughey <i>et al.</i> , 2010)
		15 (1183)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
	Bélgica	14 (4657)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
		15 (1233)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015b)
		14 (4008)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015b)
		7 (77)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2014)
		14 (1126)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
		16 (2762)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
		10 (ND)	-	ELISA	(Naesens <i>et al.</i> , 2012)
	Suiza	17 (1318)	-	FC	(Hassig y Lubsen, 1998)
	Noruega	0 (181)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)
		0 (210)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
		0 (550)	0 (55)	ELISA	(Kampen <i>et al.</i> , 2012)
	Finlandia	0 (376)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
	Dinamarca	3 (180)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)
		-	65 (40)	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
	Italia	22 (600)	-	ELISA	(Cabassi <i>et al.</i> , 2006)
14 (1188)		-	IFI	(Capuano <i>et al.</i> , 2001)	
4 (711)		-	FC	(Martini <i>et al.</i> , 1994)	
Malta	13 (12807)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)	
Polonia	0 (712)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)	
	11 (4118)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2016)	

	País	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Referencia
		Individual	Rebaño		
		(nº de muestras analizadas)	(nº de rebaños analizados)		
Asia	República Checa	9 (4539)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)
		12 (1397)	-	FC	(Literak y Kroupa, 1998)
	Eslovaquia	1 (2324)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2016)
		3 (630)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2016)
		2 (3355)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)
	Bulgaria	5 (566)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)
	Macedonia	4 (294)	-	ELISA	(Saiti <i>et al.</i> , 2014)
	Hungria	10 (542)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)
		34 (103)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
		10 (542)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)
		9 (150)	-	ELISA	(Gyuranecz <i>et al.</i> , 2012a)
		38 (300)	-	FC	(Gyuranecz <i>et al.</i> , 2012a)
		Albania	8 (571)	-	ELISA
	Chipre	24 (214)	-	IFI	(Psaroulaki <i>et al.</i> , 2006)
	Turquía	6 (416)	-	IFI	(Cetinkaya <i>et al.</i> , 2000)
	Irán	11 (93)	-	ELISA	(Khalili y Sakhaee, 2009)
	India	15 (88)	-	IFI	(Vaidya <i>et al.</i> , 2010)
	Bangladesh	6 (28)	-	ELISA	(Rahman <i>et al.</i> , 2016)
	China	29 (150)	-	ELISA	(El-Mahallawy <i>et al.</i> , 2016a)
		33 (1140)	84 (19)	ELISA	(El-Mahallawy <i>et al.</i> , 2016b)
		15 (1918)	-	ELISA	(El-Mahallawy <i>et al.</i> , 2016a)
		25 (1016)	-	ELISA	(Cong <i>et al.</i> , 2015)
		5 (988)	-	ELISA	(Doung-Ngern <i>et al.</i> , 2017)
	Tailandia	7 (130)	-	IFI	(Muramatsu <i>et al.</i> , 2014)
		4 (905)	-	ELISA	(Vongxay <i>et al.</i> , 2012)
	Corea del Sur	2 (3087)	-	IFI/ELISA	(Lyo <i>et al.</i> , 2017)
		11 (1224)	-	IFI/ELISA	(Lyo <i>et al.</i> , 2017)
Japón	40-47 (562)	-	IFI	(Hubalek <i>et al.</i> , 1993)	
	60 (207)	-	IFI	(To <i>et al.</i> , 1998b)	
Egipto	13 (1194)	100 (9)	ELISA	(Gwida <i>et al.</i> , 2014)	
Nigeria	60 (306)	-	AG	(Adesiyun <i>et al.</i> , 1984)	
Chad	8 (56)	-	ELISA	(Abakar <i>et al.</i> , 2014)	
	4 (195)	-	ELISA	(Schelling <i>et al.</i> , 2003)	
Sudan	40 (52)	-	AG	(Reinthal <i>et al.</i> , 1988)	
Camerún	-	68 (146)	ELISA	(Scolamacchia <i>et al.</i> , 2010)	
África	Togo	9 (596)	-	IFI	(Dean <i>et al.</i> , 2013)
		7 (464)	-	IFI	(Dean <i>et al.</i> , 2013)
	Costa de Marfil	14 (633)	-	ELISA	(Kanoute <i>et al.</i> , 2016)
	Kenia	11 (955)	-	ELISA	(Wardrop <i>et al.</i> , 2016)
		90 (156)	-	ELISA	(Nakeel <i>et al.</i> , 2016)
		6 (113)	-	ELISA	(DePuy <i>et al.</i> , 2014)
		28 (463)	-	ELISA	(Knobel <i>et al.</i> , 2013)

País	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Referencia
	Individual	Rebaño		
	(nº de muestras analizadas)	(nº de rebaños analizados)		
Zimbabue	39 (180)	-	IFI	(Kelly <i>et al.</i> , 1993)
	41 (274)	-	IFI	(Rhode <i>et al.</i> , 1993)
Isla de la Reunión	12 (245)	-	ELISA	(Cardinale <i>et al.</i> , 2014)
Oceania	17 (730)	-	ELISA	(Cooper <i>et al.</i> , 2013)
	0,6 (329)	-	ELISA	(Banazis <i>et al.</i> , 2010)
	0 (2181)	-	FC	(Hilbink <i>et al.</i> , 1993)

**Tabla 2.** Resumen de los principales estudios de prevalencias de fiebre Q en bovino en distintas regiones del mundo basados en la detección de ADN del patógeno o de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en muestras de tanque de leche. AG = aglutinación. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

País	Prevalencia en tanque de leche			Referencia
	% rebaños positivos mediante PCR	Serología		
		(nº de rebaños analizados)	% rebaños positivos (nº de rebaños analizados)	
Estados Unidos	61 (316)	-	-	(Bauer <i>et al.</i> , 2015)
	96 (134)	-	-	(Pearson <i>et al.</i> , 2014)
	94 (316)	-	-	(Kim <i>et al.</i> , 2005)
	-	38-92 (24)	IFI	(McQuiston <i>et al.</i> , 2005)
	-	40 (227)	AG	(Martin <i>et al.</i> , 1982)
	-	48 (273)	ELISA	(McCaughey <i>et al.</i> , 2010)
Portugal	20 (45)	38 (45)	ELISA	(Anastacio <i>et al.</i> , 2016)
	-	61 (90)	ELISA	(Pimenta <i>et al.</i> , 2015)
Reino Unido	70 (155)	-	-	(Valergakis <i>et al.</i> , 2012)
	-	21 (273)	ELISA	(Paiba <i>et al.</i> , 1999)
Francia	84 (37)	-	-	(Guatteo <i>et al.</i> , 2006)
Holanda	-	58 (566)	ELISA	(Saegerman <i>et al.</i> , 2015)
	19 (301)	82 (301)	ELISA	(van Engelen <i>et al.</i> , 2014b)
	57 (341)	79 (341)	ELISA	(Muskens <i>et al.</i> , 2012)
	-	77 (61)	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
	-	79 (224)	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
Bélgica	41 (41)	-	-	(EFSA y ECDC, 2015a)
	-	85 (59)	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015b)
	45 (29)	-	-	(EFSA y ECDC, 2015b)
	30 (50)	58 (206)	ELISA	(Czaplicki <i>et al.</i> , 2012)
	30 (150)	71 (1137)	ELISA	(Czaplicki <i>et al.</i> , 2009)
	3 (180)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)

Prevalencia en tanque de leche				
País	% rebaños positivos mediante PCR  (nº de rebaños analizados)	Serología		Referencia
		% rebaños positivos  (nº de rebaños analizados)	Técnica analítica. Observaciones	
	-	65 (26)	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
	-	59 (100)	ELISA	(Paul <i>et al.</i> , 2012)
	32 (1514)	25 (1514)	ELISA	(Angen <i>et al.</i> , 2011)
Alemania	-	8 (500)	FC	(Wittenbrink <i>et al.</i> , 1994)
	-	100 (14)	FC	(LiterakyKroupa, 1998)
Suecia	-	8 (1537)	ELISA	(Nusinovici <i>et al.</i> , 2015a)
Noruega	-	0 (3777)	ELISA	(Kampen <i>et al.</i> , 2012)
Suiza	30 (27)	-	-	(Fretz <i>et al.</i> , 2007)
	75 (20)	-	-	(Di Domenico <i>et al.</i> , 2014)
Italia	43 (780)	-	-	(Vicari <i>et al.</i> , 2013)
	60 (287)	-	-	(Vicari <i>et al.</i> , 2013)
	-	4 (711)	FC	(Martini <i>et al.</i> , 1994)
Hungría	5 (460)	-	FC Muestras individuales	(EFSA y ECDC, 2016)
	-	9 (150)	ELISA Muestras individuales	(Gyuranecz <i>et al.</i> , 2012a)
	67 (15)	-	-	(Gyuranecz <i>et al.</i> , 2012a)
Dinamarca	-	59 (100)	ELISA	(Agger y Paul, 2014)
Turquía	-	35 (48)	IFI	(Cetinkaya <i>et al.</i> , 2000)
Jordania	-	71 (78)	ELISA	(Obaidat y Kersh, 2017)
Irán	-	45 (44)	ELISA	(Khalili <i>et al.</i> , 2011)
	18 (28)	-	-	(Rahimi <i>et al.</i> , 2010)
	-	17 (12)	ELISA	(Khalili y Sakhaee, 2009)
Bangladesh	-	17 (92)	ELISA	(Rahman <i>et al.</i> , 2016)
	0,6 (620)	-	-	(Haider <i>et al.</i> , 2015)
China	1 (150)	-	-	(El-Mahallawy <i>et al.</i> , 2016a)
Tailandia	7 (60)	-	-	(Dung-Ngern <i>et al.</i> , 2017)
Isla de la Reunión	1 (ND)	-	-	(Cardinale <i>et al.</i> , 2014)
Australia	-	10 (10)	FC	(Durham y Paine, 1997)

**Tabla 3.** Resumen de los principales estudios basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en muestras de suero de ganado ovino en distintas regiones del mundo. ELISA = *enzyme-*



## INTRODUCCIÓN

*linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. AG = aglutinación. ND = no disponible.

	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Referencia	
	País	Individual (nº de muestras analizadas)			Rebaño (nº de rebaños analizados)
América	Canadá	15 (2363)	49 (72)	ELISA	(Meadows <i>et al.</i> , 2015b)
		41 (334)	89 (46)	FC	(Dolce <i>et al.</i> , 2003)
	Estados Unidos	24 (34)	-	IFI	(Hatchette <i>et al.</i> , 2002)
		17 (3642)	-	FC/AG	(McQuiston e hijos, 2002)
	México	40 (90)	-	ELISA	(Salinas-Melendez <i>et al.</i> , 2002)
	Trinidad y Tobago	0 (16)	-	AG	(Adesiyun y Cazabon, 1996)
	Brasil	75 (3)	-	IFI	(Mares-Guía <i>et al.</i> , 2014)
Europa	Irlanda del Norte	12 (1022)	62 (58)	IFI	(McCaughy <i>et al.</i> , 2009)
	Reino Unido	0,9 (5791)	10,2 (384)	ELISA	(Lambton <i>et al.</i> , 2016)
	Portugal	9 (ND)	34 (79)	ELISA	(Anastacio <i>et al.</i> , 2013)
	Holanda	19 aptitud láctea (953)	79 aptitud láctea (33)	ELISA	(Schimmer <i>et al.</i> , 2014)
		2 aptitud no láctea (5671)	31 aptitud no láctea (1344)		
		6 aptitud láctea (140)	39 aptitud láctea (13)	ELISA	(van den Brom <i>et al.</i> , 2013a)
	2 aptitud no láctea (11 912)	14 aptitud no láctea (1195)			
	Bélgica	4 (3603)	-	ELISA	(Houwens y Richardus, 1987)
		15 (27)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)
	Suiza	7 (27)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)
2 (321)		5 (100)	ELISA	(Magouras <i>et al.</i> , 2015)	
Noruega	0 (590)	0 (118)	ELISA	(Kampen <i>et al.</i> , 2012)	
Suecia	-	0 (518)	ELISA	(Ohlson <i>et al.</i> , 2014)	
Finlandia	0 (15)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	
	0 (65)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)	
Letonia	0 (27)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015b)	
Polonia	0 (3379)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)	
Italia	16 (2553)	39 (111)	ELISA	(Rizzo <i>et al.</i> , 2016)	
	38 (675)	-	ELISA	(Masala <i>et al.</i> , 2004)	
Malta	5 (20)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015b)	
República Checa	0 (17)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	
Albania	3 (293)	-	ELISA	(Cekani <i>et al.</i> , 2008a)	
Hungría	0 (105)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2016)	
	38 (50)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	

País	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Referencia	
	Individual	Rebaño			
	(nº de muestras analizadas)	(nº de rebaños analizados)			
Rumanía	3 (40)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015b)	
	0 (400)	-	FC	(Gyuranecz <i>et al.</i> , 2012a)	
	6 (400)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	
	0 (19)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015b)	
Bulgaria	0 (133)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015b)	
	-	3 (733)	FC	(EFSA y ECDC, 2015b)	
Macedonia	7 (102)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)	
	16 (390)	-	ELISA	(Saiti <i>et al.</i> , 2014)	
Grecia	-	17 (333)	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	
	10 (554)	100 (ND)	IFI	(Pape <i>et al.</i> , 2009)	
Chipre	19 (481)	-	IFI	(Psaroulaki <i>et al.</i> , 2006)	
Croacia	11 (182)	-	FC	(Morovic <i>et al.</i> , 2009)	
	5 (920)	-	FC	(Morovic <i>et al.</i> , 2009)	
Turquía	20 (743)	81 (42)	ELISA	(Kennerman <i>et al.</i> , 2010)	
	-	45 (47)	IFI	(Cetinkaya <i>et al.</i> , 2000)	
Irán	34 (127)	-	ELISA	(Ezatkah <i>et al.</i> , 2015)	
	34 (253)	88 (32)	ELISA	(Esmaeili <i>et al.</i> , 2014)	
	20 (1100)	100 (ND)	ELISA	(Asadi <i>et al.</i> , 2013)	
	24 (253)	-	ELISA	(Esmaeili <i>et al.</i> , 2013)	
Asia	Pakistán	33 (271)	77 (52)	ELISA	(Zahid <i>et al.</i> , 2016)
	India	12 (43)	-	IFI	(Vaidya <i>et al.</i> , 2010)
Bangladesh	9 (43)	-	ELISA	(Vaidya <i>et al.</i> , 2010)	
	10 (21)	-	ELISA	(Rahman <i>et al.</i> , 2016)	
China	14 (784)	-	ELISA	(Cong <i>et al.</i> , 2015)	
Tailandia	2 (48)	-	ELISA	(Doung-Ngern <i>et al.</i> , 2017)	
Japón	29 (329)	18-28 (256)	IFI	(Yoshiie <i>et al.</i> , 1991)	
Argelia	12 (213)	71 (14)	ELISA	(Khaled <i>et al.</i> , 2016)	
Egipto	23 (89)	-	IFI	(Mazyad y Hafez, 2007)	
Chad	11 (142)	43 (128)	ELISA	(Schelling <i>et al.</i> , 2003)	
Togo	14 (207)	-	ELISA	(Dean <i>et al.</i> , 2013)	
África	Gambia	19 (398)	-	ELISA	(Klaasen <i>et al.</i> , 2014)
	Costa de Marfil	9 (184)	-	ELISA	(Kanoute <i>et al.</i> , 2016)
Kenia	12 (332)	-	ELISA	(Muema <i>et al.</i> , 2017)	
	58 (80)	-	ELISA	(Nakeel <i>et al.</i> , 2016)	
	18 (159)	-	ELISA	(Knobel <i>et al.</i> , 2013)	
Isla de la Reunión	1 (137)	-	ELISA	(Cardinale <i>et al.</i> , 2014)	
Oceania	Australia	0 (50)	-	ELISA	(Banazis <i>et al.</i> , 2010)
	Nueva Zelanda	0 (30)	-	ELISA	(Hilbink <i>et al.</i> , 1993)

**Tabla 4.** Resumen de los principales estudios de prevalencias de fiebre Q en ovino en distintas regiones del mundo basados en la detección de ADN del patógeno o de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en muestras de tanque de leche. ELISA = *Enzyme-linked immunoassay*.

País	Prevalencia en tanque de leche		Serología	Referencia
	PCR (nº de muestras analizadas)	% positivos (nº de rebaños analizados)	Técnica. Observaciones	
Bélgica	13 (95)	26 (95)	ELISA	(EFSA y ECDC, 2015a)
Holanda	0 (30)	-	-	(EFSA y ECDC, 2015b)
	0 (16)	19 (16)	ELISA	(van den Brom <i>et al.</i> , 2012b)
Suiza	0 (81)	-	-	(Fretz <i>et al.</i> , 2007)
Jordán	-	52 (48)	ELISA	(Obaidat y Kersh, 2017)
Irán	6 (140)	-	-	(Rahimi <i>et al.</i> , 2011)
	0 (110)	-	-	(Rahimi <i>et al.</i> , 2010)
Turquía	0 (186)	-	Muestras de leche individuales. Rebaños sin trastornos reproductivos	(Ongor <i>et al.</i> , 2004)
	7 (214)	-	Muestras de leche individuales. Rebaños con trastornos reproductivos	
Gambia	3 (67) ovejas + cabras	-	Muestras de leche individuales	(Klaasen <i>et al.</i> , 2014)
Isla de la Reunión	0 (137)	-	Muestras de leche individuales	(Cardinale <i>et al.</i> , 2014)

**Tabla 5.** Resumen de los principales estudios basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en muestras de suero de ganado caprino en distintas regiones del mundo. AG = aglutinación. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

	País	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Referencia
		Individual	Rebaño		
		(nº de muestras analizadas)	(nº de rebaños analizados)		
América	Canadá	33 (2195)	63 (76)	ELISA	(Meadows <i>et al.</i> , 2015a)
		19 (64)	-	IFI	(Hatchette <i>et al.</i> , 2002)
	Estados Unidos	3 (608)	12 (89)	ELISA	(Bauer <i>et al.</i> , 2016)
		1 (249)	4 (24)	ELISA	(Baker y Pithua, 2014)
		42 (2624)	-	FC/AG	(McQuiston e hijos, 2002)
	México	35 (60)	-	ELISA	(Salinas-Meledez <i>et al.</i> , 2002)
	Brasil	40 (10)	-	IFI	(Mares-Guia <i>et al.</i> , 2014)
	Irlanda del Norte	9 (54)	-	IFI	(McCaughey <i>et al.</i> , 2010)
	Reino Unido	0,8 (522)	3 (145)	ELISA	(Lambton <i>et al.</i> , 2016)
		9 (54)	43 (7)	IFI	(McCaughey <i>et al.</i> , 2009)
Portugal	10 (ND)	29 (52)	ELISA	(Anastacio <i>et al.</i> , 2013)	
Holanda	8 (3134)	18 (442)	ELISA 2008	(van den Brom <i>et al.</i> , 2013a)	
	21 (2828)	47 (123)	ELISA. 2009-10	(Schimmer <i>et al.</i> , 2011)	
Bélgica	12 (25)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	
	17 (6)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	
Suiza	3 (321)	11 (72)	ELISA	(Magouras <i>et al.</i> , 2015)	
Polonia	0 (1041)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)	
Italia	16 (3185)	19 (206)	ELISA	(Rizzo <i>et al.</i> , 2016)	
	13 (2155)	47 (82)	ELISA	(Masala <i>et al.</i> , 2004)	
República Checa	0 (27)	-	ELISA	(EFSA y ECDC, 2016)	
Eslovaquia	0 (56)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2016)	
Polonia	0 (3340)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015b)	
	0 (918)	0 (48)	ELISA	(Czopowicz <i>et al.</i> , 2010)	
Hungria	0 (22)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2016)	
	0 (59)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015b)	
Albania	19 (64)	-	ELISA	(Cekani <i>et al.</i> , 2008b)	
Bulgaria	-	1 (71)	FC	(EFSA y ECDC, 2015b)	
	26 (69)	-	FC	(EFSA y ECDC, 2015a)	
Macedonia	0 (68)	-	ELISA	(Saiti <i>et al.</i> , 2014)	
Grecia	7 (61)	-	IFI	(Pape <i>et al.</i> , 2009)	
Chipre	48 (420)	-	IFI	(Psaroulaki <i>et al.</i> , 2006)	
Croacia	31 (276)	-	FC	(Morovic <i>et al.</i> , 2009)	
Asia	Omán	56 (54)	-	IFI	(Scrimgeour <i>et al.</i> , 2003)
		22 (241)	-	ELISA	(Ezatkah <i>et al.</i> , 2015)
	Irán	27 (180)	100 (ND)	ELISA	(Asadi <i>et al.</i> , 2013)
		66 (76)	100 (9)	ELISA	(Khalili y Sakhaee, 2009)

País	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Referencia
	Individual	Rebaño		
	(nº de muestras analizadas)	(nº de rebaños analizados)		
Pakistán	28 (271)	69 (52)	ELISA	(Zahid <i>et al.</i> , 2016)
India	8 (53)	-	IFI	(Vaidya <i>et al.</i> , 2010)
	6 (53)	-	ELISA	(Vaidya <i>et al.</i> , 2010)
Bangladesh	3 (30)	-	ELISA	(Rahman <i>et al.</i> , 2016)
	1 (529)	-	ELISA	(Haider <i>et al.</i> , 2015)
China	22 (150)	-	ELISA	(El-Mahallawy <i>et al.</i> , 2016a)
	12 (1440)	-	IFI/FC/ELISA	(El-Mahallawy <i>et al.</i> , 2016a)
Tailandia	4 (516)	-	ELISA	(Doung-Ngern <i>et al.</i> , 2017)
Corea del Sur	19 (597)	-	ELISA	(Jung <i>et al.</i> , 2014)
Japón	12-24 (85)	-	IFI	(Htwe <i>et al.</i> , 1992)
Argelia	15 (40)	-	ELISA	(Khaled <i>et al.</i> , 2016)
Egipto	53 (42)	-	IFI	(Mazyad y Hafez, 2007)
Chad	13 (134)	46 (28)	ELISA	(Schelling <i>et al.</i> , 2003)
Togo	8 (198)	-	ELISA	(Dean <i>et al.</i> , 2013)
Gambia	24 (490)	-	ELISA	(Klaasen <i>et al.</i> , 2014)
África Costa de Marfil	12 (91)	-	ELISA	(Kanoute <i>et al.</i> , 2016)
	26 (508)	-	ELISA	(Muema <i>et al.</i> , 2017)
Kenia	58 (80)	-	ELISA	(Nakeel <i>et al.</i> , 2016)
	32 (378)	-	ELISA	(Knobel <i>et al.</i> , 2013)
Zimbabue	10 (180)	-	IFI	(Kelly <i>et al.</i> , 1993)
Isla de la Reunión	13 (134)	-	ELISA	(Cardinale <i>et al.</i> , 2014)

**Tabla 6.** Resumen de los principales estudios de prevalencias de fiebre Q en caprino en distintas regiones del mundo basados en la detección de ADN del patógeno o de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en muestras de tanque de leche. ELISA = *Enzyme-linked immunoassay*. FC = Fijación del complemento.

País	Prevalencia en tanque de leche			Referencia
	PCR	Serología	Técnica. Observaciones	
	% positivos (nº de muestras analizadas)	% positivos (nº de rebaños analizados)		
Estados Unidos	7 (85)	-	-	(Bauer <i>et al.</i> , 2016)
	61 (316)	-	-	(Bauer <i>et al.</i> , 2015)
Brasil	100 (6)	-	Muestras individuales	(Mares-Guia <i>et al.</i> , 2014)
Holanda	0,95 (951)	-	-	(EFSA y ECDC, 2015b)
	21 (392)	-	2009	(van den Brom <i>et al.</i> , 2015b)
	0,3 (332)	-	2014	
	33 (292)	30 (292)	ELISA	(van den Brom <i>et al.</i> , 2012b)

País	Prevalencia en tanque de leche			Referencia
	PCR	Serología		
	% positivos	% positivos		
	(nº de muestras analizadas)	(nº de rebaños analizados)	Técnica. Observaciones	
Bélgica	9 (114)	-	-	(EFSA y ECDC, 2016)
	12 (60)	25 (60)	2009	(Boarbi <i>et al.</i> , 2014)
	0,7 (270)	6 (270)	2012. vacunación desde 2011	
	13 (117)	-	-	(EFSA y ECDC, 2015b)
Suiza	0 (81)	-	-	(Fretz <i>et al.</i> , 2007)
Suecia	0 (58)	0,4 (58)	ELISA	(Ohlson <i>et al.</i> , 2014)
Dinamarca	6 (800)	-	-	(Paul <i>et al.</i> , 2012)
Noruega	-	0 (348)	ELISA	(Kampen <i>et al.</i> , 2012)
Eslovaquia	-	2(136)	FC Muestras individuales	(EFSA y ECDC, 2015a)
Jordania	-	56 (23)	ELISA	(Obaidat y Kersh, 2017)
Irán	5 (110)	-	-	(Rahimi <i>et al.</i> , 2011)
	2 (56)	-	-	(Rahimi <i>et al.</i> , 2010)
Gambia	3 (67) ovejas + cabras	-	Muestras individuales	(Klaasen <i>et al.</i> , 2014)
Isla de la Reunión	5 (134)	-	Muestras individuales	(Cardinale <i>et al.</i> , 2014)

## 2.2.2. Excreción

Los animales infectados excretan *C. burnetii* principalmente durante el parto o el aborto, presentando la placenta, el feto y otros anejos fetales una alta carga infectiva. Así, se considera que en todas las especies la placenta presenta la mayor carga bacteriana (Roest *et al.*, 2012) ya que un gramo de este tejido puede contener hasta el equivalente a  $5 \times 10^8$  veces la dosis infectiva 50 para el cobaya (Welsh *et al.*, 1951). En esta misma línea, estudios actuales basados en técnicas de PCR cuantitativas ponen de manifiesto que el número de equivalentes de genoma por gramo de placenta de cabra es de 1,5 a  $2,5 \times 10^8$  (Kersh *et al.*, 2013) y de  $10^9$  copias de genoma por ml de exudado de cotiledones bovinos de animales infectados (Hansen *et al.*, 2011). Respecto a los fetos procedentes de abortos, un estudio realizado en granjas de ovino y caprino en Suiza demostró que el 25% de los fetos ovinos y el 37% de los caprinos presentaban una concentración de *C. burnetii* superior a  $10^4$  bacterias por gramo de tejido (Magouras *et al.*, 2015). Sin embargo, los animales infectados que presentan partos normales también pueden excretar una cantidad de bacterias equivalente a los animales que experimentan un aborto y por tanto

pueden constituir una importante fuente de infección (Roest *et al.*, 2012; Sting *et al.*, 2013b).

Otras vías de excreción en los animales tras el acontecimiento reproductivo son la leche, las descargas vaginales y las heces y, en menor medida, la orina y el semen (Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Arricau Bouvery *et al.*, 2003; Berri *et al.*, 2005a; Berri *et al.*, 2001; Guatteo *et al.*, 2006; Guatteo *et al.*, 2007b; Heinzen *et al.*, 1999; Joulie *et al.*, 2015; Rodolakis *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2009a). La duración y el nivel de excreción dependen de la especie animal y la vía y están sujetos a una gran variabilidad individual (Rousset *et al.*, 2009a). En cualquier caso, dicha excreción puede prolongarse durante largos periodos de tiempo (Rodolakis, 2009), llegando a meses e incluso años en animales persistentemente infectados que excretan la bacteria durante partos sucesivos (Berri *et al.*, 2007; Berri *et al.*, 2002). El patrón de excreción puede presentar una cinética continua o intermitente (Guatteo *et al.*, 2007b; Guatteo *et al.*, 2012; Sting *et al.*, 2013b), asociándose la reactivación de la excreción con los sucesivos acontecimientos reproductivos (Berri *et al.*, 2007; Berri *et al.*, 2002; Rousset *et al.*, 2009a; Rodolakis *et al.*, 2007).

En **bovino**, se ha descrito la leche como la principal vía de excreción por encima de la vaginal o a través de las heces (Guatteo *et al.*, 2012; Roest *et al.*, 2013b), y es prácticamente la única vía observada en rebaños infectados pero sin desarrollo de clínica asociada a *C. burnetii* (Guatteo *et al.*, 2007b; Rodolakis *et al.*, 2007). En esa misma línea, en un estudio se observó que el 85% de las vacas solo excretaban la bacteria por una vía (normalmente en leche) y solamente el 2% lo hacían simultáneamente por leche, heces y descargas vaginales (Beaudeau, 2006). Por el contrario, en rebaños con sintomatología clínica se ha observado que un 46% de los animales excretan simultáneamente la bacteria en leche y secreciones vaginales (Guatteo *et al.*, 2012), siendo esta la combinación de vías de excreción más frecuente cuando se produce simultáneamente por más de una vía. Sin embargo, no en todos los casos se observa el predominio de la excreción de *C. burnetii* a través de la leche. En este sentido cabe citar un estudio llevado a cabo en vacas naturalmente infectadas procedentes de 31 rebaños donde no se observó un predominio de una vía de excreción frente a otra, si bien también se observó la tendencia del bovino a excretar *C. burnetii* por una única vía, ocurriendo este fenómeno en el 65% de los animales y existiendo solo un 6,4% de animales con excreción por las tres vías citadas (leche, secreciones vaginales y heces) (Guatteo *et al.*, 2006).

Durante los tres últimos meses de gestación y en el momento del parto se produce una recrudescencia de la infección en el bovino (Harris *et al.*, 2000), lo que se traduce en un efecto sobre la duración de la excreción en leche, que es máxima en el periodo comprendido entre dos semanas antes y dos semanas después del acontecimiento reproductivo (Woldehiwet, 2004). Ese hecho podría explicarse por el estado de inmunosupresión que tiene lugar durante el periparto debido a los altos niveles plasmáticos de progesterona y cortisol, y que volvería a niveles normales en los siguientes 90 días al mismo (Harris *et al.*, 2000; Lewis, 2004). Sin embargo, la excreción puede prolongarse durante aproximadamente un año (Biberstein *et al.*, 1974; Enright *et al.*, 1957; Rodolakis *et al.*, 2007), e incluso mantenerse hasta tres años (Kim *et al.*, 2005). El bovino es la especie de rumiante doméstico en la que la excreción es más duradera, existiendo una correlación entre la serología y la excreción, de modo que animales excretores con anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* excretan la bacteria durante más tiempo que los individuos con serología negativa (Courcoul *et al.*, 2010). En heces y secreciones vaginales la duración de la excreción está en torno a los 14 días tras el acontecimiento reproductivo (revisado por Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Guatteo *et al.*, 2007b; Guatteo *et al.*, 2012). El mayor grado de excreción por vía vaginal está asociado con un mayor riesgo de excreción persistente en leche (Guatteo *et al.*, 2007b). En bovinos, en la mayoría de los casos la excreción es intermitente, habiéndose descrito patrones de excreción constante, principalmente en leche (Guatteo *et al.*, 2007a), lo que sería indicativo de que *C. burnetii* presenta un mayor tropismo por la glándula mamaria que por el tracto digestivo o el reproductor (García-Ispuerto *et al.*, 2014). De hecho, en infecciones crónicas, *C. burnetii* se localiza tanto en la glándula mamaria y ganglios linfáticos asociados como en el útero (Baboudieri, 1959; Baca y Paretsky, 1983; Ho *et al.*, 1995; Jellison *et al.*, 1948). También se ha observado que el ganado bovino tiene mayor tendencia a desarrollar infecciones crónicas con excreción persistente de la bacteria que el ganado ovino (Lang, 1990 revisado por Porter *et al.*, 2011). Solo en algunos casos se han observado patrones de excreción persistente en secreciones vaginales, asociándose este fenómeno al aborto por *C. burnetii* (Guatteo *et al.*, 2012).

La leche también ha sido considerada tradicionalmente la principal vía de excreción en **cabras** (Rodolakis *et al.*, 2007; Roest *et al.*, 2013b), si bien en un estudio se observó que no existía un predominio de la excreción por ninguna de las tres vías (leche, descargas vaginales y leche) en cabras que habían presentado un aborto debido a *C. burnetii* o estaban infectadas pero con partos normales (Rousset *et al.*, 2009a). La duración de la excreción varía ampliamente en función del individuo (Rousset *et al.*, 2009a). Así, se ha descrito que la bacteria puede detectarse en leche hasta 52 días tras el aborto (Arricau



Bouvery *et al.*, 2003) y 32 días tras el parto (Roest *et al.*, 2012), o incluso hasta tres o cuatro meses tras el acontecimiento reproductivo dependiendo del estudio (Berri *et al.*, 2007; Berri *et al.*, 2005b; Sting *et al.*, 2013b). En cuanto a las descargas vaginales, también consideradas una vía de excreción relevante en el caprino, se ha observado que *C. burnetii* se excreta en las mismas desde 14 días (Arricau Bouvery *et al.*, 2003) hasta cuatro meses (Berri *et al.*, 2007) tras el parto/aborto. En heces, considerada una vía de excreción secundaria, se ha descrito una duración media de la misma de 20 días (Arricau Bouvery *et al.*, 2003). Diversos estudios han puesto de manifiesto que la excreción en el caprino presenta mayoritariamente un carácter discontinuo (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Arricau Bouvery *et al.*, 2003; Berri *et al.*, 2007; Berri *et al.*, 2005b; Rousset *et al.*, 2009a; Sting *et al.*, 2013b). En general, se considera que la excreción en cabras naturalmente infectadas se limita a la paridera posterior a la infección (Hatchette *et al.*, 2003a), aunque en cabras infectadas experimentalmente se ha descrito una excreción en leche y descargas vaginales durante dos parideras consecutivas (Berri *et al.*, 2007).

En el caso de las **ovejas**, y a diferencia de las dos anteriores especies, se considera que la vía de excreción más importante son las descargas vaginales, seguida de las heces, y en menor medida la leche (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Astobiza *et al.*, 2009; Rodolakis *et al.*, 2007; Roest *et al.*, 2012). Sin embargo, en un estudio reciente llevado a cabo en un rebaño infectado de forma natural se observó que el porcentaje de animales excretores por heces era superior al de animales excretores por vía vaginal (75% frente a 54%) (Astobiza *et al.*, 2013). Dependiendo del estudio se ha observado que la duración de la excreción a través de secreciones vaginales oscila entre los 11-18 días post parto (Porter *et al.*, 2011) hasta las ocho, diez y 12 semanas tras el acontecimiento reproductivo (Astobiza *et al.*, 2009; Berri *et al.*, 2001; Rodolakis *et al.*, 2007), pudiendo excretarse en partos consecutivos (Berri *et al.*, 2002). Se han descrito periodos de excreción en heces muy variables que oscilan entre ocho días (Baboudieri, 1959; Berri *et al.*, 2001), 11-18 días (Marrie, 1990a revisado por Porter *et al.*, 2011), ocho semanas (Rodolakis *et al.*, 2007) y hasta cinco meses (Astobiza *et al.*, 2009), dependiendo del estudio. Respecto a la leche, los niveles de excreción son claramente menores respecto a las otras dos vías citadas (Astobiza *et al.*, 2009; Rodolakis, 2009). Así, en un estudio llevado a cabo por Rodolakis y colaboradores no se observó excreción constante en leche en ningún animal (Rodolakis *et al.*, 2007). Sin embargo, Astobiza y colaboradores observaron que, en un rebaño infectado, el 50% de las hembras excretaban *C. burnetii* por esta vía, llegándose a observar una duración de la eliminación de hasta cuatro meses en algunos casos (Astobiza *et al.*, 2009). Por otro lado, Rodolakis y colaboradores, a diferencia de lo que se describía en el bovino, no observaron ningún animal que excretara la bacteria únicamente

por una vía, siendo más común la excreción conjunta en secreciones vaginales y heces (Rodolakis *et al.*, 2007).

### 2.2.3. Transmisión

*C. burnetii* se transmite a animales y a personas principalmente por la vía respiratoria a través de la inhalación de aerosoles primarios o secundarios que se generan a partir del material contaminado (Berri *et al.*, 2005a; Berri *et al.*, 2005b; Gonder *et al.*, 1979; Maurin y Raoult, 1999; Roest *et al.*, 2012; Tigertt *et al.*, 1961; Welsh *et al.*, 1951, 1958). Los aerosoles primarios proceden principalmente de las placentas, fetos, líquido amniótico y otras secreciones contaminadas, mientras que los aerosoles secundarios son generados a partir de materiales previamente contaminados por los animales, como la cama y el estiércol (Berri *et al.*, 2003b; Delsing y Kullberg, 2008; Panaiotov *et al.*, 2009), la lana (en el caso de las ovejas) (Abinanti *et al.*, 1953), las ropas contaminadas (Marrie *et al.*, 1989) y otros fómites (Woldehiwet, 2004). A este respecto, en el caso de los animales, no puede descartarse la infección vía oral por ingestión de alimentos dentro de un ambiente con alta concentración de la bacteria, propio de granjas infectadas (Roest *et al.*, 2013b; Woldehiwet, 2004).

Diversos estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto el alto grado de presencia de *C. burnetii* en el ambiente de granjas infectadas (suelo, polvo, aire) durante un brote, así como su prolongada persistencia tras el mismo (Astobiza *et al.*, 2011a; de Bruin *et al.*, 2013; de Bruin *et al.*, 2012; de Rooij *et al.*, 2016; Hogerwerf *et al.*, 2012; Joulie *et al.*, 2015; Kersh *et al.*, 2013). De hecho, se ha señalado recientemente (Nusinovici *et al.*, 2015c) que la presencia de *C. burnetii* en el ambiente de una explotación no necesariamente está ligada a la infección activa de los animales y por tanto excreción de la misma, observación que contradice la tradicionalmente asumida alta infectividad de *C. burnetii*.

El **viento**, especialmente en conjunción con un tiempo cálido y seco, juega un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, siendo uno de los principales factores asociados a su transmisión (Maurin y Raoult, 1999; Nusinovici *et al.*, 2015a; van Leuken *et al.*, 2016), ya que puede transportar las formas de resistencia de la bacteria en material desecado hasta distancias superiores a cinco kilómetros (van der Hoek *et al.*, 2012). Por ello pueden aparecer tanto casos aislados y brotes alejados del origen de la infección, de modo que no es indispensable el contacto directo con animales para que tenga lugar el contagio. De igual forma la aparición de brotes humanos asociados a la transmisión aerógena de la bacteria a partir de granjas, mataderos, plantas de transformación de

carne y otras actividades relacionadas con la presencia de animales, como la trashumancia, ha podido ser bien documentada (Brouqui *et al.*, 2004; Carrieri *et al.*, 2002; Dupuis *et al.*, 1987; Ladbury *et al.*, 2015; O'Connor *et al.*, 2015; Tissot-Dupont *et al.*, 2004; Whelan *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2010). Así, por ejemplo, se ha descrito la transmisión de la enfermedad entre granjas por acción del viento (Nusinovici *et al.*, 2015b; Pandit *et al.*, 2016). No obstante, en muchas ocasiones es difícil establecer un vínculo epidemiológico entre los casos clínicos humanos y el origen de los mismos, que con frecuencia se producen en pacientes que no tienen contacto directo con rumiantes domésticos y/o que viven en ambientes urbanos, lo que dificulta la investigación epidemiológica (Gilsdorf *et al.*, 2008; Hawker *et al.*, 1998; Salmon *et al.*, 1982; Schimmer *et al.*, 2010; Tissot-Dupont *et al.*, 2004; Tissot-Dupont *et al.*, 1999; Wallensten *et al.*, 2010).

Los **rumiantes domésticos** son la principal fuente de infección para el hombre (Maurin y Raoult, 1999). Así, las ovejas están consideradas como la especie más frecuentemente asociada a brotes mundialmente (van den Brom *et al.*, 2015c), seguidas por las cabras [la especie implicada en el brote de Holanda, el mayor descrito hasta la fecha (van der Hoek *et al.*, 2012)] y, en tercer lugar, el ganado bovino (Chmielewski y Tylewska-Wierzbanska, 2013; Roest *et al.*, 2013b). Sin embargo, también los gatos (Goyette *et al.*, 1994; Marrie *et al.*, 1988; Pinsky *et al.*, 1991; Shapiro *et al.*, 2016), perros (Buhariwalla *et al.*, 1996) e incluso otras especies menos frecuentemente implicadas en la epidemiología de la enfermedad, como caballos (Bamberg *et al.*, 2007; Marenzoni *et al.*, 2013) o palomas (Stein y Raoult, 1999) pueden ser una fuente de infección para el hombre.

Los ciclos de infección en los animales domésticos presentan un cierto **carácter estacional** (Enright *et al.*, 1971), dado que es en la época de partos cuando se produce una mayor excreción de la bacteria y, por tanto, el momento en el que se favorece la infección de otros animales dentro de la misma granja, así como su dispersión a explotaciones vecinas (Hogerwerf *et al.*, 2013). Este fenómeno estacional también se ha observado en los casos en el hombre, dado que unas de las principales fuentes de infección son, precisamente, los partos de los rumiantes domésticos (Maurin y Raoult, 1999; van der Hoek *et al.*, 2012).

Se ha detectado también la presencia de la bacteria en semen y fluidos genitales, tanto de animales domésticos como silvestres (García-Seco *et al.*, 2016; Kruszewska y Tylewska-Wierzbanska, 1997; Ruiz-Fons *et al.*, 2014), aunque actualmente no se conoce la importancia de esta vía en el mantenimiento de la enfermedad y la transmisión

del patógeno. No obstante, se han descrito casos de **trasmisión venérea** de forma experimental en ratones (Tylewska-Wierzbanowska y Kruszewska, 1990). En esta misma línea, también puede producirse la transmisión vertical en animales, si bien en este caso tampoco se conoce su trascendencia (OIE, 2016). Por otra parte, se ha demostrado experimentalmente la fuerte capacidad de unión de *C. burnetii* a la zona pelúcida del ovocito (Alsaleh *et al.*, 2013), lo que sugeriría una posible transmisión de la enfermedad a partir de una transferencia de embriones, aunque también en este caso son necesarios más estudios para determinar la capacidad de trasmisión de la enfermedad por dicha vía.

En cuanto a la transmisión a humanos de *C. burnetii* por la **ingestión de leche o productos lácteos** contaminados no tratados térmicamente, todavía existe controversia respecto a la misma (EFSA, 2010; Gale *et al.*, 2015), considerándose una ruta secundaria (EFSA, 2010; Maurin y Raoult, 1999). De hecho, a lo largo de la historia se ha descrito un número limitado de casos que podrían asociarse al consumo de leche no pasteurizada (Brown *et al.*, 1968; Harvey y Marmion, 1956; Signs *et al.*, 2012) y un único brote asociado al consumo de productos lácteos (Fishbein y Raoult, 1992). También existen tres estudios realizados en 1949 en residentes de un asilo (Fonseca, 1949 revisado por Gale *et al.*, 2015), en 1963 en una penitenciaría (Benson *et al.*, 1963) y en 1973 en personas voluntarias (Krumbiegel y Wisniewski, 1970), todos basados en el consumo de leche o alimentos contaminados con *C. burnetii* por personas en las que no se observaron síntomas clínicos, aunque sí seroconversión en dos de los citados trabajos. Por todo ello, algunos autores han llegado incluso a cuestionar que *C. burnetii* deba ser considerada como un patógeno transmitido por alimentos, argumentando el poco grado de infectividad de esta bacteria por la vía oral (Cerf y Condron, 2006; Eldin *et al.*, 2013).

La escasez de casos humanos que se puedan asociar a un contagio por vía alimentaria contrasta con varios aspectos de la excreción en leche de *C. burnetii*: (i) la leche es una vía de excreción primaria de esta bacteria en el caso de vacas y cabras (Guatteo *et al.*, 2012; Rodolakis *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2009a) (ii) los animales infectados pueden excretar la bacteria por esta vía durante largos periodos de tiempo, si bien es un aspecto sujeto a una gran variabilidad individual (como se recoge en la sección 2. 2. 2) y (iii) si bien *C. burnetii* no es capaz de multiplicarse en la leche (Gale *et al.*, 2015), las bacterias presentes en la misma mantienen su viabilidad y son infectivas, tal como quedó demostrado en distintos estudios llevados a cabo en cobaya y en ratón mediante desafíos intraperitoneales con leche procedente de vacas infectadas (Bell *et al.*, 1949; Enright *et al.*, 1957; Loftis *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha descrito que para inducir una infección vía oral en ratones eran necesarias  $10^4$  bacterias más que por vía respiratoria (Durand,

1993), lo que sugeriría que *C. burnetii* presenta una menor capacidad infectiva por vía digestiva que por vía respiratoria. Se estima que el número de bacterias excretadas por mililitro de leche de vacas infectadas oscila entre 213 y 11 073 (Gale *et al.*, 2015; Guatteo *et al.*, 2007b) y que dos mililitros de leche de vaca vehiculan una media de 98,8 dosis infectivas 50 para cobaya por vía intraperitoneal [que contendrían entre dos y 112 bacterias (Gale *et al.*, 2015)], si bien este número podría variar ampliamente desde una hasta 1000 dosis (Enright *et al.*, 1957).

En el caso de los productos lácteos como el queso, existen aún menos evidencias de transmisión a humanos (Fishbein y Raoult, 1992). De hecho, aunque existen estudios que han puesto de manifiesto la presencia de ADN de *C. burnetii* en estos productos (Capuano, 2012; Galiero *et al.*, 2016) y una mayor carga bacteriana en quesos hechos con leche sin pasteurizar (Eldin *et al.*, 2013; Hirai *et al.*, 2012) en comparación con los elaborados con leche pasteurizada (Enright *et al.*, 1957; Loftis *et al.*, 2010), en el único estudio realizado hasta la fecha para determinar la viabilidad de *C. burnetii* en queso se concluyó que esta no era viable (Eldin *et al.*, 2013). Esto podría ser debido a los largos periodos de maduración y el bajo pH alcanzado en este proceso, que serían capaces de reducir en gran medida la viabilidad de la bacteria en quesos curados (Gale *et al.*, 2015). También se ha especulado sobre la posibilidad de que *C. burnetii* quede retenida en el suero lácteo durante el proceso de fabricación del queso, aunque esta hipótesis no ha sido evaluada hasta la fecha (Gale *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta la información disponible al respecto, Gale y colaboradores llevaron a cabo un estudio en Reino Unido donde se estimó que la probabilidad de exposición a una o más bacterias por consumo diario de leche sin pasteurizar era de un 0,403, con un nivel de exposición medio de 1266 unidades infectivas de cobaya/persona/día, asumiendo un consumo diario de 0,127 kg de leche, lo que supondría una dosis relativamente alta (Gale *et al.*, 2015). Sin embargo, y a falta de datos de dosis-respuesta sobre el potencial infeccioso de dichas unidades en el hombre, el escaso número de casos humanos notificados en comparación con la teórica dosis de exposición estimada, sugiere que el riesgo de infección por consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados no es despreciable pero sí sustancialmente limitado en comparación con el riesgo de transmisión por vía aerógena.

### 2.2.3.1. Papel de las garrapatas en la transmisión de *C. burnetii*

En cuanto al papel de las garrapatas como vectores de la enfermedad, cabe destacar que desde la primera detección de la actual cepa de referencia *Nine Mile* en una garrapata de la especie *Dermacentor andersoni* en los años 30 (Davis, 1938) se ha venido estudiando el modo en que estos artrópodos pueden contribuir a la transmisión y mantenimiento de la fiebre Q. De acuerdo con estudios realizados a mediados del siglo pasado, *C. burnetii* estaría presente en más de 40 especies de garrapatas duras y blandas (Baboudieri, 1959), demostrándose la capacidad de transmisión de este patógeno en condiciones de laboratorio en una amplia variedad de las mismas, así como la total competencia como vectores y la transmisión transovárica en siete y en tres de ellas, respectivamente (revisado por Duron *et al.*, 2015b). Por otro lado, las garrapatas no solo son capaces de transmitir la enfermedad a través de la picadura, sino que también pueden excretar grandes cantidades de *C. burnetii* en las heces [por encima de  $10^9$  bacterias por gramo de heces (Philip, 1948b)], por lo que la bacteria puede transmitirse vía aerógena a través de la inhalación de aerosoles formados a partir de estas [por ejemplo, durante el esquila de las ovejas dada la acumulación de los excrementos de los artrópodos en la lana (Hellenbrand *et al.*, 2001a; Schulz, 2005)].

Diversos estudios apuntan a que estos artrópodos podrían actuar como un nexo entre el ciclo doméstico y el silvestre (Astobiza *et al.*, 2011c; Cooper *et al.*, 2013; González-Barrio *et al.*, 2016b; Pacheco *et al.*, 2013) facilitando la transmisión entre distintas especies de animales silvestres y de estos a los domésticos e incluso al hombre, y contribuyendo a dispersar la enfermedad entre vertebrados (Duron *et al.*, 2015b). En esta línea se han observado prevalencias de *C. burnetii* en garrapatas de hasta el 10% en distintos países de Europa, América y África [revisado por (Duron *et al.*, 2015b)] y del 29% en zonas endémicas, como Chipre (Psaroulaki *et al.*, 2014). En España se han observado prevalencias del 7,7% en la zona centro (Toledo *et al.*, 2009) y del 7,3% en la zona de Valle del Ebro (Oteo, 1991). Estos porcentajes de infección en el vector están en consonancia con los observados en otros patógenos transmitidos por garrapatas como *Anaplasma* (Stuen *et al.*, 2013), lo que por otra parte podría sugerir que estos vectores sí podrían jugar un papel relevante en el mantenimiento y transmisión de *C. burnetii* en el ciclo silvestre de esta enfermedad. De hecho, diversos trabajos han puesto de manifiesto la presencia de la bacteria en garrapatas recogidas de distintas especies silvestres (Cooper *et al.*, 2013; Duron *et al.*, 2014; Leulmi *et al.*, 2016; Mediannikov *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2013; Psaroulaki *et al.*, 2014). Respecto a los rumiantes domésticos, ciertos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre

la detección de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* y la infestación de los animales por garrapatas en las que se detecta el patógeno (Psaroulaki *et al.*, 2006) y han identificado la presencia de estos artrópodos como un factor de riesgo asociado a la seropositividad en ganado (Asadi, 2014; Cantas *et al.*, 2011; van Engelen *et al.*, 2014b). En el caso de la transmisión al hombre también se han descrito algunos casos de fiebre Q que podrían asociarse a la picadura de garrapatas (Beaman y Hung, 1989; Dubourg *et al.*, 2014; Eklund *et al.*, 1947; Janbon *et al.*, 1989; Nett *et al.*, 2012; Pascual-Velasco *et al.*, 2007; Rolain *et al.*, 2005b).

Sin embargo, en la actualidad se considera que la importancia del papel de estos artrópodos como vectores de *C. burnetii* en la naturaleza es limitada, y aunque pueden transmitir la enfermedad ocasionalmente tanto a animales como a personas, esta sería una vía secundaria en comparación con la transmisión aerógena (Duron *et al.*, 2015b). En esta línea, las prevalencias de *C. burnetii* observadas en garrapatas recogidas de distintos hospedadores y del ambiente, suelen ser bajas [normalmente por debajo del 5% (Duron *et al.*, 2015b)]. Además, la frecuente presencia de bacterias endosimbiontes *Coxiella-like* en garrapatas, con un elevado grado de similitud genética con *C. burnetii*, podría haber dado lugar a una sobreestimación de las prevalencias de esta última en estos ectoparásitos, dado que la mayor parte de estos estudios se basan en técnicas moleculares dirigidas a la detección de un solo gen mediante PCR. Sin embargo, los trabajos más actuales basados en el empleo de secuenciación genética de alto rendimiento han puesto de manifiesto que en garrapatas son más prevalentes las distintas especies *Coxiella-like* que *C. burnetii* (Duron *et al.*, 2015b), por lo que la tradicionalmente aceptada descripción de la presencia de *C. burnetii* en más de 40 especies de estos artrópodos (Baboudieri, 1959) debería ser reevaluada. Estas bacterias podrían también comprometer los resultados de estudios basados en serología, ya que las garrapatas infectadas podrían inocular antígenos que podrían dar lugar a reacciones serológicas cruzadas en los hospedadores (Mariconti *et al.*, 2012). Se ha sugerido que este fenómeno ha podido dar lugar a que la seroprevalencia de fiebre Q tanto en animales como en personas pudiera estar sobreestimada (Duron *et al.*, 2015b), si bien serían necesarios más estudios para determinar la especificidad de las actuales técnicas serológicas a este respecto.

El papel de las garrapatas en la transmisión de la enfermedad estaría aún más cuestionado en el caso de los animales domésticos, considerándose que estos artrópodos tienen un papel menor en el ciclo epidemiológico de la enfermedad en dichas especies. Este hecho estaría asociado al menor potencial de transmisión por picadura de garrapata

en comparación con la transmisión aerógena en un ambiente altamente contaminado, tal y como es esperable en explotaciones positivas por la excreción masiva de bacteria y la mayor densidad animal propia de los sistemas de producción intensiva. En relación a ello, se ha observado que, en granjas infectadas por *C. burnetii* y en explotaciones vecinas, la prevalencia de garrapatas positivas puede ser muy baja (Cardinale *et al.*, 2014) e incluso inexistente (Sprong *et al.*, 2012). Finalmente, en el caso de la transmisión al hombre, y a pesar de los posibles casos de transmisión antes citados, no se puede descartar la exposición de los pacientes a la bacteria por otras vías (principalmente la aerógena), por lo que también en el caso del hombre el papel de las garrapatas en la transmisión sigue planteando dudas (Duron *et al.*, 2015b).

En lo que respecta a la **transmisión de persona a persona**, aunque es un fenómeno infrecuente, a lo largo de la historia se han descrito algunos casos. Así, se ha descrito puntualmente la transmisión por contacto sexual (Kruszewska *et al.*, 1996; Milazzo *et al.*, 2001), por contagio durante el parto de una mujer infectada a su matrona (Raoult y Stein, 1994), durante autopsias (Harman, 1949; Marmion y Stoker, 1950), por trasplante de médula ósea (Kanfer *et al.*, 1988) por inoculación intradérmica (revisado por Maurin y Raoult, 1999) o por transfusión sanguínea (revisado por Maurin y Raoult, 1999). También se ha descrito la infección por *C. burnetii* de forma congénita (Stein y Raoult, 1998).

## **2.2.4. FACTORES DE RIESGO PARA LA TRANSMISIÓN DE *C. BURNETII* EN RUMIANTES DOMÉSTICOS**

### **2.2.4.1. Factores de riesgo asociados al hospedador**

A nivel individual, una de las principales características asociadas a la detección de animales seropositivos es la **edad** de los mismos, siendo más alta la probabilidad de obtener resultados positivos en las pruebas serológicas frente a fiebre Q animales mayores. Así, la asociación entre la presencia de anticuerpos específicos frente a este patógeno y la edad del individuo se ha observado en la mayoría de los estudios en los que ha sido evaluada, independientemente de la especie doméstica y el sistema de explotación. Así, este fenómeno ha sido identificado en ganado bovino en España (Astobiza *et al.*, 2012a; Piñero *et al.*, 2014b), Alemania (Bottcher *et al.*, 2011), Dinamarca (Paul *et al.*, 2014), Holanda (Muskens *et al.*, 2011a; Paul *et al.*, 2014; van Engelen *et al.*, 2014b), Ecuador (Carbonero *et al.*, 2015), Costa de Marfil (Kanoute *et al.*, 2016), Camerún (Mazeri *et al.*, 2013) o la región sudeste del lago Chad (Abakar *et al.*, 2014). En pequeños rumiantes también se ha identificado en España (Díaz *et al.*, 2014; García-Pérez *et al.*, 2009; Ruiz-Fons *et al.*, 2010), Italia (Anastacio *et al.*, 2013), Irán (Ezatkah *et al.*, 2015),



Turquía (Kennerman *et al.*, 2010), Gambia (Klaasen *et al.*, 2014) o Kenia (Muema *et al.*, 2017). Esta asociación vendría explicada por el hecho de que la probabilidad de exposición a *C. burnetii* en algún momento de la vida del animal se incrementa con el paso del tiempo. Se ha observado además una relación entre el mayor riesgo de seropositividad y el comienzo de la actividad reproductiva de los animales, dado que en el momento del acontecimiento reproductivo se produce un incremento de los niveles de anticuerpos en individuos infectados (Astobiza *et al.*, 2012a; García-Pérez *et al.*, 2009; Tutusaus *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de que la edad es uno de los factores de riesgo más ampliamente identificados, existen algunos estudios en los que no se ha demostrado tal asociación, como en el realizado en vacuno de carne en régimen extensivo en España (Ruiz-Fons *et al.*, 2010) o en vacuno de leche en Irlanda (Ryan *et al.*, 2011b). Por otro lado, también se ha observado que en rebaños de bovino endémicamente infectados se produce una disminución del porcentaje de animales seropositivos en los animales de mayor edad (Bottcher *et al.*, 2011; Guatteo *et al.*, 2007b).

En lo que respecta a la **especie de rumiante doméstico**, como se describe en la sección 2.3., en rebaños de ovejas y cabras la infección por *C. burnetii* puede conducir a elevados porcentajes de abortos (Anderson *et al.*, 2015; Damoser *et al.*, 1993; van den Brom *et al.*, 2015a; Zeman *et al.*, 1989 revisado por Agerholm, 2013; Masala *et al.*, 2007), mientras que este fenómeno no se ha descrito en el caso del ganado bovino, donde en la mayoría de los casos la infección es asintomática o se asocia a problemas de fertilidad (Agerholm, 2013; García-Ispuerto *et al.*, 2014). Asimismo, se demostró que la probabilidad de infección en rebaños de bovino de leche en Holanda (medida a través de la detección de *C. burnetii* en tanque de leche) aumentaba cuando en la explotación había presencia de cabras u ovejas (van Engelen *et al.*, 2014b). Dentro de los pequeños ruminantes, se ha sugerido que las cabras pueden tener mayor susceptibilidad a la infección que las ovejas (Klaasen *et al.*, 2014; van den Brom *et al.*, 2015c). Esta hipótesis podría sustentarse en distintos hallazgos, como el hecho de que en general los niveles de seroprevalencias descritos en cabras sean superiores a los observados en ovejas (Anastacio *et al.*, 2013; Guatteo *et al.*, 2010; Klaasen *et al.*, 2014; Rizzo *et al.*, 2016; Schelling *et al.*, 2003; van den Brom *et al.*, 2012a; van den Brom *et al.*, 2015c), al igual que las tasas de fallo reproductivo asociadas a la infección por *C. burnetii* [de hasta un 93% en cabras (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Hatchette *et al.*, 2003a; Palmer *et al.*, 1983; Sanford *et al.*, 1994; Wouda y Dercksen, 2007 revisado por Moore *et al.*, 1991; van den Brom *et al.*, 2015c; Waldhalm *et al.*, 1978) frente a un máximo de un 60% en ovejas (Damoser *et al.*, 1993; Zeman *et al.*, 1989 revisado por Agerholm, 2013; Masala *et al.*, 2007).

En general, se ha observado una mayor seroprevalencia en cabras que en ovejas (Anastacio *et al.*, 2013; Guatteo *et al.*, 2010; Klaasen *et al.*, 2014; Muema *et al.*, 2017; Obaidat y Kersh, 2017; Rizzo *et al.*, 2016; Schelling *et al.*, 2003), aunque en algunos casos se ha observado una mayor prevalencia en ovejas que en cabras (Anastacio *et al.*, 2013; Ruiz-Fons *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2011a; Shabbir *et al.*, 2016; Vaidya *et al.*, 2010).

#### 2.2.4.2. Factores de riesgo relacionados con el manejo

La **intensificación de la producción** está directamente relacionada con el mayor riesgo de presencia de *C. burnetii* en las explotaciones, ya que favorece tanto el aumento de la excreción como la concentración de la bacteria. De hecho, el brote de fiebre Q en cabras en Holanda puede explicarse, al menos en parte, por la intensificación de la producción de ganado caprino en el país, que alcanzó una densidad de cabras de 38 animales por km<sup>2</sup> en 2009 (Schimmer *et al.*, 2011). En este país se pasó de un censo de 76 000 cabezas criadas en explotaciones cerradas en 1995, a un total de 375 000 cabezas en 2009, de las cuales el 80% estaban estabuladas en granjas intensificadas con un censo de entre 200 y 10 000 adultos y una media de 770 cabras cada una, y localizadas principalmente en una sola región en el sur, la provincia de Noord-Brabant (Hogerwerf *et al.*, 2013). En esta misma línea, en un estudio realizado en rebaños bovinos en Italia en el que se compararon tres regímenes productivos, se observó que los rebaños que pasaban parte o la totalidad del año estabulados presentaban mayor porcentaje de seropositividad que aquellos rebaños de tipo puramente extensivo o con acceso a pastos parte del año (Capuano *et al.*, 2001).

Una de las características de las explotaciones claramente relacionadas con la intensificación y más comúnmente asociadas a un mayor riesgo de positividad a fiebre Q es el **censo** de las mismas, incrementándose en granjas de mayor tamaño. Existen diversos estudios en los que se ha detectado esta asociación, por ejemplo, en vacas de leche en España [en Vizcaya (Piñero *et al.*, 2014b), si bien un estudio anterior realizado en la región no observó dicha asociación (Astobiza *et al.*, 2012a)], en ganado vacuno de leche y carne en Irlanda (McCaughey *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2010), y en ganado de leche en Dinamarca (Agger *et al.*, 2010; Agger *et al.*, 2013; Agger *et al.*, 2014, Paul *et al.*, 2012), Portugal (Anastacio *et al.*, 2016) y Holanda (van Engelen *et al.*, 2014b). Asimismo, también se ha observado en rebaños de ovejas en Italia (Rizzo *et al.*, 2016), Gran Bretaña (Lambton *et al.*, 2016) y Canadá (Meadows *et al.*, 2015b) y en cabras en Canadá (Meadows *et al.*, 2015a), en Estados Unidos (Ruppanner *et al.*, 1978) y en el brote de Holanda (Schimmer *et al.*, 2011). Esta asociación puede ser explicada por el hecho de

que en explotaciones de mayor censo existe una mayor población en riesgo, ya que hay un mayor número de hembras preñadas que pueden estar infectadas y, por tanto, excretar la bacteria y contaminar el ambiente en el momento del parto o aborto. Por otra parte, hay una mayor población susceptible de contraer la infección, lo cual, a su vez, dificulta la eliminación de la infección en el rebaño.

Sin embargo, también se han dado excepciones en cuanto a la demostración de una asociación entre el riesgo de infección y el tamaño de rebaño. A este respecto cabe citar un estudio realizado en bovino de leche en Francia en el que se evaluaba la seroprevalencia intra-rebaño, observándose que dicha prevalencia era significativamente mayor en rebaños pequeños (con menos de 46 vacas) (Taurel *et al.*, 2011), si bien ha de tenerse en cuenta que la población estudiada presentaba tamaños de explotación muy reducidos en general (solo el 8% de las explotaciones tenían más de 100 animales). Por otro lado, también hay que tener en cuenta posibles factores de manejo en los rebaños más pequeños no contemplados en el estudio.

Por otro lado, otro conjunto de factores de riesgo que se ven usualmente potenciados en explotaciones de mayor tamaño es el relacionado con un mayor número de posibles vías de entrada de la infección. Ese sería el caso de la **entrada de personas**, tanto trabajadores de la propia explotación como personal externo (proveedores de alimentos, servicios veterinarios, visitantes, etc.). Estas entradas pueden constituir un factor de riesgo si no se acompañan de las medidas de bioseguridad adecuadas, ya que las personas pueden actuar como vectores mecánicos transportando la bacteria en ropa, calzado o material de trabajo contaminado (Woldehiwet, 2004). En relación a ello, en un trabajo realizado en granjas de ovejas, cabras y vacas en la isla de La Reunión, se identificó como factor de riesgo la ausencia de control de entradas de visitantes (Cardinale *et al.*, 2014). También en esta línea, en rebaños de vacas de leche de Dinamarca se identificó como factor de riesgo la entrada de personas ajenas a la granja (Agger *et al.*, 2013). De hecho, se observó que aquellas explotaciones con visitas rutinarias por parte de un veterinario como parte del programa sanitario, presentaban mayor riesgo de ser seropositivas que aquellas que no tenían ningún programa, lo que sugería que el veterinario podría ser una fuente de introducción de la bacteria en la explotación. Asimismo, en este mismo estudio se identificó que las medidas de bioseguridad empleadas por los veterinarios en lo que se refiere al cambio de botas y ropa entre granjas reducía significativamente el riesgo de seropositividad tanto individualmente como en rebaño (Paul *et al.*, 2012).

También en rebaños de mayor tamaño existe una mayor cantidad de **entrada de alimentos y paja**, habiéndose identificado la entrada de paja contaminada como factor de riesgo en ganado caprino durante el brote de fiebre Q de Holanda (Karagiannis *et al.*, 2009), país que importaba paja de Francia y Alemania, ambos endémicos de fiebre Q. Además, mediante PCR se obtuvieron resultados positivos a la bacteria en muestras de paja procedentes de Francia que se habían exportado a Holanda (Wever, 2010 revisado por Schimmer *et al.*, 2011). En otro estudio realizado sobre este mismo brote se identificó como factor de riesgo la adquisición de paja de origen desconocido (Schimmer *et al.*, 2011). Asimismo, el contacto con heno contaminado se identificó como origen más probable de un brote de fiebre Q en personas en Reino Unido (Van Woerden *et al.*, 2004).

También en rebaños grandes existen más **entradas de animales** externos a la granja (mayor índice de reposición externa) (Brennan y Christley, 2012), y se han identificado como factores de riesgo la entrada de animales externos a la explotación (Obaidat y Kersh, 2017) y procedentes de dos o más orígenes en el caso del ganado bovino (van Engelen *et al.*, 2014b) y ovino (Schimmer *et al.*, 2014) así como el mayor número de movimientos animales en granjas de ganado bovino de aptitud láctea y cárnica (Nusinovici *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2014).

En esta misma línea, Paul y colaboradores identificaron que el uso de **cuarentenas** al incorporar animales a la granja está asociada a un menor nivel de anticuerpos en tanque de leche (Paul *et al.*, 2012). Del mismo modo, Cardinale y colaboradores identificaron como factor de riesgo la incorporación a la granja de animales sin cuarentena ni control en granjas de rumiantes de la isla de La Reunión (Cardinale *et al.*, 2014). Asimismo, en relación con la entrada de animales, el **intercambio no controlado de animales entre granjas**, como es el caso de machos para fines reproductivos, también ha sido identificado como factor de riesgo en explotaciones de ovejas (Meadows *et al.*, 2015b) y cabras (Schiller *et al.* 2010), siendo en este caso esta actividad más propia de explotaciones pequeñas y poco intensificadas. Así, en rebaños de pequeños rumiantes de Jordania se ha identificado que aquellas granjas en las que se mezclan los animales con los de otras explotaciones tienen mayor riesgo de presentar anticuerpos en tanque de leche (Obaidat y Kersh, 2017). Por otro lado, un estudio realizado en Kenia puso de manifiesto que los animales adquiridos en mercados tenían mayor probabilidad de ser seropositivos (Wardrop *et al.*, 2016). Los autores relacionaban esta asociación con diversos factores, como la importación de los animales de zonas de alta prevalencia de fiebre Q, los altos niveles de contaminación de los mercados, o el mayor porcentaje de

venta de animales con problemas reproductivos por parte de los ganaderos, que en ciertos casos podrían estar asociados a fiebre Q.

Siguiendo con el contacto entre animales como factor de riesgo, la utilización **de pastos compartidos** también ha sido identificada como factor de riesgo para la transmisión de *C. burnetii* ya que facilita el contacto entre rebaños. Ese hecho ha sido observado en rebaños ovinos de Italia (Rizzo *et al.*, 2016) y Holanda (Schimmer *et al.*, 2014) y en rebaños de bovinos de Costa de Marfil (Kanoute *et al.*, 2016) y Francia (donde también se identificó como factor de riesgo el contacto con otros rumiantes domésticos a través del vallado de la explotación) (Taurel *et al.*, 2011). También el pastoreo nómada ha sido identificado como factor de riesgo en el caso de rebaños de pequeños rumiantes en Kenia (Muema *et al.*, 2017). Asimismo, en granjas de pequeños rumiantes en Jordania se ha descrito que, aquellas que pastan en un área superior a los cinco km tienen mayor riesgo de detección de anticuerpos frente a fiebre Q en tanque de leche (Obaidat y Kersh, 2017).

El contacto con **fauna silvestre** también puede ser un factor de riesgo en determinadas circunstancias epidemiológicas. Así, el contacto con búfalos silvestres ha sido identificado como un factor de riesgo en el caso de rebaños bovinos de Camerún (Mazeri *et al.*, 2013), si bien hasta la fecha no existen datos sobre la presencia y distribución de *C. burnetii* en esta especie animal en la región.

En ocasiones también se ha identificado como factor de riesgo la presencia de **animales de compañía** (perros y gatos) en las explotaciones, sugiriendo su posible papel en la transmisión de la enfermedad. Así, esta asociación se observó en un estudio en granjas de rumiantes domésticos en Chipre (Cantas *et al.*, 2011) y de caprino del brote de Holanda (Schimmer *et al.*, 2011), si bien en este último caso la ausencia de seropositividad en los animales de compañía dificulta la interpretación de dicha asociación. En cualquier caso, y a pesar de que tanto perros como gatos pueden infectarse, desarrollar la enfermedad y liberar la bacteria al ambiente (Buhariwalla *et al.*, 1996; Marrie *et al.*, 1988), no se ha evaluado hasta la fecha en ningún estudio la excreción por parte de los animales de compañía en explotaciones de rumiantes domésticos en las que estén presentes.

En cuanto a la presencia de **garrapatas**, a pesar de que en términos generales su papel en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad en animales domésticos se considera secundario (sección 2. 2. 3. 1), algunos estudios han puesto de manifiesto la existencia de una correlación positiva entre la detección de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* y la infestación de los animales por garrapatas en las que se detecta el patógeno (Psaroulaki *et al.*, 2006), habiéndose identificado también la presencia de garrapatas

como un factor de riesgo asociado a la exposición en ganado (Asadi, 2014; Cantas *et al.*, 2011; van Engelen *et al.*, 2014b).

Dada la capacidad de transmisión de esta enfermedad vía aerógena, no es necesario el contacto directo con otros animales para que se produzca la transmisión de la enfermedad. Así, las **zonas de alta densidad ganadera** son propicias para la transmisión entre granjas. A este respecto cabe citar el brote de cabras del sur de Holanda, en el que se identificó como factor de riesgo la proximidad de una explotación a otra, observándose que las granjas de cabras tenían mayor riesgo de ser seropositivas cuando tenían una explotación positiva en PCR de tanque de leche a una distancia menor a ocho km, y también cuando estaban situadas en zonas de alta densidad ganadera con más de 100 bovinos por km<sup>2</sup> (Schimmer *et al.*, 2011). En esta misma línea, durante el citado brote se identificó que en las explotaciones ovinas existía un mayor riesgo de seropositividad individual cuando la densidad de cabras era mayor a 5,3 animales en un área de diez km<sup>2</sup> alrededor de a la granja ovina estudiada (Schimmer *et al.*, 2014). Del mismo modo, en otro estudio se observó que las explotaciones bovinas situadas en zonas donde la densidad de explotaciones estaba entre 100 y 120 granjas en un radio de cinco km presentaban mayor riesgo de estar infectadas que aquellas explotaciones situadas en zonas con una densidad de 60 granjas (Nusinovici *et al.*, 2014). Este hecho también se ha observado en granjas de cabras de Ontario, donde la presencia de explotaciones de ovejas o cabras en distancias inferiores a cinco km incrementaba el riesgo de positividad (Meadows *et al.*, 2015a), además de en granjas de ovino en Gran Bretaña, donde, de forma similar, se identificó un mayor riesgo al incrementarse el número de cabras en un radio de diez km (Lambton *et al.*, 2016). Sin embargo, Agger y colaboradores no observaron una asociación significativa entre la densidad regional de explotaciones de leche y la prevalencia de granjas positivas en ganado bovino de leche en Dinamarca (Agger *et al.*, 2010).

Otro de los aspectos relacionados con el mayor riesgo de seropositividad es **el tipo de producción**. En general, las explotaciones de producción láctea muestran un mayor riesgo de infección que las de carne. Este fenómeno ha sido observado en explotaciones de bovino en Irlanda (McCaughey *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2011a) y Dinamarca (Paul *et al.*, 2014), así como en explotaciones de pequeños rumiantes en Canadá (Meadows *et al.*, 2015b) y Holanda (van den Brom *et al.*, 2013a). En general, este hecho se asocia a una mayor intensificación en el manejo de las explotaciones de leche, en las que suelen combinarse dos factores: censos elevados [en el caso de las explotaciones de cabras en Holanda, entre 770 y 900 animales de media (Hogerwerf *et al.*, 2013; van den Brom *et al.*,

2013a)] y la constante estabulación de los animales, lo que favorecería especialmente la concentración de la bacteria en las instalaciones y, por tanto, la dispersión de la misma dentro del rebaño. Sin embargo, no en todos los estudios en los que se evalúa la asociación entre el tipo de producción y la presencia de infección se observa un mayor riesgo en los rebaños de aptitud láctea. De hecho, en un estudio publicado en 2014 por Schimmer y colaboradores (Schimmer *et al.*, 2014) llevado a cabo en rebaños ovinos de Holanda desde 2007 a 2009, se observó que el tipo de explotación con el mayor riesgo de infección era el de producción de corderos para carne. Los autores asociaron este hecho al tipo de manejo concreto de esta clase de explotaciones, también altamente intensificadas y con un elevado número de partos y de movimientos de animales que podría favorecer la entrada de *C. burnetii* (dentro de este tipo de granjas, el 51% de las mismas presentaba una tasa de reposición del 25% mientras que solo el 32% de otro tipo de granjas presentaba dicha tasa de reposición). De forma similar, en un estudio realizado en rebaños caprinos de Estados Unidos las explotaciones de aptitud cárnica tenían mayor riesgo de excreción de *C. burnetii* en leche que las dedicadas a la producción láctea (Bauer *et al.*, 2016).

Otro factor de riesgo importante tanto individualmente como en rebaño asociado con el manejo y la intensificación de la producción es el tipo de instalaciones en las que tienen lugar **los partos de los animales** (momento de máxima excreción de la bacteria al medio). Así, durante el citado brote de Holanda se identificó como factor de riesgo la segregación de los partos en instalaciones específicas para este fin, lo que favorecía la acumulación de la bacteria excretada en un espacio definido. Además, en estas instalaciones se empleaban cortavientos, mosquiteras y otros sistemas para evitar la entrada de pájaros y otros vectores principalmente, pero que provocaban una gran disminución de la ventilación en esas zonas con alta contaminación bacteriana, facilitando así la concentración de *C. burnetii* y, con ello, el contagio de los animales del rebaño tanto en el caso de cabras (Schimmer *et al.*, 2011) como en ovejas (Schimmer *et al.*, 2014). Este mismo factor de riesgo se identificó en explotaciones de pequeños rumiantes en Canadá (Meadows *et al.*, 2015a; Meadows *et al.*, 2015b), observándose que los partos al aire libre y sin acumulación de restos de cama y estiércol estaban asociados a un menor grado de seropositividad intra-rebaño en comparación con aquellas explotaciones en las que los partos tenían lugar en instalaciones cerradas, o bien en explotaciones con acumulación de dichos desechos en sus instalaciones aunque estuvieran al aire libre.

Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que si bien puede limitarse la diseminación de la infección intra-rebaño en aquellas granjas menos confinadas y con instalaciones que

faciliten la ventilación, este diseño, a su vez, puede favorecer la dispersión de la bacteria al exterior por acción del viento, facilitando el contagio de otros rebaños y personas y contaminando el ambiente próximo. Asimismo, también en relación con la prevalencia intra-rebaño, un estudio puso de manifiesto que en las granjas bovinas donde se empleaba un sistema de explotación basado en el *loose housing system* (con corrales comunes en los que los animales se encuentran conjuntamente en lugar de separados), se observaba una mayor prevalencia intra-rebaño (Agger *et al.*, 2013). Los autores asociaron este hecho a que la mayor libertad de movimiento de los animales favorecía el contagio a partir de otros animales infectados o el ambiente contaminado.

Por otro lado, se ha observado una asociación entre las **prácticas de higiene de las zonas de partos** y el riesgo de infección por *C. burnetii*. En esta línea, un estudio en explotaciones de rumiantes domésticos determinó que la mayor frecuencia de limpieza de la zona de partos actuaba como factor de protección frente a la infección (Cantas *et al.*, 2011). Asimismo, en un trabajo llevado a cabo en rebaños de vacas de leche se observó que no retirar las placentas y los restos de fetos abortados aumentaba la prevalencia intra-rebaño (Taurel *et al.*, 2011). De forma similar, Meadows y colaboradores observaron que tanto en granjas de cabras (Meadows *et al.*, 2015a) como de ovejas (Meadows *et al.*, 2015b) donde se eliminaban los restos de abortos en la zona de partos, se retiraba la paja y se llevaba a cabo un protocolo de desinfección antes de añadir cama nueva, los porcentajes de seroprevalencia eran menores que en aquellas explotaciones en las que tras los partos solo se añadía paja o bien se retiraba esta y se añadía nueva sin realizar una desinfección previa. De igual forma, en otro estudio (Paul *et al.*, 2012) se identificó que la limpieza diaria de las cuadras de vacas de leche actuaba como un factor protector, dado que mediante esta limpieza se eliminarían los restos de partos y secreciones vaginales de las hembras. En esta misma línea, la limpieza periódica (más de cinco veces al año) del estiércol resultó ser un factor protector en granjas de bovino en Chipre (Cantas *et al.*, 2011). Por otro lado, también se ha identificado como factor de riesgo tanto en bovino como en pequeños rumiantes la escasa e infrecuente limpieza de los comederos (Obaidat y Kersh, 2017).

En lo que respecta a la **estacionalidad de los partos**, ha de tenerse en cuenta que en las explotaciones de bovino de leche se producen partos de manera continuada lo largo del año, lo que implica una posible excreción y contaminación del ambiente constante a lo largo del año, si bien Taurel y colaboradores (Taurel *et al.*, 2011) observaron una mayor prevalencia intra-rebaño en explotaciones de bovino de leche con estacionalidad de partos en Francia. En los rebaños de pequeños rumiantes, sin embargo, la excreción se



concentra solo en las épocas de partos, que dependen de la región y el tipo de explotación (Hogerwerf *et al.*, 2013), habiéndose identificado asimismo como factor de riesgo en explotaciones caprinas la existencia de épocas de parto sucesivas en el mismo año de acuerdo con un modelo de producción más intensificado (Bond *et al.*, 2016).

Otro factor de riesgo asociado con el manejo que se han identificado en situaciones concretas es, en el caso de explotaciones de bovino leche, el uso de material de ordeño compartido entre granjas (Agger *et al.*, 2013), si bien otros estudios ofrecieron resultados contradictorios (Taurel *et al.*, 2012b). En esta misma línea, un estudio puso de manifiesto el efecto protector del ordeño automático frente al manual en relación tanto a los niveles de seroprevalencia como a la detección de *C. burnetii* mediante PCR en tanque de leche (van Engelen *et al.*, 2014b). En cualquier caso, existen otros muchos factores relacionados con el manejo que pueden diferir entre las explotaciones con ordeño mecánico respecto al manual y que podrían modificar esta asociación (Jacobs y Siegford, 2012). Siguiendo en la línea de los factores asociados a la lactación, otros autores (Carbonero *et al.*, 2015) detectaron que el empleo de preparados lácteos comerciales en lugar de leche materna para la alimentación de terneros se asociaba a un mayor riesgo de seropositividad en ganado bovino de Ecuador. Los autores asociaban este hecho a una mayor posibilidad de contaminación de los recipientes y diversos materiales empleados para la preparación de los preparados lácteos. En este mismo estudio también se identificó como factor de riesgo la ausencia de limpieza y desinfección del cordón umbilical de los terneros, asociándolo a una posible vía de adquisición de la infección.

En cabras, el **estrés**, bien asociado al hacinamiento en la explotación o a la alimentación deficiente ha sido identificado como un factor que predispone al aborto en individuos infectados por *C. burnetii* (Crowther y Spicer, 1976).

### 2.2.4.3. Factores medioambientales

En relación con la transmisión aerógena de la fiebre Q y el papel del viento en la misma, Nusinovici y colaboradores identificaron que los vientos fuertes con velocidades superiores a 5,5 m/s suponen un factor de riesgo de infección para otras explotaciones cercanas a granjas de bovinos con una alta carga de *C. burnetii* en el ambiente (Nusinovici *et al.*, 2015b). Por otro lado, otros autores (Cardinale *et al.*, 2014) observaron que los rebaños de rumiantes que estaban expuestos a los vientos prevalentes de una determinada región y se alimentaban en pastos situados en la zona de acción de dichos vientos en la isla de la Reunión presentaban mayor riesgo de ser seropositivos.

Tal y como se ha citado previamente, la transmisión aerógena de *C. burnetii* se ve favorecida por el tiempo seco y la escasez de lluvias, que favorecen la desecación de la bacteria y su transporte por el viento. Así, los bovinos adquiridos de zonas de menor pluviometría en Kenia presentaban mayores niveles de seropositividad (Wardrop *et al.*, 2016). En esta misma línea, la lluvia se ha identificado como un factor de protección frente a la infección, asociándose a su capacidad para disminuir la cantidad de bacteria aerosolizada (Nusinovici *et al.*, 2015a). Así, un estudio realizado sobre un brote humano ocurrido en Francia y asociado a ovejas puso de manifiesto una escasa pluviometría durante la época de lluvias en el año anterior a dicho brote (Tissot-Dupont *et al.*, 2004)

Asimismo, otros aspectos medioambientales, como la vegetación y el tipo de suelo, pueden tener un papel relevante en la dispersión de *C. burnetii*, siendo los paisajes abiertos con vegetación escasa y los suelos poco húmedos (con aguas subterráneas profundas) características que favorecen la dispersión de la bacteria en caso de un brote (Nusinovici *et al.*, 2015a; van der Hoek *et al.*, 2011a). En lo que se refiere a la influencia del tipo de suelo y a la capacidad de supervivencia de la bacteria en el mismo, determinados autores (Evstigneeva *et al.*, 2005) observaron una relación negativa entre la presencia de carbono en formas orgánicas y la supervivencia de *C. burnetii*. Sin embargo, otros (Shabbir *et al.*, 2016) detectaron que en los suelos con mayor contenido en materia orgánica se detectaba más ADN de *C. burnetii*, mientras que en suelos ricos en calcio y potasio sucedía lo contrario.

Por otro lado, en rebaños bovinos de leche de Bélgica (Czaplicki *et al.*, 2012) se identificó que aquellos en los que los animales consumían agua procedente de cauces fluviales o de pozos presentaban mayores niveles de anticuerpos en tanque de leche. Aunque la transmisión de *C. burnetii* a través del consumo de aguas contaminadas no se ha estudiado en profundidad, sí se conoce la capacidad de la bacteria para sobrevivir en el interior de amebas ambientales (La Scola y Raoult, 2001), y distintos estudios han puesto de manifiesto su presencia en aguas (Schets *et al.*, 2013), incluso asociando brotes humanos y de rumiantes domésticos al consumo de las mismas (BKH *et al.*, 1957; Kulagin, 1956; Kulagin *et al.*, 1958; Kulagin y Silich, 1956; Yadav y Sethi, 1980; Welsh *et al.*, 1959). En relación a esto último, un estudio de Whitney y colaboradores puso de manifiesto como el contacto con aguas, especialmente si se encontraban estancadas, era un factor de riesgo asociado a la infección por *C. burnetii* en veterinarios de Estados Unidos (Whitney *et al.*, 2009).

Finalmente, si bien la información disponible sobre el posible incremento del riesgo de fiebre Q asociado a la presencia de otras enfermedades concomitantes en el rebaño es escasa, en un único estudio realizado en granjas de bovino de Ecuador (Carbonero *et al.*, 2015) se observó una correlación entre el nivel de seropositividad frente a *C. burnetii* y al virus respiratorio sincitial bovino, que podría explicarse por el efecto inmunosupresor del segundo que actuaría como factor predisponente en el animal para adquirir la infección por *C. burnetii* (Woldehiwet y Sharma, 1992).

#### **2.2.4.4. Factores relacionados con el agente causal**

La información existente hasta la fecha relativa a la relación entre la patogenicidad de *C. burnetii* y la cepa es limitada (van Schaik *et al.*, 2013). Así, aunque en el caso de la fiebre Q humana distintos trabajos han puesto de manifiesto una asociación entre la cepa de *C. burnetii* y la severidad y tipo de manifestaciones clínicas (Frangoulidis *et al.*, 2013; Glazunova *et al.*, 2005; Massung *et al.*, 2012), actualmente no existe información disponible que determine si existe una asociación entre las distintas cepas de *C. burnetii* y su relación con la patogenicidad en rumiantes domésticos.

### **2.3. PATOGENIA**

#### **2.3.1. Manifestaciones clínicas, lesiones y respuesta inmune**

##### **2.3.1.1. Pequeños rumiantes**

Los distintos estudios publicados a lo largo de los años en los que se evalúan la patogenicidad y la sintomatología de la fiebre Q en pequeños rumiantes ponen de manifiesto que la infección por *C. burnetii* se desarrolla de manera comparable en cabras y ovejas en la mayoría de sus aspectos.

Las manifestaciones clínicas más importantes en pequeños rumiantes son el aborto al final de la gestación (Rousset *et al.*, 2009a), el nacimiento de corderos prematuros, débiles o muertos, (Agerholm, 2013; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; van den Brom *et al.*, 2015c) y, en menor medida, los problemas de fertilidad (Cabassi *et al.*, 2006; García-Pérez *et al.*, 2009; Rodolakis, 2009; Parisi *et al.*, 2006). La enfermedad se considera asintomática en animales no gestantes (van den Brom *et al.*, 2015c). Tras adquirir la infección los animales pueden quedar persistentemente infectados durante largos periodos, incluso probablemente durante toda su vida (Ortega-Mora, 2012), localizándose la bacteria de manera persistente en el útero y en las glándulas mamarias (Sánchez *et al.*, 2006).

Tras la entrada de *C. burnetii* por la vía orofaríngea, la bacteria se multiplica en los ganglios linfáticos regionales del hospedador. Posteriormente se produce una fase de bacteriemia durante cinco-siete días, tras la cual la bacteria se dirige a los tejidos diana: el útero (en concreto a la placenta), y las glándulas mamarias (Baboudieri, 1959). Dado el tropismo de *C. burnetii* por las células de la placenta, los animales gestantes son más susceptibles a la infección que los no gestantes (Berri *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2011). Roest y colaboradores (Roest *et al.*, 2012) realizaron una infección experimental por vía intranasal de cabras gestantes y comprobaron el tropismo que presentaba esta bacteria por las células trofoblásticas del alantocorion, la principal diana de *C. burnetii* en animales gestantes. La multiplicación de la bacteria en dichas células da lugar a un importante proceso inflamatorio en el alantocorion. Por el contrario, la bacteria no coloniza las células trofoblásticas que cubren las vellosidades de los cotiledones encargadas del intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto, lo que podría explicar por qué no se produce la muerte fetal prematura a consecuencia de la infección. De hecho, la muerte fetal puede tener lugar en un breve periodo de tiempo antes del proceso inflamatorio que da lugar al aborto o bien durante el mismo, o incluso no producirse, llegando la gestación a término. Por tanto, la patogenia asociada a la infección por *C. burnetii* que conlleva el fallo reproductivo diferiría de la propia de infecciones debidas a *Chlamydia abortus* o *Brucella* spp., donde las alteraciones de las membranas materno-fetales las que dan lugar a la muerte fetal (Anderson *et al.*, 1986a; Anderson *et al.*, 1986b; Buxton *et al.*, 1990; Rodolakis *et al.*, 1998; van den Brom *et al.*, 2015c).

Macroscópicamente, los fetos abortados de ovejas y cabras suelen presentar un aspecto aparentemente normal, aunque a veces pueden presentar un desarrollo reducido (Agerholm, 2013) y signos de autólisis. El análisis histopatológico sus órganos de estos revela un aspecto normal en muchas ocasiones, si bien en algunos casos pueden observarse signos de hepatitis granulomatosa leve (Wouda y Dercksen, 2007 revisado por Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1983; Roest *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2006; Sanford *et al.*, 1994; van den Brom *et al.*, 2015c). Mediante infecciones experimentales en cabras gestantes se ha demostrado que los fetos pueden desarrollar una hepatitis perivascular, que podría ser indicativa de un proceso de bacteriemia (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Arricau Bouvery *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2006). Además, el ADN de *C. burnetii* ha sido detectado mediante PCR en diversos órganos de fetos ovinos y caprinos, como son el hígado, el bazo, los pulmones, el contenido abomasal y peritoneal (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Cantas *et al.*, 2011; Clemente *et al.*, 2009; Dilbeck y McElwain, 1994; Martinov *et al.*, 1989; Masala *et al.*, 2007; Oporto *et al.*, 2006; Palmer *et*

*al.*, 1983; Rady *et al.*, 1985; Sánchez *et al.*, 2006; van Moll *et al.*, 1993; Zeman *et al.*, 1989), poniendo de manifiesto que *C. burnetii* es capaz de infectar a los fetos por la vía hematológica (pudiendo dar lugar a la citada bacteriemia) o bien por ingestión del líquido amniótico contaminado. Sin embargo, como se ha citado previamente, se considera que el aborto se produce a consecuencia de las lesiones producidas por la multiplicación de *C. burnetii* en la placenta, dado que, aunque dicho proceso de bacteriemia pueda tener lugar en el feto, la detección de la bacteria en los tejidos no suele asociarse con la aparición de lesiones en el mismo (Agerholm, 2013).

En cuanto a la placenta, el principal signo de la colonización por *C. burnetii* es el desarrollo de placentitis, que se manifiesta en diferentes niveles de gravedad. Puede ser una placentitis muy leve, manifestándose únicamente por una infiltración mononuclear del tejido, solo apreciable mediante técnicas histopatológicas. Sin embargo, la infección por *C. burnetii* también se ha asociado a placentitis a severa, caracterizada por la aparición de edema y hemorragia del estroma así como por la presencia de un exudado mucopurulento de color amarillento-amarronado asociado a una importante infiltración neutrofílica cubriendo las áreas intercotiledonarias, que a su vez pueden presentar un gran engrosamiento (van den Brom *et al.*, 2015c). También pueden aparecer áreas de necrosis tanto en los cotiledones como en las áreas intercotiledonarias (Agerholm, 2013; Palmer *et al.*, 1983; Sánchez *et al.*, 2006). Histopatológicamente, las células epiteliales del corion suelen presentar, especialmente en la base de las vellosidades de los cotiledones, numerosas vacuolas citoplasmáticas que confieren un aspecto espumoso al citoplasma, en cuyo interior puede observarse la bacteria en forma de gránulos basofílicos, aunque también puede detectarse en forma libre en detritus del tejido. Estos hallazgos histopatológicos en la placenta resultan indicativos de una infección por *C. burnetii* (Agerholm, 2013; van den Brom *et al.*, 2012a). En cabras infectadas experimentalmente se ha observado que el desarrollo de las lesiones placentarias tiene lugar en una etapa tardía de la gestación (Sánchez *et al.*, 2006). Así, en el día 116 de gestación (26 días tras la infección experimental), dichas lesiones aún no se han producido o son muy leves. No es hasta el día 130 de gestación (40 días después del desafío) cuando pueden observarse los signos previamente descritos de placentitis intensa, supurativa y necrotizante tanto en los cotiledones como en las zonas intercotiledonarias.

Como se ha citado previamente, otra de las manifestaciones de la enfermedad en pequeños rumiantes es el nacimiento de cabritos o corderos de bajo peso y con una elevada tasa de mortalidad (van den Brom *et al.*, 2015c). También se ha descrito el

desarrollo de problemas respiratorios y digestivos en cabritos nacidos aparentemente sanos (Wouda y Dercksen, 2007 revisado por van den Brom *et al.*, 2015c; Martinov, 2007a revisado por EFSA, 2010).

El tiempo de incubación desde que se produce la infección por *C. burnetii* hasta que tiene lugar el aborto (cuando este se produce) es variable. En estudios experimentales realizados en cabras gestantes se observó que el fallo reproductivo tenía lugar entre los 25 y los 38 días post-desafío cuando la infección experimental se realizaba a los 84 días de gestación (Arricau Bouvery *et al.*, 2003), mientras cuando esta se llevaba a cabo a los 90 días el aborto se producía entre 25 y 48 días después (Sánchez *et al.*, 2006). Asimismo, en un estudio en condiciones de campo basado en la exposición puntual a *C. burnetii* de tres rebaños de cabras, en una feria de ganado, los tiempos mínimos de incubación hasta la producción de los primeros abortos fueron 21, 53 y 67 días post exposición (Sanford *et al.*, 1994). En el caso de las ovejas, Martinov y colaboradores describieron que los fallos reproductivos tenían lugar entre los días 25 y 65 post infección en animales expuestos en distintos momentos de la gestación, desde los 45 días post cubrición hasta el cuarto mes de preñez (Martinov *et al.*, 1989).

Los animales infectados rara vez desarrollan síntomas clínicos apreciables durante la fase inicial de la infección. Únicamente en un estudio basado en la infección experimental de ovejas por vía intravenosa se observó que los animales desarrollaban fiebre posterior al desafío, así como depresión, salivación, rinitis, conjuntivitis y taquipnea asociada a una neumonía intersticial, junto con una condición sanitaria general deteriorada días antes del acontecimiento reproductivo (Martinov *et al.*, 1989). Sin embargo, en otro trabajo en ganado ovino en el que la infección experimental se llevó a cabo por vía subcutánea (Brooks *et al.*, 1986) no se observó ninguna sintomatología asociada a la infección antes del comienzo de los fallos reproductivos.

En el caso del ganado caprino, tres estudios en los que se evaluó la fase aguda de la enfermedad tras la infección experimental en hembras gestantes, pusieron de manifiesto un incremento de la temperatura rectal de los animales dependiente de la dosis de desafío: se registró fiebre en todos los animales desafiados con una dosis del orden de  $10^8$  dosis infectivas de ratón, mientras que la temperatura corporal normal de aquellos individuos desafiados con una dosis del orden de  $10^4$  dosis infectivas de ratón no se alteró, si bien el desarrollo posterior de fallos reproductivos no se asoció a la dosis de desafío empleada (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Arricau Bouvery *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2006).

A pesar de la ausencia de signos clínicos tras la infección, se ha detectado la presencia de *C. burnetii* en sangre, pulmones, hígado y bazo en los animales adultos infectados en la etapa inicial de la infección (Maurin y Raoult, 1999), así como en intestino, riñón, médula ósea y ganglios linfáticos (además de los tejidos anteriores) hasta la semana 13 de gestación (revisado por Woldehiwet, 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se tienen indicios de que la colonización de la bacteria pueda alterar el normal funcionamiento de los citados órganos ya que tanto en ovejas como en cabras solo se han descrito lesiones leves en animales adultos (Lennette *et al.*, 1952; Roest *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2006). De hecho, en ovejas no se han observado síntomas clínicos en la fase inicial de la infección natural (Agerholm *et al.*, 2013; Berri *et al.*, 2001; Berri *et al.*, 2005a) y los abortos suelen tener lugar sin el desarrollo de ningún signo previo (Agerholm, 2013; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Durante el aborto producido por *C. burnetii*, al igual que por cualquier otra causa de aborto infeccioso, pueden producirse distocias asociadas a la muerte fetal o a una mala posición del feto en situaciones concretas (Sanford *et al.*, 1994). Normalmente los animales se recuperan de forma rápida tras el fallo reproductivo (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005), aunque en cabras se han descrito signos de anorexia, depresión, agalaxia y retención de membranas fetales tras el aborto por *C. burnetii*, aunque de forma muy esporádica (Waldhalm *et al.*, 1978).

En el ganado caprino de leche, puede verse aumentada la incidencia de metritis en explotaciones con abortos producidos por *C. burnetii* (van den Brom *et al.*, 2015c). Sin embargo, no existen evidencias que indiquen que *C. burnetii* pueda producir endometritis *per se*, sino que dicha patología se asociaría a la infección e inflamación de la placenta en caso de aborto, resolviéndose tras el aborto sin necesidad de tratamiento (Sánchez *et al.*, 2006). Puesto que las glándulas mamarias también son un tejido diana de *C. burnetii* y la bacteria puede excretarse por leche, además puede tener lugar la aparición de mastitis asociada a la infección en ovejas (Martinov, 2007b), si bien la incidencia tanto de mastitis como de metritis, al igual que el posible impacto en la producción de leche, no se conoce con detalle hasta la fecha en ninguna especie de rumiante doméstico (EFSA, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, la infección por *C. burnetii* en pequeños ruminantes no siempre tiene como consecuencia el aborto (Martinov *et al.*, 1989; Welsh *et al.*, 1958). Aunque la infección es común, el desarrollo de sintomatología no es frecuente, de modo que en pequeños ruminantes los casos clínicos de fallos reproductivos suelen ser esporádicos más que epidémicos (EFSA, 2010; Agerholm, 2013). Dependiendo de distintos factores como el estado inmune de los animales, el tamaño de rebaño y la

virulencia de la cepa, la introducción de *C. burnetii* en una explotación puede pasar desapercibida, cursando de una manera subclínica en los animales y produciendo en muchos casos un número de abortos insuficiente para alertar al productor sobre la existencia de un problema (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Rodolakis, 2009). Por ello se ha acuñado el término “coxiellosis” para designar el proceso que cursa en animales sin síntomas aparentes (Lang, 1988). Así, Berri y colaboradores describieron que las ovejas infectadas naturalmente pueden no desarrollar signo clínico alguno y tener descendencia con normalidad (Berri *et al.*, 2005a). En esta misma línea otros autores (Roest *et al.*, 2012) observaron que tras una infección experimental en cabras algunas hembras abortaban mientras que otras tenían partos normales con cabritos viables, sin observarse diferencias en cuanto al grado de excreción de la bacteria entre los individuos con partos normales y los que habían sufrido abortos. De hecho, en explotaciones donde la enfermedad circula de forma crónica, como ocurre en áreas endémicas del País Vasco (Ruiz-Fons *et al.*, 2011), la enfermedad puede pasar desapercibida a pesar de la circulación activa de la bacteria (Astobiza *et al.*, 2009). En esta línea, se han descrito también brotes en humanos asociados a explotaciones de ovejas en las que no se observó la presencia de abortos (Gilsdorf *et al.*, 2008).

Sin embargo, los pequeños rumiantes infectados, pero aparentemente sanos, y que, por lo tanto, no desarrollan sintomatología, pueden excretar la bacteria al igual que aquellos individuos que presentan fallos reproductivos. Este fenómeno se ha descrito tanto en ovejas (Abinanti *et al.*, 1953; Astobiza *et al.*, 2009; Berri *et al.*, 2001; Berri *et al.*, 2002; Rodolakis *et al.*, 2007; Runge *et al.*, 2012; Welsh *et al.*, 1951), como en cabras (Alsaleh *et al.*, 2011; de Cremoux *et al.*, 2012a; Rodolakis *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2009a; Rousset *et al.*, 2007).

Sin embargo, dependiendo de distintos factores como el estado inmune de los animales, el tamaño del rebaño, y en ciertas ocasiones de la virulencia de la cepa, la entrada de *C. burnetii* en una explotación también puede dar lugar a tormentas de abortos (Anderson *et al.*, 2015; van den Brom *et al.*, 2015c), como los descritos en el brote de fiebre Q en ganado caprino en Holanda, donde se observó una tasa de abortos del 60% en determinados casos (Roest *et al.*, 2011b; van den Brom, 2009; Wouda y Dercksen, 2007 revisado por EFSA, 2010; van den Brom *et al.*, 2015c). Así, en ganado caprino se han descrito porcentajes variables de abortos en explotaciones infectadas, de entre el 31% y el 93% en brotes (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Hatchette *et al.*, 2003a; Palmer *et al.*, 1983; Sanford *et al.*, 1994; Wouda y Dercksen, 2007 revisado por Moore *et al.*, 1991; van den Brom *et al.*, 2015c; Waldhalm *et al.*, 1978). En otros estudios sobre prevalencias de



abortos asociados a *C. burnetii* no ligados a brotes, se han descrito porcentajes de un 10% en Suiza (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002), 9% en Estados Unidos (Moeller, 2001), 1% en Hungría (Szeredi *et al.*, 2006) y un 0% en Italia (Masala *et al.*, 2007), si bien la información a este respecto es limitada, dado que existen menos trabajos publicados que aquellos centrados en brotes (Agerholm, 2013).

Se considera que el ganado ovino presenta una predisposición al aborto por fiebre Q similar a la de las cabras (Berri *et al.*, 2007; Hirai y To, 1998; Porter *et al.*, 2011), si bien hay autores que señalan que la proporción de abortos tiende a ser mayor en ganado caprino que en ovino (Berri *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2011). Así, dependiendo del estudio se han descrito porcentajes de fallos reproductivos en ovino del 10 al 60% (Clemente *et al.*, 2009; Damoser *et al.*, 1993; Zeman *et al.*, 1989) revisado por (Agerholm, 2013; Masala *et al.*, 2007). Por el contrario, otros estudios encontraron un porcentaje de abortos asociados a *C. burnetii* más reducido: 4% en Alemania (Plagemann, 1989 revisado por van den Brom *et al.*, 2015c), 2,7% en Austria (Damoser *et al.*, 1993 revisado por (Agerholm, 2013), 1% en Suiza (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002), entre el 0 y el 2% en Holanda (van den Brom *et al.*, 2012a; van Engelen *et al.*, 2014a) y 0,1% en Estados Unidos (Kirkbride, 1993b). En España, en un estudio llevado a cabo en rebaños ovinos con problemas de abortos en el País Vasco se observó que *C. burnetii* estaba presente en el 9% de los mismos (Oporto *et al.*, 2006).

Los animales no suelen abortar más de una vez por *C. burnetii* (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005), de forma que, aunque el animal permanezca infectado, este estado no influye en el resultado de las siguientes gestaciones (Berri *et al.*, 2002). Por ello, generalmente, en la estación reproductiva siguiente a la aparición de una tormenta de abortos, en un rebaño suele producirse una menor proporción de fallos reproductivos (Berri *et al.*, 2007; van den Brom, 2009; Wouda y Dercksen, 2007 revisado por van den Brom *et al.*, 2015c).

En cuanto a la respuesta inmune que se desarrolla tras la infección, en un estudio llevado a cabo en cabras se observó que tras la infección experimental los animales desarrollaban IgG e IgM frente a la fase II de *C. burnetii* casi al mismo tiempo, cuyos niveles se incrementan hasta aproximadamente 13 semanas post desafío (Roest *et al.*, 2013c). También se producen anticuerpos frente a la fase I de la bacteria, pero estos se desarrollan aproximadamente cuatro semanas más tarde que los de fase II. Los resultados de este estudio también pusieron de manifiesto que la detección de perfiles serológicos en los que se detectan IgM anti fase II en ausencia de IgG anti Fase I es

indicativo de una infección temprana (Roest *et al.*, 2013c). En relación a lo anterior, en otro estudio en el que se evaluó la evolución serológica de cabras durante un brote, se observó que el 80% de los animales desarrollaban una respuesta inmune predominantemente frente a antígenos de fase II, que evolucionaba a una fase de equivalencia de anticuerpos frente a ambas fases antigénicas de *C. burnetii* para terminar observándose un predominio de anticuerpos frente a la fase I en la práctica totalidad de los animales (Sting *et al.*, 2013b). Resultados similares han sido observados también en bovino (Bottcher *et al.*, 2011), donde los autores constataron que el predominio del número de animales con anticuerpos frente a antígenos de fase II pero no frente a fase I podía reflejar un estado de infección aguda en el rebaño. Por otro lado, en lo que se refiere a la relación entre los patrones serológicos y de excreción de la bacteria, en un estudio reciente realizado en vacas de leche (Lucchese *et al.*, 2015), se ha observado que los animales seropositivos, pero no excretores presentan un perfil de IgG muy bajo en comparación con animales excretores en leche.

En cuanto a la duración de la respuesta inmune serológica, los anticuerpos pueden ser detectados durante meses e incluso años tras la infección de los animales (van den Brom *et al.*, 2015c). A este respecto, algunos estudios han señalado una ausencia de asociación entre los niveles de seroprevalencia y el historial de abortos en explotaciones de pequeños rumiantes, como los realizados en España en la región del País Vasco (Ruiz-Fons *et al.*, 2010), en Turquía (Ozdemir, 1999 revisado por Ceylan, 2009) o en Portugal (Anastacio *et al.*, 2013). Sin embargo, en tres estudios llevados a cabo en estos mismos países (Anastacio *et al.*, 2016; Cetinkaya *et al.*, 2000; García-Pérez *et al.*, 2009) sí se observaron mayores niveles de seroprevalencia en explotaciones con abortos respecto a las que no lo sufrían. En cualquier caso, ha de tenerse en cuenta que en ninguno de los citados estudios se determinó la causa de los abortos mediante técnicas laboratoriales, por lo que otros factores no tenidos en cuenta podrían haber influido en los resultados obtenidos. En relación a la fertilidad, Rizzo y colaboradores observaron que aquellos rebaños en los que se habían detectado problemas de infertilidad durante el año anterior al estudio presentaron mayor riesgo de ser seropositivos a *C. burnetii* (Rizzo *et al.*, 2016).

El papel de la respuesta inmune de base celular asociada a la infección por *C. burnetii* no ha sido bien establecido hasta la fecha, y en lo que respecta a rumiantes domésticos la información disponible es muy limitada (van den Brom *et al.*, 2015c). En estudios realizados en ratones se ha descrito el papel de los linfocitos T CD4+, del gamma interferón y el factor de necrosis tumoral alfa en el control de la proliferación temprana de la bacteria (Andoh *et al.*, 2007), mientras que en humanos se ha demostrado la utilidad

diagnóstica de la detección del gamma interferón mediante ELISA (Limonard *et al.*, 2012). Sin embargo, en un único estudio llevado a cabo en cabras en el que se evaluó la respuesta inmune de tipo celular en animales infectados experimentalmente durante la gestación, no se observaron diferencias sustanciales entre animales infectados y animales control en los niveles de gamma interferón (Roest *et al.*, 2013c). Además, el incremento de dicha citoquina no se detectó hasta la primera semana después del parto, hecho que los autores asociaron al descenso de los niveles de progesterona tras el alumbramiento ya que, durante el mismo, los altos niveles de esta hormona descritos en cabras se asocian a una disminución de la respuesta inmune de base celular (Currie y Thorburn, 1977).

Actualmente se desconoce si los individuos viables nacidos a partir de madres infectadas y con excreción activa en la placeta, los cuales no desarrollan anticuerpos precalostrales (Tutusaus *et al.*, 2013), presentan o no una colonización por *C. burnetii* en sus tejidos (García-Ispuerto *et al.*, 2014). En caso de que la transmisión vertical sea posible para esta bacteria, aspecto aún no plenamente contrastado, la ausencia de dichos anticuerpos precalostrales podría asociarse al desarrollo de una inmunotolerancia al patógeno en el útero, como está descrito en el caso de la diarrea vírica bovina (Houe *et al.*, 1995). En caso de que la unión materno-fetal resista el paso de *C. burnetii* y por tanto esta no sea capaz de transmitirse al feto en el útero, como se ha sugerido con base en los resultados de un estudio llevado a cabo en ratones (Baumgartner y Bachmann, 1992), los individuos recién nacidos podrían contagiarse vía aerógena en el momento del parto (García-Ispuerto *et al.*, 2014).

#### **2.3.1.2. Bovino**

En líneas generales se considera que la fiebre Q en esta especie es con frecuencia asintomática (Ortega-Mora, 2012) y sus efectos negativos en la reproducción de los animales no han sido claramente demostrados hasta la fecha (Agerholm, 2013; García-Ispuerto *et al.*, 2014).

No obstante, en lo que respecta a la relación entre la infección por *C. burnetii* y el aborto, distintos estudios han puesto de manifiesto la asociación entre la fiebre Q en bovino y la aparición de abortos (Agerholm *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1990; Bildfell *et al.*, 2000; Kirkbride, 1993a; Muskens *et al.*, 2011a; Paiba, 1999 revisado por García-Pérez *et al.*, 2009). Asimismo, el ADN de la bacteria se ha detectado mediante PCR en un 26% (Kreizinger *et al.*, 2015), un 17,2% (Parisi *et al.*, 2006), un 17% (Naesens *et al.*, 2012), un 11,6% (Clemente *et al.*, 2009) y un 7,3% de abortos bovinos (Pritchard *et al.*, 2011),

dependiendo de la región de estudio. Sin embargo, diversas investigaciones han sido incapaces de establecer la asociación entre la infección por *C. burnetii* y el fallo reproductivo (Kreizinger *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 1992; López-Gatius *et al.*, 2012; Tramuta *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012), y distintos estudios concluyen en que *C. burnetii* es una causa poco frecuente de aborto en bovino (Bildfell *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2007; Muskens *et al.*, 2011a; Rady *et al.*, 1985). De hecho, en amplios trabajos sobre causas de aborto bovino llevados a cabo en regiones endémicas de fiebre Q de Estados Unidos no encontraron una asociación con la presencia de la bacteria, que no fue detectada (Anderson *et al.*, 1990; Kirkbride, 1993a). En la misma línea, en un estudio llevado a cabo en fetos bovinos en Holanda durante los dos primeros años del brote de fiebre Q en caprino (Muskens *et al.*, 2012) se observó que la detección de *C. burnetii* en los mismos era muy limitada. Tampoco se han descrito hasta la fecha brotes de abortos en bovino debidos a esta bacteria en ninguna región (Agerholm, 2013). Por otro lado, tampoco existen evidencias hasta la fecha que permitan afirmar que *C. burnetii* es una causa significativa de producción de nacidos muertos o terneros débiles (Agerholm, 2013), habiéndose identificado solo puntualmente la presencia de la bacteria en terneros nacidos muertos (Bildfell *et al.*, 2000; Muskens *et al.*, 2011a; van Moll *et al.*, 1993).

La dificultad de determinar el potencial abortivo de *C. burnetii* radica en gran parte en el hecho de que la bacteria se puede detectar en la placenta y en los fluidos vaginales tanto de animales que presentan un aborto como un parto normal (Clemente *et al.*, 2008; Guatteo *et al.*, 2007b; Hansen *et al.*, 2011; Luoto y Huebner, 1950; Parisi *et al.*, 2006; Rodolakis *et al.*, 2007). En los dos únicos estudios basados en infecciones experimentales llevadas a cabo en bovino, realizados durante la década de los 70, tampoco se pudieron relacionar consistentemente los partos prematuros, o los abortos en ninguna fase de la gestación con la infección por *C. burnetii* (Plommet, 1973 revisado por Behymer *et al.*, 1976; García-Ispuerto *et al.*, 2014).

En términos generales, la presencia de *C. burnetii* se suele identificar con más frecuencia en fetos bovinos cuando los abortos tienen lugar en la etapa final de la gestación, aunque este hallazgo podría asociarse al hecho de que los fetos a término suelen ser analizados con más frecuencia que los más tempranos. En cualquier caso, también ha podido observarse que la prevalencia de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* es más frecuente en vacas que han tenido un aborto (por causa indeterminada) en el último trimestre de gestación respecto a las que lo han tenido en el primer o el segundo trimestre (Cabassi *et al.*, 2006). No se ha observado asociación entre el riesgo de aborto y la

estación (Bildfell *et al.*, 2000; Muskens *et al.*, 2011a), si bien se ha descrito que la prevalencia de vacas seropositivas es mayor en otoño (Cabassi *et al.*, 2006).

De forma similar a lo descrito para pequeños rumiantes, una de las lesiones más características en las vacas que abortan debido a *C. burnetii* es la placentitis (Bildfell *et al.*, 2000), que puede ser desde muy leve hasta severa (hemorrágica con signos de necrosis) (Agerholm, 2013). Del mismo modo, las lesiones microscópicas que se observan mediante el empleo de técnicas histopatológicas oscilan desde una inflamación leve con focos dispersos de trofoblastos necróticos y una escasa infiltración de células mononucleares, hasta una inflamación severa con áreas de necrosis, hemorragias, vasculitis y edema, así como un importante infiltrado de neutrófilos. En algunos casos, de forma similar a lo descrito en pequeños rumiantes, los trofoblastos pueden estar distendidos debido a la acumulación en su citoplasma de un gran número de bacterias basófilas en la tinción (Bildfell *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2007; Muskens *et al.*, 2012; Rady *et al.*, 1985; van Moll *et al.*, 1993). Por otro lado, cabe destacar que la presencia de *C. burnetii* en la placenta y la aparición de lesiones en la misma raramente se asocian. Así, distintos trabajos han puesto de manifiesto la detección de *C. burnetii* en placentas sin lesiones graves (Hansen *et al.*, 2011; Muskens *et al.*, 2011a; van Moll *et al.*, 1993). Además, también se han observado menores niveles de colonización de la bacteria en casos de placentitis bovina en relación con aquellos observados en caprino (Muskens *et al.*, 2011a; Wouda y Dercksen, 2007). Teniendo en cuenta que es el desarrollo del proceso inflamatorio en la placenta lo que se considera causa principal del aborto en la infección, no puede asegurarse que la mera presencia de *C. burnetii* en la placenta bovina pueda ser la causa del fallo reproductivo en esta especie (Agerholm, 2013).

En lo que respecta a los fetos derivados de abortos producidos por *C. burnetii*, tal como se describió para pequeños rumiantes, en bovino tampoco suelen desarrollar signos asociados a la infección, aunque pueden presentar signos de autólisis en determinados casos. *C. burnetii* puede colonizar al feto a través de la ingestión o aspiración de líquido amniótico, en caso de que la bacteria atraviese la placenta y contamine el mismo (Agerholm, 2013). De este modo la bacteria puede diseminarse al tracto digestivo (Cantas *et al.*, 2011) y a los pulmones, dando lugar en este último caso al desarrollo de una bronconeumonía en el feto (Bildfell *et al.*, 2000). En cualquier caso, no se descarta la posibilidad de que *C. burnetii* también pueda acceder al feto a través de los vasos sanguíneos umbilicales, lo que explicaría la presencia de la bacteria en diversos órganos y tejidos fetales (Behymer *et al.*, 1976).

En lo que respecta a la infección aguda en bovinos adultos, en los dos únicos estudios basados en la realización de una infección experimental, pudo observarse el desarrollo de fiebre entre uno y tres días tras la infección (Behymer *et al.*, 1976; Plommet, 1973), así como el desarrollo de neumonía autolimitante en uno de ellos (Plommet, 1973).

Otros de los signos clínicos asociados ocasionalmente a la infección por *C. burnetii* en vacuno son la infertilidad (Aitken, 1989; Krauss *et al.*, 1987; To *et al.*, 1998a), las mastitis subclínicas (Barlow *et al.*, 2008), el descenso en la producción de leche (Rose *et al.*, 1994 revisado por Ortega-Mora, 2012), las metritis y las endometritis (Moffat *et al.*, 1970; Muskens *et al.*, 2011b). Sin embargo, en cuanto a la infección *C. burnetii* y el desarrollo de endometritis, actualmente no se dispone de suficientes datos que permitan determinar si existe una asociación entre ambos aspectos (García-Isprieto *et al.*, 2014). A este respecto, cabe citar un trabajo (García-Isprieto *et al.*, 2013) donde se observó que los animales seropositivos presentaban un menor riesgo de sufrir endometritis que los individuos seronegativos, resultado que los autores asociaron al papel protector de los anticuerpos frente al desarrollo de la infección.

En lo que respecta a la asociación entre la detección de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en bovino y el desarrollo de problemas reproductivos derivados de la infección, López-Gatius y colaboradores asociaron la seropositividad en rebaños infectados (positivos a la detección de *C. burnetii* mediante PCR en muestras de tanque de leche) con la retención placentaria, el aumento del intervalo entre el parto y la siguiente concepción, y el mantenimiento de la gestación durante el periodo de desarrollo fetal temprano (López-Gatius *et al.*, 2012). En esta línea, García-Isprieto y colaboradores establecieron una relación entre la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii* y una disminución de las proteínas asociadas a la gestación (PAG) durante el segundo trimestre de la misma, así como con un incremento del cortisol a los 180 días de gestación, aspectos ambos que podrían ser indicadores de daño placentario (García-Isprieto *et al.*, 2010a). Sin embargo, no se ha podido establecer una asociación entre el nivel de anticuerpos en tanque de leche y la mortalidad perinatal (Nielsen *et al.*, 2011), ya que, como se citó previamente, hasta la fecha no existen evidencias que permitan asociar la infección por *C. burnetii* al nacimiento de terneros muertos o débiles (Agerholm, 2013).

En lo que respecta al aborto propiamente dicho, algunos estudios han identificado un mayor riesgo de aborto en animales seropositivos (Cabassi *et al.*, 2006; Sting *et al.*, 2002; Vidic, 1990 revisado por Agerholm, 2013; Cetinkaya *et al.*, 2000) y una asociación entre mayores niveles de seroprevalencia y problemas reproductivos en rebaños de leche (To

*et al.*, 1998a). Sin embargo, en un estudio de casos y controles llevado a cabo por Hassig y colaboradores (Hassig y Lubsen, 1998) se observó que el riesgo de aborto no se veía influido por la presencia de anticuerpos maternos. En la misma línea, Ruiz-Fons y colaboradores (Ruiz-Fons *et al.*, 2010) no detectaron diferencias significativas entre la prevalencia de anticuerpos en rebaños de bovino de carne y su historial reciente de abortos. Más recientemente, en el trabajo publicado por Piñero y colaboradores tampoco se observó una asociación significativa entre los niveles de prevalencia y la presencia o no de problemas reproductivos en la explotación (Piñero *et al.*, 2014b).

En cualquier caso, cabe citar que Agerholm, en su revisión sobre los trastornos reproductivos en animales domésticos asociados a la infección por *C. burnetii*, señala que la mayoría de los estudios dirigidos a evaluar posibles asociaciones entre *C. burnetii* (bien sea en cuanto a excreción o en cuanto a la presencia de anticuerpos) y determinados problemas reproductivos en bovino presentan importantes deficiencias en su diseño respecto a aspectos como la adecuada selección de controles, la definición de casos y la interpretación estadística de los datos (Agerholm, 2013). Por otro lado, dicho trabajo también señala que el hecho de que los animales clínicamente sanos puedan excretar la bacteria sin experimentar fallos reproductivos es otro factor que contribuye a la dificultad de establecer la asociación real entre la excreción de *C. burnetii* y el aborto asociado a esta.

Así, ante la presencia en una explotación de signos compatibles con la presencia de *C. burnetii*, tales como abortos, nacidos muertos, infertilidad, placentitis o endometritis se ha de llevar a cabo una investigación diagnóstica en la población para determinar la causa, que debe incluir la fiebre Q en el diagnóstico diferencial (EFSA, 2010).

#### **2.4. DIAGNÓSTICO DE FIEBRE Q**

En esta sección, se describen las pruebas diagnósticas más importantes disponibles así como su utilidad en cada escenario epidemiológico. Ha de tenerse en cuenta que en el caso de la fiebre Q y a diferencia de otras enfermedades, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) no ha designado hasta la fecha ninguna técnica oficial para el diagnóstico de esta patología, si bien existen recomendaciones recogidas en el “Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres” (OIE, 2016), que se describen en las siguientes secciones.

## 2.4.1. Pruebas basadas en la detección del agente

### 2.4.1.1. Tinción

*C. burnetii* puede ser visualizada microscópicamente tras un proceso de tinción en muestras de tejidos procedentes de placentas o de órganos de fetos así como de fluidos vaginales. Entre las técnicas de tinción que pueden emplearse están el método de Stamp, el de Giménez, el de Machiavello, el de Giemsa, el de Köster modificado y el de Ziehl–Neelsen modificado (Agerholm, 2013). Las tres primeras técnicas permiten obtener los mejores resultados (OIE, 2016), si bien todas ellas presentan importantes limitaciones diagnósticas en cuanto a su sensibilidad analítica, ya que requieren una alta carga bacteriana en la muestra para la visualización de la bacteria. Además, presentan una baja especificidad, ya que puede obtenerse una imagen compatible con la presencia de *C. burnetii* en muestras clínicas que contengan otras bacterias productoras de abortos en rumiantes como *Chlamydia abortus* o bacterias del género *Brucella*, que ofrecen una imagen microscópica similar (Guatteo *et al.*, 2006). Debido a estas limitaciones, ante cualquier resultado no concluyente de la tinción ha de emplearse algún otro método diagnóstico confirmatorio de la presencia de la bacteria, como la PCR (OIE, 2016).

### 2.4.1.2. Pruebas inmunohistoquímicas

La detección de *C. burnetii* también puede llevarse a cabo mediante técnicas de inmunohistoquímica (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa) en tejidos de placentas y fetos que previamente se incluyan en parafina, o en frotis de tejidos o hisopos vaginales fijados con acetona (OIE, 2016; Bildfell *et al.*, 2000; Hazlett *et al.*, 2013; Muskens *et al.*, 2012; Raoult *et al.*, 1994; van Moll *et al.*, 1993). En estas técnicas la presencia de *C. burnetii*, se evidencia mediante la adición de anticuerpos específicos que se unen a la bacteria seguida del empleo de un anticuerpo secundario marcado con isocianato de fluoresceína en el caso de la inmunofluorescencia, o con peroxidasa en el caso de la técnica de inmunoperoxidasa (Raoult *et al.*, 1994). Una de las ventajas de la inmunohistoquímica es que no precisa de bacteria viva ni de tejidos frescos para la realización del diagnóstico (Dilbeck y McElwain, 1994). Actualmente este tipo de análisis pueden realizarse mediante la adaptación del sistema comercial DAKO EnVision+System (van den Brom *et al.*, 2015c; Wouda y Dercksen, 2007). Otra opción diagnóstica es el empleo de la hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescent in situ hybridization*, FISH), especialmente indicada para muestras de placenta (Jensen *et al.*, 2007), en la que se emplean sondas de oligonucleótidos que hibridan de forma específica con el ARNr 16S de *C. burnetii* presente en tejidos incluidos en parafina. La ventaja de estas técnicas es



que permiten la visualización directa de *C. burnetii* y la estimación del número de bacterias asociadas a las lesiones (Hazlett *et al.*, 2013).

Sus limitaciones, además de ser laboriosas y caras, están asociadas a su reducida sensibilidad analítica (van den Brom *et al.*, 2015c), por lo que están indicadas para el análisis de tejidos que sean susceptibles de presentar una alta carga bacteriana como la placenta.

### 2.4.1.3. Cultivo

Puesto que *C. burnetii* es una bacteria intracelular obligada, desde el momento de su primera descripción su aislamiento ha requerido el empleo de animales de laboratorio, huevos embrionados o, más recientemente, líneas celulares (Burnet y Freeman, 1983; Cox, 1939a; Cox, 1939b; Davis, 1938; van den Brom *et al.*, 2015c). En cualquier caso, se considera que las técnicas de cultivo no son prácticas para su empleo rutinario en estudios epidemiológicos (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005) debido a su complejidad, requerimientos de bioseguridad y coste, además de su limitada sensibilidad respecto a otras técnicas actuales como la PCR. De hecho, cualquier procedimiento que implique la multiplicación del agente, independientemente del sistema empleado, debe realizarse en laboratorios que dispongan de instalaciones de nivel de seguridad biológica 3 (Real Decreto 664/1997, Directiva 2000/54/CE del Parlamento Europeo y del Consejo).

En general, las técnicas de cultivo y aislamiento son consideradas como técnicas de referencia para el diagnóstico de las infecciones bacterianas (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Porter *et al.*, 2011). Sin embargo, en el caso concreto del diagnóstico de la fiebre Q en animales actualmente ningún test diagnóstico cuenta con tal denominación (OIE, 2016).

La inoculación de **animales de laboratorio**, principalmente cobayas y ratones, por vía intraperitoneal (Lang, 1990; Maurin y Raoult, 1999), es el procedimiento menos empleado actualmente, si bien presenta utilidad como paso previo para el cultivo de muestras con una concentración baja de bacteria, así como tejidos contaminados con otras bacterias, como puede ser el caso de placentas, leche o heces (OIE, 2016; van den Brom *et al.*, 2015c). Los animales suelen desarrollar fiebre tras cinco-ocho días desde la inoculación, y a los 21 días tras la aparición de la misma se les extrae el bazo para su cultivo en huevos embrionados o líneas celulares, o bien para su observación microscópica mediante frotis (Scott *et al.*, 1987). También puede llevarse a cabo la detección directa del ADN de *C. burnetii* mediante PCR a partir del bazo.

El empleo de **huevos embrionados**, ampliamente utilizados en el pasado y donde *C. burnetii* crece exclusivamente en las células del saco vitelino, requiere un tiempo de cultivo de entre diez y 12 días (Oyston y Davies, 2011) aunque pueden ser necesarios varios pases para obtener un aislamiento en cultivo en pureza (OIE, 2016). Esta técnica presenta diversas desventajas, como que el crecimiento no puede ser monitorizado visualmente y su limitada sensibilidad analítica en casos en los que existe contaminación con otras bacterias capaces de crecer en este tipo de sistema (van den Brom *et al.*, 2015c). Es, además, un procedimiento laborioso de difícil aplicación como técnica de diagnóstico rutinario (Klee *et al.*, 2006b; Maurin y Raoult, 1999).

Actualmente el uso de **líneas celulares** es el método más empleado para el aislamiento de *C. burnetii*. Para ello se ha adaptado un sistema de microcultivo comercial empleado en virología, el método del vial cerrado (OIE, 2016; Raoult *et al.*, 1994). Existen distintas líneas celulares que se pueden emplear, como, por ejemplo, células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano) o células de fibroblastos de pulmón de embrión humano HEL (Voth y Heinzen, 2007). El crecimiento de *C. burnetii* se manifiesta por la producción de un efecto citopático que da lugar a la formación de vacuolas visibles en el microscopio. La principal ventaja de esta técnica es la rapidez en el aislamiento, normalmente entre seis y 12 días (Spyridaki *et al.*, 2002).

Tanto el cultivo en huevos embrionados como en líneas celulares se puede llevar a cabo sin el empleo de antibióticos para garantizar un óptimo crecimiento de la bacteria (Roest *et al.*, 2012), pudiendo recurrir a la filtración de la muestra para evitar la contaminación. Sin embargo, la filtración puede reducir la sensibilidad de las técnicas de cultivo (van den Brom *et al.*, 2015c).

Los avances en el conocimiento de la patogenia intracelular de *C. burnetii* en los últimos años han permitido el desarrollo de **medios axénicos** cuya composición recrea el ambiente ácido necesario (pH 4,75) y con baja tensión de oxígeno (2,5%), permitiendo la replicación de *C. burnetii* en un periodo aproximado de seis días de incubación sin necesidad de células (van Schaik *et al.*, 2013). Inicialmente se describió el medio ácido citrato cisteína (ACCM) (Omsland, 2012; Omsland *et al.*, 2009) y posteriormente fue mejorado por los medios ácido citrato cisteína 2 (ACCM-2) (Sandoz *et al.*, 2014) y, más recientemente, por el medio ácido citrato cisteína definido ACCM-D (Sandoz *et al.*, 2016). El empleo de este tipo de medios evita la presencia de material genético de las células hospedadoras (de animal de laboratorio, huevo embrionado o línea celular), lo que es útil tanto para la realización de estudios de caracterización genética de *C. burnetii* en los que

dicho material exógeno puede interferir (Sandoz *et al.*, 2016a), como para la producción de vacunas (van den Brom *et al.*, 2015c). Además, estos medios también facilitan la transición de las formas SCV de la bacteria a LCV, y de las formas de fase I a fase II (Fournier *et al.*, 1998), de gran utilidad para el estudio de la biología y patogénesis de *C. burnetii* (Oyston y Davies, 2011).

### 2.4.1.4. Pruebas de detección molecular

Las distintas técnicas basadas en la PCR consisten en la amplificación específica de fragmentos de ADN diana de un determinado patógeno generando un gran número de copias (Mullis *et al.*, 1986). Estas técnicas han sido ampliamente utilizadas para la detección de ADN de *C. burnetii* en los últimos 25 años (de Bruin, 2011), tanto en su versión convencional con las variantes anidada (Rahimi *et al.*, 2010) y *touchdown* (Berri *et al.*, 2000), como, más recientemente, en su versión en tiempo real. Esta última opción ofrece una mayor sensibilidad diagnóstica, además de permitir cuantificar la cantidad de bacterias presentes en la muestra analizada (de Bruin, 2011). Todas estas técnicas son aptas para emplearse en muestras de distinto origen, tanto de tipo clínico [principalmente hisopos vaginales (Astobiza *et al.*, 2011a), placentas y tejidos fetales (Hazlett *et al.*, 2013)] como en leche, heces (Joulie *et al.*, 2015) o semen (García-Seco *et al.*, 2016). También son útiles para su empleo en alimentos de origen animal, principalmente productos lácteos (Galiero *et al.*, 2016) y muestras ambientales [aire, polvo (Joulie *et al.*, 2015), suelo (Kersh *et al.*, 2013), estiércol (de Bruin *et al.*, 2013), etc.]. Además, se puede utilizar tanto en muestras frescas como congeladas, conservadas en formalina o fijadas con parafina (Fournier y Raoult, 2003). También existen protocolos de PCR múltiple que permiten detectar en una sola reacción no solo la presencia de *C. burnetii*, sino también otros patógenos productores de abortos, algo de gran utilidad en el diagnóstico de fallos reproductivos en rumiantes domésticos (Tramuta *et al.*, 2011).

Como diana para el diseño de estos ensayos de PCR se han utilizado diversas regiones del genoma de *C. burnetii*, como el gen *icd* (de la isocitrato deshidrogenasa) (Klee *et al.*, 2006a), el gen *com1* [que codifica una proteína de 27kDa de la membrana externa (de Bruin *et al.*, 2013)], el gen *cbmip* [que codifica la proteína potenciadora de la infectividad del macrófago (Zhang *et al.*, 1998)], y el gen *sod* [de la enzima superóxido dismutasa (Stein y Raoult, 1992)]. Sin embargo, la secuencia de inserción IS1111 ha sido una de las más utilizadas para el desarrollo de ensayos de PCR (de Bruin, 2011) ya que ofrece una mayor sensibilidad diagnóstica debido a que se trata de secuencia de copia múltiple que presenta entre siete y 110 copias dependiendo de la cepa (Klee *et al.*, 2006b; Natale *et*

*al.*, 2012). Sin embargo, algunos autores han cuestionado la presencia de esta secuencia en todas las cepas de *C. burnetii* (Marmion *et al.*, 2005; Rolain y Raoult, 2005).

Las técnicas de PCR son recomendadas actualmente como pruebas de elección para la detección directa de *C. burnetii* en muestras de rumiantes domésticos debido a las amplias ventajas que presentan frente a otras técnicas (OIE, 2016). Así, son técnicas altamente específicas y sensibles que pueden llegar a presentar un límite de detección de hasta una copia de genoma por reacción (de Bruin *et al.*, 2011; Lockhart *et al.*, 2011). La gran sensibilidad que presentan, junto con su rapidez, las convierten en técnicas ideales para identificar animales excretores (EFSA, 2010; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). También permiten la detección de *C. burnetii* en los periodos iniciales de la infección en los que los individuos aún son seronegativos [entre dos y cuatro semanas tras la infección (Fournier y Raoult, 2003)] e indetectables por otras técnicas. Además, pueden ser automatizadas en gran parte, lo que permite el procesamiento de un gran número de muestras, lo que las convierte en técnicas útiles para la realización de estudios de prevalencias o de vigilancia a gran escala (van den Brom *et al.*, 2015b). Existe una variante, la técnica LAMP (*loop mediated isothermal amplification*), también basada en la amplificación de ADN pero en condiciones isotermas y que requiere menos instrumentos para su realización, que también ha sido evaluada como técnica para la detección directa de *C. burnetii* para su empleo en laboratorios con pocos recursos y tecnología poco avanzada, con resultados de sensibilidad y especificidad diagnóstica equivalentes a los de las técnicas de PCR de acuerdo a los estudios publicados (Pan *et al.*, 2013; Raele *et al.*, 2015).

La amplia utilización de las técnicas de PCR ha dado lugar al desarrollo de distintos kits comerciales de PCR que resultan ser específicos, sensibles y rápidos, por lo que son útiles para la detección y cuantificación de *C. burnetii* en distintos tipos de muestras biológicas (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Berri *et al.*, 2003a; Rodolakis, 2009; EFSA, 2010; de Bruin, 2011).

Sin embargo, las técnicas de PCR también presentan algunas limitaciones que pueden conducir a la aparición de resultados falsos negativos y falsos positivos asociados a diferentes motivos. Así, pueden producirse inhibiciones de la reacción debido a la presencia de diversas sustancias presentes en la muestra que interfieren con la reacción de PCR mediante distintos mecanismos (Capuano *et al.*, 2004; de Bruin, 2011), por lo que se recomienda el uso de un control interno para detectarlas (Angen *et al.*, 2011). El riesgo de inhibición de la reacción puede, en todo caso, limitarse adaptando los protocolos de

extracción de ADN al tipo de muestra empleada. La congelación puede también dar lugar a falsos resultados negativos (Guatteo, 2007), por lo que se recomienda el procesamiento de las muestras en fresco siempre que sea posible. Por otro lado, a pesar de su especificidad, en el caso de que las técnicas de PCR se realicen sobre muestras de garrapatas pueden producirse falsos resultados positivos asociados a la presencia de bacterias *Coxiella-like* genéticamente similares a *C. burnetii* (Elsa *et al.*, 2015; Reeves *et al.*, 2006).

Los resultados de detección de *C. burnetii* han de interpretarse teniendo en cuenta una serie de particularidades asociadas a la metodología aplicada en el diagnóstico, así como a la propia enfermedad en rumiantes.

Por un lado, determinar el potencial abortivo de *C. burnetii* en base únicamente a la detección de la bacteria mediante PCR en muestras clínicas presenta claras limitaciones, ya que como se ha descrito previamente, la bacteria puede ser detectada en la placenta y secreciones vaginales tanto de animales que han presentado un aborto como un parto normal (Clemente *et al.*, 2009; Guatteo *et al.*, 2007b; Hansen *et al.*, 2011; Luoto y Huebner, 1950; Parisi *et al.*, 2006; Rodolakis *et al.*, 2007). También ha de tenerse en cuenta que la amplia distribución ambiental de la bacteria, especialmente en explotaciones infectadas, aumenta las posibilidades de contaminación cruzada en la toma de muestras, por lo que es importante tener en cuenta la cantidad de ADN detectada a la hora de interpretar los resultados (van den Brom *et al.*, 2015c). Además, la detección de *C. burnetii* en muestras de un animal que ha presentado un aborto no necesariamente indica que este patógeno sea la causa del mismo, pudiendo estar dicho fallo reproductivo asociado a otro agente infeccioso, por lo que han de valorarse otros posibles agentes abortivos que puedan estar produciendo una co-infección en el animal (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002; Hazlett *et al.*, 2013). En este último caso, el empleo de protocolos de cuantificación es de gran utilidad a la hora de atribuir un aborto a *C. burnetii* (Guatteo *et al.*, 2012), estando su uso recomendado por la EFSA (EFSA, 2010), ya que una mayor concentración de bacteria se asocia con mayor frecuencia a los casos clínicos (OIE, 2016). Por ello se han diseñado distintos protocolos de cuantificación de ADN tanto relativa como absoluta mediante PCR en tiempo real (de Bruin, 2011; Sting *et al.*, 2015).

Por otro lado, a la hora de identificar animales excretores en una explotación mediante el empleo de técnicas de PCR han de tenerse en cuenta dos aspectos de la dinámica de excreción de *C. burnetii* previamente citados (sección 2. 2. 2), que pueden dificultar la identificación de los mismos: el patrón de excreción intermitente de la bacteria y la posible

excreción de la misma por distintas vías, que puede variar individualmente. Por ello es conveniente tomar más de un tipo de muestra y realizar muestreos diferentes, preferiblemente dentro de los ocho días tras el acontecimiento reproductivo para, de este modo, aumentar las probabilidades de detección de un animal excretor (Natale *et al.*, 2012), ya que en determinados casos los animales pueden excretar grandes cantidades de bacteria únicamente en el momento del parto y durante un periodo muy corto tras el mismo (Roest *et al.*, 2012).

Otra de las limitaciones de las técnicas de PCR consiste en que al basarse en la detección de ADN de la bacteria no permite evaluar la viabilidad de misma, aspecto importante de cara a valorar la capacidad infectiva de la muestra evaluada. Para intentar solventar esta limitación se diseñó la técnica EMA-PCR basada en el tratamiento previo de la muestra con bromuro de etidio monoácido (EMA) (Nocker y Camper, 2006) y que ha sido empleada con éxito en un trabajo de *C. burnetii* (Mori *et al.*, 2013). El EMA es capaz de penetrar en aquellas bacterias cuya pared no esté intacta y unirse al ADN impidiendo la reacción de PCR, de tal manera que durante dicha reacción solo amplifican aquellas moléculas de ADN de bacterias viables con pared intacta.

#### **2.4.1.5. Pruebas de caracterización molecular**

La caracterización molecular de *C. burnetii* circulantes es fundamental para conocer las variaciones de la epidemiología de la fiebre Q en función de la región geográfica, así como los factores epidemiológicos emergentes (Sidi-Boumedine, 2011). Por ejemplo, permite asociar determinadas cepas con la aparición de casos clínicos con un determinado patrón sintomático (González-Barrio *et al.*, 2016b), así como identificación de reservorios que pueden tener un papel relevante en la epidemiología de una determinada zona (González-Barrio *et al.*, 2016a; González-Barrio *et al.*, 2016b). Estas técnicas son de gran utilidad en casos de brotes de enfermedad, para poder determinar su origen. Además, son útiles para realizar labores de vigilancia y control tanto dentro del marco de brotes de enfermedad (Roest *et al.*, 2011a) como fuera de estos (Astobiza *et al.*, 2012b; González-Barrio *et al.*, 2016a; González-Barrio *et al.*, 2016b; Jado *et al.*, 2012; Pearson *et al.*, 2014; Piñero *et al.*, 2015). A lo largo de los años se han descrito distintas técnicas de caracterización molecular para *C. burnetii* (Massung *et al.*, 2012; Sidi-Boumedine, 2011; van den Brom *et al.*, 2015c). Algunas de ellas se recogen a continuación: i) la técnica PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) o de electroforesis en campo pulsado (Heinzen *et al.*, 1990; Jager *et al.*, 1998), ii) la técnica PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism typing*) basada en el análisis de longitud de polimorfismos de fragmentos de restricción de los

genes *icd*, *com1* y *mucZ* mediante el empleo de enzimas de restricción (Andoh *et al.*, 2004; Nguyen y Hirai, 1999; Spyridaki *et al.*, 1998; Stein y Raoult, 1992), iii) la secuenciación de los genes de codificación *com1* y *mucZ* (Sekeyova *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997), iv) los *microarrays* (Beare *et al.*, 2009; Leroy *et al.*, 2011), v) el estudio de los perfiles de plásmidos (Aarts *et al.*, 2001), vi) la caracterización (número de repeticiones) del fragmento de inserción IS1111 (Denison *et al.*, 2007b) y, más recientemente, vii) la técnica *WGPScanning* (*whole genome PCR scanning*), en la que se utilizan parejas de cebadores diseñados a partir de una cepa de referencia que cubren todo el genoma, obteniéndose información sobre posición de genes, así como de fragmentos de inserción y delección (Sidi-Boumedine *et al.*, 2015a).

Todas estas técnicas tienen una importante limitación común: requieren partir de cultivos puros de *C. burnetii*, no siendo posible llevarlas a cabo directamente a partir de muestras clínicas o ambientales sin un paso de cultivo previo. Para solventar este problema se han desarrollado técnicas de caracterización molecular que pueden ser llevadas a cabo directamente a partir de muestras sin necesidad de un aislamiento previo. Estas técnicas son i) la tipificación de la secuencia multi-espacio MST, consistente en la evaluación de la variación en la secuencia de ADN en regiones intergénicas cortas del genoma de *C. burnetii* mediante secuenciación (Astobiza *et al.*, 2012b; Glazunova *et al.*, 2005), ii) la técnica MLVA (*Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis*) o análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable, que se basa en evaluar el número de repeticiones en tándem de elementos de ADN en diferentes *loci* del genoma (Arricau-Bouvery *et al.*, 2006; Astobiza *et al.*, 2012b; González-Barrio *et al.*, 2016a; Piñero *et al.*, 2015; Prigent *et al.*, 2015; Svraka *et al.*, 2006), iii) la técnica RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) o de amplificación aleatoria del ADN polimórfico, consistente en la comparación de regiones del genoma amplificadas de forma aleatoria (Sidi-Boumedine *et al.*, 2009), iv) la técnica PCR-RLB (*Multiplex PCR and Reverse Line Blot Hybridization*) basada en la realización de una PCR múltiple y una hibridación con sondas específicas (Beare *et al.*, 2006; González-Barrio *et al.*, 2016b; Jado *et al.*, 2012) y v) la genotipificación por SNP polimorfismo de nucleótido único (*randomly amplified polymorphic DNA*), consistente en detectar la variación de un solo nucleótido en un determinado *locus* del genoma de *C. burnetii* (Hermans *et al.*, 2011; Hornstra *et al.*, 2011; Huijsmans *et al.*, 2011; Karlsson *et al.*, 2014). Por otro lado, la mejora de la tecnología de secuenciación masiva ha permitido recientemente llevar a cabo este tipo de estudios de forma exitosa directamente a partir de muestras clínicas (Frangoulidis y Walter, 2016).

De todas estas técnicas, el MLVA y SNP son las que presentan mayor poder discriminatorio (OIE, 2016; Arricau-Bouvery *et al.*, 2006; Massung *et al.*, 2012) y han sido las más utilizadas en los últimos años en distintos trabajos. Además, tanto la EFSA (Sidi-Boumedine *et al.*, 2015b) como la OIE (OIE, 2016) han recomendado potenciar los trabajos dirigidos a establecer un esquema estandarizado de la técnica MLVA de *C. burnetii*.

Por otro lado, cabe señalar que las técnicas basadas en la espectrometría de masas también se han utilizado en investigaciones relacionadas con la caracterización y el diagnóstico *C. burnetii* en casos humanos, aunque de forma muy limitada hasta la fecha (Hernychova *et al.*, 2008; Kowalczywska *et al.*, 2011; Vranakis *et al.*, 2013).

#### **2.4.2. Pruebas basadas en la respuesta inmune del hospedador**

El diagnóstico indirecto de la fiebre Q en rumiantes domésticos se basa fundamentalmente en la evaluación de la respuesta inmune mediada por anticuerpos, que puede valorarse mediante distintos tipos de técnicas serológicas, como la microaglutinación, la Fijación del Complemento, la inmunofluorescencia indirecta, o los test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Sin embargo, son estas dos últimas las más ampliamente empleadas en la actualidad, especialmente el ELISA, que presenta gran utilidad como test diagnóstico de cribado, así como para la realización de estudios epidemiológicos a gran escala en rumiantes domésticos (van den Brom *et al.*, 2015c). Así, aunque actualmente la OIE no establece ningún test de referencia para el diagnóstico serológico de la fiebre Q en animales, propone los test ELISA como método de elección (OIE, 2016).

No obstante, también se ha descrito el empleo de una prueba cutánea como prueba de diagnóstico indirecto basada en la respuesta inmune de base celular para la detección de animales infectados en el rebaño (Guatteo *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de ser una técnica barata y sensible (van den Brom *et al.*, 2015c) en rumiantes está muy poco estudiada (Guatteo *et al.*, 2008). En humanos este test se emplea para determinar una exposición previa a la bacteria en campañas de vacunación (Schoffelen *et al.*, 2014). Esta prueba diagnóstica presenta el mismo fundamento que otras pruebas cutáneas descritas para el diagnóstico de otras enfermedades de los rumiantes domésticos, como la tuberculosis (Bezoz *et al.*, 2014) o la brucelosis (Bercovich, 2000). La técnica consiste en la inoculación intradérmica de un antígeno inactivado de *C. burnetii*, para lo que se emplea el antígeno vacunal de la vacuna comercial Coxevac®. Tras la inoculación, si el animal ha tenido contacto previo con *C. burnetii* se produce una reacción de hipersensibilidad



retardada de tipo IV en el punto de inoculación que puede leerse a las 72 horas tras la aplicación y que se manifiesta por un engrosamiento de la piel. La reacción puede valorarse de forma objetiva midiendo el engrosamiento mediante el empleo de un cutímetro.

A continuación, pasan a describirse las principales técnicas diagnósticas empleadas en rumiantes domésticos basadas en la detección de anticuerpos.

### 2.4.2.1. Fijación del Complemento

Esta técnica se basa en la capacidad del sistema del complemento del sistema inmune del hospedador para unirse a los complejos antígeno-anticuerpo, lo que neutraliza la capacidad del complemento de lisar eritrocitos (Herr *et al.*, 1985; Murphy y Field, 1970). La prueba se realiza en dos etapas, en primer lugar, se enfrenta el suero problema al antígeno de *C. burnetii*, lo que permite la formación de dichos complejos antígeno-anticuerpo en caso de que la muestra contenga anticuerpos frente a ese patógeno. En una segunda fase se añaden tanto el complemento (obtenido a partir de cobayas) como eritrocitos de oveja; en caso de que la muestra presente anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* el complemento se une a los inmunocomplejos formados quedando por tanto su acción hemolítica bloqueada. Sin embargo, si la muestra es negativa, el complemento puede actuar sobre los eritrocitos, lisándolos. Los títulos serológicos de 1/80 o mayores son indicativos de fase activa de la infección. Los títulos comprendidos entre 1/10 y 1/40 en sueros de un grupo de cinco a diez animales son característicos de una infección adquirida con anterioridad en el tiempo, crónica en el rebaño (OIE, 2016).

La técnica de la fijación del complemento era considerada hace años por la OIE el test de referencia para el diagnóstico serológico de la fiebre Q en animales por razones históricas (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Sin embargo, las claras desventajas que presenta frente a otras técnicas disponibles actualmente han implicado que su frecuencia de uso haya disminuido notoriamente (Roest *et al.*, 2013b).

Así, por ejemplo, se trata de una técnica laboriosa, que no permite su automatización y que presenta una reducida sensibilidad diagnóstica respecto a otros test como la inmunofluorescencia indirecta y los ELISAs (EFSA, 2010; Horigan *et al.*, 2011; Kittelberger *et al.*, 2009; Maurin y Raoult, 1999; Natale *et al.*, 2012; Rousset *et al.*, 2007; Schmeer *et al.*, 1987), siendo entre ocho y 16 veces menos sensible que estos últimos (Roest *et al.*, 2009 revisado por EFSA, 2010).

Esta limitada sensibilidad diagnóstica se ha asociado con el antígeno de *C. burnetii* empleado, que normalmente es de fase II, habiéndose observado que falla frecuentemente para el diagnóstico de muestras de cabras y ovejas (Kovacova *et al.*, 1998). Además, en rumiantes, este test solo es capaz de detectar IgG1 y, en menor medida, IgM, lo que también contribuiría a limitar la sensibilidad del mismo. Por último, se ha de considerar que la IgG2 y la IgM pueden presentar actividad anticomplementaria (Schmeer, 1985), pudiendo contribuir a que el título serológico obtenido en la prueba sea más bajo (Kittelberger *et al.*, 2009; Rousset *et al.*, 2009a).

Dependiendo del estudio, la sensibilidad diagnóstica descrita para este test es del 56,4% en ovejas (Horigan *et al.*, 2011), y del 26,5%-36,7% en vacas (Horigan *et al.*, 2011; Muleme *et al.*, 2016). En cabras, especie en la que se han realizado más investigaciones, se describe una sensibilidad de entre el 20,6% y el 89% (Emery *et al.*, 2014; Horigan *et al.*, 2011; Muleme *et al.*, 2016). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo en muestras de caprino y ovino se describió una sensibilidad del 68% (Kittelberger *et al.*, 2009), mientras que en otro esta se situó en el 9,96% (Natale *et al.*, 2012). Por todo ello, algunos autores han llegado incluso a recomendar específicamente no emplear la técnica de la Fijación del Complemento como test de cribado para rumiantes (Rousset *et al.*, 2007).

Sin embargo, la técnica de la Fijación del Complemento presenta algunas ventajas como su gran especificidad diagnóstica, que hace que aún se considere útil para identificar rebaños infectados y declarar rebaños libres (OIE, 2016), si bien se necesita un tamaño de muestra mayor que el requerido con otras técnicas serológicas debido a su limitada sensibilidad. Así, se ha descrito para esta técnica una especificidad del 98,5% en ovejas (Horigan *et al.*, 2011), del 99,7-100% en vacas (Horigan *et al.*, 2011; Muleme *et al.*, 2016), y en el caso de las cabras, del 82-97,3% (Emery *et al.*, 2014; Horigan *et al.*, 2011; Muleme *et al.*, 2016), dependiendo del estudio. Asimismo, en un trabajo llevado a cabo en muestras de cabras y ovejas, la especificidad observada fue del 99,7% (Natale *et al.*, 2012).

Por otro lado, distintos estudios han puesto de manifiesto que, en determinados casos, pueden encontrarse muestras que presentan un resultado positivo a la técnica de la Fijación del Complemento pero que son negativas en los test ELISA, especialmente cuando presentan títulos bajos (Emery *et al.*, 2012; Kittelberger *et al.*, 2009). Este fenómeno se ha asociado al predominio en los sueros analizados de IgM en lugar de IgG frente a *C. burnetii*, lo que puede dar lugar a un resultado positivo en la Fijación del Complemento, pero que, en el ELISA, teniendo en cuenta que los test comerciales disponibles solo detectan IgG, daría lugar a un resultado negativo (Emery *et al.*, 2012; Kittelberger *et al.*, 2009). Por otro lado, algunos autores han observado una mayor

correlación entre resultados serológicos y el estatus de excreción en rumiantes domésticos mediante el empleo de la técnica de Fijación del Complemento que mediante un test ELISA, habiéndose sugerido una posible asociación entre un resultado positivo en la Fijación del Complemento y el estatus de animal persistentemente excretor en vacas, si bien no se dispone de datos suficientes para confirmar esta teoría (Natale *et al.*, 2012; Natale *et al.*, 2009).

#### 2.4.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Esta técnica es el método diagnóstico de referencia actual para el diagnóstico de la fiebre Q en humanos (OIE, 2016), y también ha sido utilizada en diversos estudios en rumiantes domésticos (Bottcher *et al.*, 2011; Hatchette *et al.*, 2003a; Krt, 2003; Lucchese *et al.*, 2015; Mares-Guia *et al.*, 2014; MazyadyHafez, 2007; Roest *et al.*, 2013a; Rousset *et al.*, 2009a; Rousset *et al.*, 2007; Ruiz-Fons *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2009).

El protocolo de la IFI (Field *et al.*, 1983; Peter *et al.*, 1985) se lleva a cabo depositando el antígeno de *C. burnetii* en los pocillos de un portaobjetos de vidrio para microscopio, dejándolo secar y fijándolo con acetona. El protocolo continúa añadiendo el suero problema a los portaobjetos realizando diluciones seriadas y dejándolo incubar. Posteriormente se realiza un lavado, procediéndose a añadir el anticuerpo secundario contra la especie de la que procede el suero conjugado con isocionato de fluoresceína. La reacción se observa al microscopio de fluorescencia (OIE, 2016). Esta técnica puede adaptarse para la detección tanto de IgG como de IgM específicas frente a antígenos *C. burnetii* de fase I (obtenidos a partir del bazo de animales de laboratorio) o de fase II [cultivando la cepa de referencia *C. burnetii* Nine Mile (ATCC VR 615) en cultivo celular] (OIE, 2016; Muleme *et al.*, 2016).

La IFI se considera una técnica muy sensible y específica, a pesar de que no existen muchos trabajos publicados evaluando su rendimiento diagnóstico. En un estudio publicado recientemente llevado a cabo en cabras (Muleme *et al.*, 2016) se ha descrito una sensibilidad que osciló entre el 84,5% y el 94,8% y una especificidad de entre el 92,4% y el 94,4%, dependiendo del tipo de anticuerpos que frente a los que estaba diseñada la prueba. Asimismo, en un ensayo llevado a cabo en un número limitado de sueros de ovejas, cabras, vacas y búfalos se describió una sensibilidad del 90% (Vaidya *et al.*, 2010). En líneas generales se considera que la IFI ofrece valores de especificidad y sensibilidad diagnóstica equivalentes a los test ELISA (EFSA, 2010), si bien Rousset y colaboradores (Rousset *et al.*, 2007) observaron que la sensibilidad de esta técnica era ligeramente inferior al del ELISA en rebaños de cabras. Por el contrario, en un estudio

realizado recientemente en cabras, Muleme y colaboradores (Muleme *et al.*, 2016) observaron que la sensibilidad diagnóstica de la IFI era superior a la obtenida con ELISA y la Fijación del Complemento como también se ha descrito para esta técnica en humanos (Meekelenkamp *et al.*, 2012).

En rumiantes domésticos no se ha podido establecer aún con exactitud una asociación entre las fases de la infección y determinados perfiles de anticuerpos a nivel individual (OIE, 2016), como sí se ha hecho en humanos, donde se ha observado que los anticuerpos frente a los antígenos de fase II predominan después de la infección primaria y persisten a lo largo del tiempo mientras que los títulos altos de anticuerpos anti fase I se observan solo en las fases crónicas (Fournier *et al.*, 1998). Sin embargo, en rumiantes domésticos se han llevado a cabo avances en este sentido en los últimos años. Así, en un estudio llevado a cabo en bovino de leche en el que se empleó la inmunofluorescencia indirecta de forma paralela a un test ELISA, se observó que con ambos test diagnósticos los animales seropositivos pero no excretores presentaban un perfil de IgG muy bajo en comparación con animales excretores en leche, si bien la eficiencia diagnóstica del ELISA específico para IgG era superior a la de la IFI (Lucchese *et al.*, 2015).

A pesar de su buen rendimiento diagnóstico, la IFI presenta algunas desventajas frente a las técnicas ELISA que hacen que su uso esté menos extendido que estas y no suelen emplearse en estudios a gran escala, como son la ausencia de kits comerciales disponibles para su uso en rumiantes, el hecho de que se sea una técnica difícil de automatizar (y, por tanto, poco apta para el procesamiento de un gran número de muestras) y que su interpretación presente un cierto componente de subjetividad, estando por ello sujeta a más variabilidad entre técnicos y siendo menos reproducible entre laboratorios que los test ELISA (OIE, 2016).

#### **2.4.2.3. Test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)**

El método ELISA es la técnica serológica de elección recomendada por la OIE para el diagnóstico y monitorización en rumiantes (OIE, 2016) y constituye sin duda la técnica más empleada actualmente en este campo (van den Brom *et al.*, 2015c) tanto como test de cribado (García-Ispuerto *et al.*, 2014) como para la realización de estudios seroepidemiológicos a gran escala (Astobiza *et al.*, 2012a; Bauer *et al.*, 2016; Hilbert *et al.*, 2012; Kovacova y Kazar, 2000; Lambton *et al.*, 2016; Schimmer *et al.*, 2011; Taurel *et al.*, 2011), sin bien actualmente los ensayos ELISA no están totalmente validados y armonizados (OIE, 2016).

Para llevar a cabo esta técnica, se parte de microplacas cuya base se tapiza con antígeno inactivado de *C. burnetii*, que se obtiene a partir del crecimiento de la bacteria en huevos embrionados o en cultivo celular. Las muestras de suero se añaden a los pocillos de modo que los anticuerpos específicos presentes en las mismas se unen a los antígenos fijados a la placa durante un periodo de incubación, tras el cual se realiza un proceso de lavado y la posterior adición de un anticuerpo anti-rumiante conjugado con una enzima, normalmente con peroxidasa de rábano. Dicho anticuerpo secundario se une a su vez a los anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* previamente unidos al antígeno en el caso de los ensayos de tipo indirecto, o bien se une a los antígenos libres de los pocillos a los que no se han unido los anticuerpos del suero problema en el caso de los ensayos de competición. Tras otro periodo de incubación y posterior lavado se añade el sustrato de la enzima, lo que da lugar a una reacción colorimétrica que se mide mediante espectrofotometría (OIE, 2016).

Las ventajas que presentan los test ELISA son su especificidad, sensibilidad y robustez diagnósticas, junto con su practicidad (OIE, 2016), ya que son técnicas automatizables (Fournier *et al.*, 1998) y por tanto aptas para el procesamiento de un gran número de muestras (Rousset *et al.*, 2007). Además, presentan una adecuada eficiencia en el coste (García-Ispuerto *et al.*, 2014) y su interpretación es objetiva ya que se realiza de acuerdo al empleo de puntos de corte previamente establecidos. Actualmente existen diversos kits comerciales en el mercado aptos para su uso en muestras de rumiantes domésticos y que son empleados tanto para fines diagnósticos como en investigación (Álvarez *et al.*, 2012; Muleme *et al.*, 2016; Rizzo *et al.*, 2016).

Otra ventaja de los métodos ELISA es que pueden ser adaptados para su uso en muestras de leche, lo que es de gran utilidad para la realización de una evaluación inicial del nivel de anticuerpos en muestreos de granjas de producción láctea, ya que la leche constituye un tipo de muestra más fácil de recoger y no es invasiva como la extracción de sangre para obtener el suero. Se ha demostrado la utilidad y validez de estos ELISAs en muestras de leche en bovino (Angen *et al.*, 2011; Guatteo *et al.*, 2007c; Paul *et al.*, 2013; Pimenta *et al.*, 2015; van Engelen *et al.*, 2014b), ovino (Anastacio *et al.*, 2016; Ruiz-Fons *et al.*, 2011; van den Brom *et al.*; 2012a) y caprino (Anastacio *et al.*, 2016; Kampen *et al.*, 2012; van den Brom *et al.*, 2015b).

La mayoría de los test ELISA se han desarrollado para la detección de IgG (tanto IgG1 como IgG2), ya que ofrecen mayor sensibilidad diagnóstica, por lo que actualmente no existe ningún kit comercial para la detección de IgM (Kittelberger *et al.*, 2009; Muleme *et*

*al.*, 2016). Sin embargo, los test ELISA frente a IgM se han utilizado de forma puntual en investigación, gracias a los cuales ha podido observarse que la detección de perfiles serológicos en los que se determinan IgM anti fase II en ausencia de IgG anti fase I es indicativa de una infección temprana en cabras (Roest *et al.*, 2013c). Por ello, el hecho de que mediante los test ELISA solo se detecte IgG tiene la limitación de que en aquellos animales infectados que presentan un patrón serológico predominantemente de IgM (generalmente asociados a las fases agudas de la infección), podrían no detectarse mediante este tipo de test, mientras que sí mostrarían un resultado positivo mediante el empleo de la técnica de la Fijación del Complemento (Emery *et al.*, 2012; Kittelberger *et al.*, 2009), como se ha descrito previamente.

Según el tipo de antígeno empleado para tapizar las placas, los métodos ELISA pueden detectar anticuerpos tanto frente a antígenos de fase I [que pueden detectarse durante periodos de tiempo más largo en animales infectados (van den Brom *et al.*, 2015c)], como frente a antígenos de fase II (Kovacova *et al.*, 1998). De hecho, la mayoría de los ELISA comerciales están preparados con una mezcla de antígenos de ambas fases ya que distintos estudios han puesto de manifiesto que presentan una sensibilidad mayor respecto a aquellos en los que se utilizan únicamente antígenos de fase II (Bottcher *et al.*, 2011; Hatchette *et al.*, 2003a; Kittelberger *et al.*, 2009; Krt, 2003). Sin embargo, la razón de detección de anticuerpos frente a una u otra fase antigénica depende del test (Bottcher *et al.*, 2011; Horigan *et al.*, 2011) y puede verse influido por el sistema de extracción del antígeno (Lang, 1988), así como por el proceso de tapizado de placas, durante el cual podría producirse una competencia por los dos tipos de antígenos para adherirse a las mismas, lo que podría limitar la detección de anticuerpos frente a la fase II, principalmente (Bottcher *et al.*, 2011).

Sin embargo, el empleo de métodos ELISA específicos de cada fase antigénica en estudios de investigación ha permitido observar que un predominio de anticuerpos frente a antígenos de fase II pero no frente a fase I refleja un estado de infección aguda en el rebaño (Bottcher *et al.*, 2011; Roest *et al.*, 2013c; Sting *et al.*, 2013b). Por otro lado, también se ha observado que aquellos bovinos con un patrón serológico altamente positivo tanto en los test ELISA basados en antígenos de fase I como de fase II, suelen ser animales con un patrón de excreción crónica de *C. burnetii*, mientras que los animales excretores ocasionales presentan una respuesta más intensa frente a los test ELISA de fase I respecto a los de fase II (Lucchese *et al.*, 2015). La realización de más estudios en esta línea podría permitir desarrollar técnicas serológicas que permitan la detección de

animales excretores persistentes o de alto riesgo de infección que podrían ser de gran utilidad en el control de la fiebre Q en rumiantes domésticos.

Algunos autores han señalado que el origen de la cepa empleada para la producción del antígeno utilizado en los test ELISA puede influir en la sensibilidad diagnóstica en rumiantes (Berri *et al.*, 2003b; Horigan *et al.*, 2011; Kovacova *et al.*, 1998; Rousset *et al.*, 2007), sugiriendo que los test en los que se emplea una cepa procedente de rumiantes (por ejemplo, la CbO1) podrían ser más sensibles que los que emplean la cepa de referencia *Nine Mile* originalmente obtenida a partir de una garrapata (Rodolakis, 2006). Sin embargo, otros autores no han observado diferencias significativas de sensibilidad dependiendo del antígeno usado (Emery *et al.*, 2014) por lo que actualmente no existe un consenso a este respecto (Guatteo *et al.*, 2010; Porter *et al.*, 2011).

Aunque los ELISA son métodos que ofrecen resultados cualitativos, en algunos estudios estos se han adaptado para obtener resultados cuantitativos, permitiendo determinar el nivel de anticuerpos presentes en la muestra (Bottcher *et al.*, 2011; Sting *et al.*, 2013b).

Como se ha citado previamente, diversos estudios han demostrado que los test ELISA y la Fijación del Complemento presentan una elevada especificidad. Sin embargo, los test ELISA presentan la ventaja de ofrecer resultados sensibilidad claramente superiores a los de la Fijación del Complemento y similares a los de la inmunofluorescencia indirecta (Kittelberger *et al.*, 2009; Muleme *et al.*, 2016; Natale *et al.*, 2012; Niemczuk *et al.*, 2014; Rousset *et al.*, 2009a; Rousset *et al.*, 2007; Ruiz-Fons *et al.*, 2010).

En la siguiente tabla se recogen los valores de especificidad y sensibilidad diagnóstica de diversos test ELISA descritos en distintos estudios realizados en rumiantes domésticos (Tabla 7):

**Tabla 7.** Valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica de diversos test ELISA evaluados en distintos estudios realizados en rumiantes domésticos.

Referencia	Especie	Muestra	Características del test ELISA	% sensibilidad	% especificidad
(Horigan <i>et al.</i> , 2011)	Ovino	Suero	ELISA indirecto comercial.	32,3	97,1
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de bovino.		
			ELISA indirecto comercial.	88,8	99,1
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de ovino.		

Referencia	Especie	Muestra	Características del test ELISA	% sensibilidad	% especificidad
			ELISA indirecto comercial.		
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	100	99,3
(Jaspers <i>et al.</i> , 1994)	Ovino	Suero	ELISA de competición <i>in house</i> . Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	100	93
			ELISA indirecto comercial.		
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de bovino.	31	91,2
(Horigan <i>et al.</i> , 2011)	Caprino	Suero	ELISA indirecto comercial. Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de ovino.	91,6	98,9
			ELISA indirecto comercial.		
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	93,1	98,9
(Emery <i>et al.</i> , 2014)	Caprino	Suero	ELISA indirecto comercial. Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	97	100
			ELISA indirecto comercial.		
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de ovino.	100	95
(Jaspers <i>et al.</i> , 1994)	Caprino	Suero	ELISA de competición <i>in house</i> . Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	100	96
			ELISA indirecto comercial.		
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de bovino.	51,9	98,9
(Horigan <i>et al.</i> , 2011)	Bovino	Suero	ELISA indirecto comercial. Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de ovino.	82,6	99,5
			ELISA indirecto comercial.		
				100	100



## INTRODUCCIÓN

Referencia	Especie	Muestra	Características del test ELISA	% sensibilidad	% especificidad
			Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).		
(Jaspers <i>et al.</i> , 1994)	Bovino	Suero	ELISA de competición <i>in house</i> . Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	88	-
(Saegerman <i>et al.</i> , 2016)	Bovino	Suero	ELISA indirecto comercial. Información del antígeno no disponible.	83,3	98,8
		Leche	ELISA indirecto comercial. Información del antígeno no disponible.	80,6	97,8
(McCaughey <i>et al.</i> , 2009)		Suero	ELISA indirecto comercial. Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	96,3	96,3
(Paul <i>et al.</i> , 2013)	Bovino	Suero	ELISA indirecto comercial. Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	84	99
		Leche	ELISA indirecto comercial. Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	86	99
(Kittelberger <i>et al.</i> , 2009)	Bovino y caprino	suero	ELISA indirecto comercial. Antígeno obtenido a partir de una cepa de <i>C. burnetii</i> aislada de garrapata (cepa <i>Nine Mile</i> ).	95	100
			ELISA indirecto comercial. Información del antígeno no disponible.	81	99,9
(Vaidya <i>et al.</i> , 2010)	Bovino, caprino, ovino y búfalos	suero	ELISA indirecto comercial. Información del antígeno no disponible.	76,6	98,4

### 2.4.3. Particularidades, utilidad y limitaciones de las técnicas basadas en la detección de anticuerpos en el diagnóstico de la fiebre Q en rumiantes domésticos

Con base en todo lo anterior, el análisis de muestras de suero de un número significativo de animales de los distintos rangos de edad en una explotación mediante alguna de las técnicas serológicas citadas (preferentemente ELISA), es una aproximación adecuada para determinar el nivel de prevalencia frente a *C. burnetii* en una población, así como para determinar el estatus de rebaño. El número de muestras a analizar debe determinarse en función de la prevalencia esperada, así como de la sensibilidad y especificidad de la técnica diagnóstica empleada (OIE, 2016).

En el caso de rebaños de producción láctea, el empleo de muestras de tanque de leche para su análisis en paralelo mediante ELISA y PCR, así como el análisis serológico de, al menos el 10% del rebaño, es una aproximación diagnóstica adecuada, rápida y económica que ofrece información adecuada para determinar el estatus del rebaño (Guatteo *et al.*, 2007a; Rodolakis *et al.*, 2007).

Sin embargo, las diversas técnicas diagnósticas basadas en la detección de anticuerpos presentan una limitación común: son adecuadas para evaluar el estatus de una población, pero no son válidas como única técnica para realizar un diagnóstico individual. Así, no permiten determinar por sí solas si un fallo reproductivo en un animal se ha producido a causa de *C. burnetii*; de hecho, se han descrito casos de animales que tras sufrir un aborto asociado a dicho patógeno muestran resultados negativos en el test ELISA tanto en ganado bovino (Guatteo *et al.*, 2012) como en caprino (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Arricau Bouvery *et al.*, 2003).

Por otra parte, y como ya se ha citado en esta memoria de tesis, las técnicas serológicas disponibles actualmente tampoco permiten determinar por sí solas qué animales presentan riesgo de excretar y por ello de transmitir *C. burnetii* dentro de una explotación infectada, ya que no existe una relación directa entre la excreción de la bacteria y la respuesta serológica bien establecida individualmente (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Si bien en líneas generales aquellos animales infectados que excretan la bacteria por alguna vía suelen ser seropositivos, hay individuos con excreción activa que no se detectan mediante estas técnicas serológicas. Son diversas las teorías que tratan de explicar este fenómeno. Así, este hecho puede asociarse a un retraso en la respuesta inmune tras la infección primaria [ya que entre la infección y la seroconversión pasa

aproximadamente un periodo de dos o tres semanas (Roest *et al.*, 2013c)]. También se ha descrito que en el caso de infecciones crónicas puede producirse una evolución en el estatus de infección del animal, que implica el desarrollo de una respuesta de tipo celular eficiente acompañada de una progresiva disminución de los niveles de anticuerpos (Arricau-Bouvery *et al.*, 2003; Berri *et al.*, 2005a; Berri *et al.*, 2001; Bottcher *et al.*, 2011; Emery *et al.*, 2014; Guatteo *et al.*, 2007b; Lucchese *et al.*, 2015; Rousset *et al.*, 2009a; Rousset *et al.*, 2009b). Además, se ha sugerido que esta ausencia de anticuerpos detectables en animales infectados puede deberse al desarrollo de una inmunotolerancia frente a *C. burnetii* por mecanismos desconocidos que evitan el desarrollo de respuesta inmune (Emery *et al.*, 2014). Finalmente, como se ha citado previamente, hay autores que asocian este tipo de ausencia de resultados positivos a un problema de sensibilidad en los métodos diagnósticos más que a la ausencia de producción de anticuerpos, cuestión asociada al tipo de antígeno usado en dichos test (Rodolakis, 2009).

Por otra parte, como también se ha citado previamente, los resultados positivos obtenidos en las técnicas serológicas no están necesariamente asociados a la excreción de *C. burnetii* por parte del individuo ni tampoco a la producción del aborto (Guatteo *et al.*, 2012), ya que un resultado positivo solo es indicativo de un contacto previo con la bacteria por parte del individuo, que no tiene por qué reflejar un estado de enfermedad en el animal (McQuiston e hijos, 2002), dado que los anticuerpos circulantes pueden ser detectados mucho tiempo después de que la infección se haya resuelto (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010).

Sin embargo, sí se ha observado una fuerte asociación entre la presencia de resultados de serológicos fuertemente positivos tanto por ELISA como mediante inmunofluorescencia indirecta y la aparición de abortos en cabras a nivel de rebaño, así como un mayor porcentaje de seropositividad en animales con abortos respecto a los individuos con partos normales (Rousset *et al.*, 2007). En esta misma línea, en bovino se ha observado que las hembras excretoras persistentes generalmente presentan un patrón serológico altamente positivo de forma persistente en el tiempo (Guatteo *et al.*, 2007a) y también que los animales excretoras con serología positiva presentan una excreción más duradera en el tiempo que los que presentan serología negativa (Courcoul *et al.*, 2010). Asimismo, en bovino se ha observado una correlación entre los mayores niveles de anticuerpos en tanque de leche y los niveles de detección de *C. burnetii* mediante PCR cuantitativa en tanque (Angen *et al.*, 2011; Bottcher *et al.*, 2011; Guatteo *et al.*, 2007b). En esta línea, también cabe citar un estudio donde se observó que los rebaños con seroprevalencias superiores al 30% eran positivos a la detección de *C. burnetii* mediante PCR de tanque de leche con más frecuencia que los que presentaban seroprevalencias

menores (García-Pérez *et al.*, 2009). Por último, en un estudio más actual realizado en bovino se ha mostrado también diferencias significativas en el patrón serológico de animales excretores de *C. burnetii* frente a los no excretores, habiéndose observado que los animales excretores ocasionales presentan resultados cuantitativos en el ELISA de fase I frente a IgG significativamente más altos que frente a antígenos de fase II (Lucchese *et al.*, 2015). En cambio, los individuos excretores persistentes presentan un nivel de anticuerpos equivalente frente a ambos antígenos de *C. burnetii*. Asimismo, en un estudio llevado a cabo en cabras se observó que un predominio de anticuerpos frente a antígenos de fase II en los diez días previos al parto era claramente indicativo de la excreción de grandes cantidades de bacteria durante el parto (Sting *et al.*, 2013b). Sin embargo, estos patrones serológicos descritos son reconocibles únicamente a nivel de grupo, por lo que son necesarios más estudios que permitan llevar a cabo una clasificación individual de los animales, ya que determinar patrones serológicos asociados al nivel de excreción puede ser una herramienta de gran utilidad de cara a la aplicación de estrategias de control en granja, que permitan identificar y eliminar los animales excretores persistentes (Lucchese *et al.*, 2015). De hecho, la carencia hasta la fecha de un test serológico que permita identificar animales que presenten alto riesgo de transmisión en una explotación infectada es una importante limitación en el control de la fiebre Q en rumiantes domésticos (Hogerwerf *et al.*, 2014).

#### **2.4.4. Diagnóstico de fiebre Q en el rebaño**

El correcto diagnóstico de fiebre Q en una explotación con clínica sospechosa ha de basarse en el empleo de protocolos que incluyan tanto pruebas de detección directa como indirecta (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010), preferiblemente ELISA para detección de anticuerpos y PCR para la detección de *C. burnetii* (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Niemczuk *et al.*, 2014), ya que la correlación entre ambos tipos de técnicas es limitada (Natale *et al.*, 2012). De hecho, en un estudio publicado recientemente llevado a cabo en rebaños de cabras se observó que la concordancia entre la detección de anticuerpos en sangre y la detección de *C. burnetii* en muestras de leche mediante PCR presentaba una concordancia pobre tanto individualmente como en rebaño (Bauer *et al.*, 2016). Así, se recomienda tomar muestras de material del aborto y/o de hisopo vaginal de entre dos y seis animales el día del fallo reproductivo (o en un plazo máximo de ocho días tras el mismo) (OIE, 2016) con el fin de reducir el número de resultados negativos en la PCR de animales infectados. Además, también deben analizarse un número mínimo de seis muestras de suero en el caso de ovejas y cabras y diez muestras en el caso del bovino, que serán recogidas preferentemente en animales que hayan abortado (OIE, 2016) y

tomadas preferiblemente antes de los 15 días tras el acontecimiento reproductivo, especialmente si los resultados de PCR en la explotación son negativos (Roest *et al.*, 2013b; Sidi-Boumedine *et al.*, 2010).

En España, en la comunidad autónoma de Cataluña y de acuerdo al Procedimiento ante una comunicación de fiebre Q en una explotación ganadera y/o comunicación de un caso en humanos (*Generalitat*, 2015), una explotación se considera positiva a fiebre Q ante un resultado de PCR positivo en muestras de heces, leche, hisopos vaginales o restos de aborto de los animales individuales. En caso de la descripción de uno o más casos de fiebre Q humana relacionada epidemiológicamente con la explotación positiva, es obligatoria la realización de una toma de muestras por parte de los servicios veterinarios oficiales en diez hembras que acaben de abortar o parir (si es posible) para su análisis mediante PCR. Las muestras que deben tomarse son dos hisopos vaginales por animal, preferentemente del día del parto/aborto o dentro de los ocho días posteriores, una muestra de heces por animal y una muestra de leche por animal, así como una muestra de tanque de leche siempre que sea posible.

Por otro lado, la mejor aproximación diagnóstica para determinar si *C. burnetii* ha sido el agente etiológico causante de un fallo reproductivo en un animal, tanto en casos de abortos como de nacidos muertos, consiste en la realización de una observación histológica de las placentas para determinar la presencia de lesiones asociadas a la colonización de la bacteria, seguida de un análisis mediante inmunohistoquímica o PCR para determinar la presencia de *C. burnetii* (OIE, 2016). Se recomienda el análisis de tres cotiledones en las pruebas histológicas ya que la colonización de *C. burnetii* puede ser heterogénea (Muskens *et al.*, 2011a). En caso de no disponer de placentas, es aconsejable el análisis de órganos fetales (bazo, pulmón, hígado, contenido abomasal) (Muskens *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados negativos en estos pueden ser cuestionables, ya que la colonización de los distintos órganos aumenta a la vez que avanza la infección en el hospedador, por lo que un resultado negativo en un órgano no implica que *C. burnetii* no pueda estar presente en otros. Además, ha de tenerse en cuenta que, en ocasiones, el aborto se puede producir sin que tenga lugar la colonización del feto (OIE, 2016). Así, la detección de la bacteria junto con la presencia de lesiones, se considera la aproximación *gold standard* para el diagnóstico de los abortos por *C. burnetii* (Agerholm, 2013).

Esta aproximación implica el empleo de pruebas histológicas para valorar la presencia de lesiones propias de *C. burnetii* y se justifica por el hecho de que la detección del patógeno

en un aborto por sí misma no implica necesariamente que esta sea la causa del mismo, ya que este puede estar producido por otro agente infeccioso u otra causa diferente, por lo que han de valorarse otros posibles patógenos abortivos que estén produciendo una coinfección en el animal (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002; Hazlett *et al.*, 2013; Kreizinger *et al.*, 2015). Por ello, también es conveniente que los protocolos de PCR incluyan no solo la detección de *C. burnetii*, sino también la cuantificación del nivel de bacteria siempre que sea posible. De hecho, existe una buena correlación entre la mayor gravedad de las lesiones en la placenta observadas mediante técnicas histopatológicas y la cantidad de bacteria detectada mediante PCR (Hazlett *et al.*, 2013), si bien ha de tenerse en cuenta que puede tener lugar una gran colonización de la placenta sin que tenga lugar el aborto (Welsh *et al.*, 1951). Así, aunque se considera que la sensibilidad de las PCRs es mayor cuando utilizan como diana un gen de copia múltiple como el caso del IS1111, que presenta un número variable de repeticiones dependiendo de la cepa (Klee *et al.*, 2006b), para la realización de protocolos de cuantificación se recomienda el empleo de genes de copia única, como el *icd*, ya que ofrecen un resultado más preciso en términos cuantitativos (Hazlett *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2011). En cualquier caso, cuando los resultados individuales sean difíciles de interpretar, ha de tenerse en cuenta el estatus del rebaño (OIE, 2016).

Por otro lado, a la hora de detectar animales excretores en una explotación, aspecto fundamental para el control de la enfermedad en el rebaño, con el fin de maximizar la detección de los mismos se recomienda analizar a la vez muestras de leche, hisopos vaginales y heces y realizar más de un muestreo tanto serológico como de muestras para análisis mediante PCR (Niemczuk *et al.*, 2014; Rodolakis, 2009; Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Esta aproximación diagnóstica se justifica por el hecho de que la excreción de *C. burnetii* puede tener lugar por diferentes vías y con carácter intermitente (Guatteo *et al.*, 2010).

## **2.5. PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA FIEBRE Q EN RUMIANTES DOMÉSTICOS**

La fiebre Q está incluida en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria de a OIE (OIE, 2017) y su notificación es obligatoria en un gran número de países. En Europa, actualmente su declaración es obligatoria en quince estados miembros de la Unión Europea (Bulgaria, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Italia, Letonia, Lituania, Holanda, Polonia, Eslovenia, España y Suecia), así como en Islandia y Suiza (EFSA y ECDC, 2015a). Sin embargo, esta enfermedad no está

sometida a programas de control y vigilancia oficiales en la mayoría de los países. Por el contrario, en el caso de Holanda, desde el año 2009 y a raíz del brote de fiebre Q en personas se lleva a cabo programa de vacunación de todos los rebaños de pequeños rumiantes con un censo superior a 50 individuos, así como el análisis periódico de muestras de tanque de leche por PCR (van den Brom *et al.*, 2015b). Del mismo modo, en Bélgica, país enzoótico de fiebre Q en rumiantes domésticos, también se lleva a cabo un programa de vacunación obligatorio desde 2011 en granjas de pequeños rumiantes de producción láctea (Boarbi *et al.*, 2014). En el caso de España, si bien no existe actualmente ningún programa de vigilancia, en Cataluña se dispone de un procedimiento ante una comunicación de fiebre Q en una explotación ganadera y/o comunicación de un caso en humanos (*Generalitat*, 2015), en el que se indican las directrices a seguir ante la detección de una explotación positiva en lo que respecta a las medidas de vigilancia y control.

### 2.5.1. Prevención en explotaciones negativas

En aquellos países o regiones en las que no se aplique ningún plan de vigilancia oficial, para determinar el estatus negativo en una explotación pueden llevarse a cabo controles serológicos periódicos de un porcentaje representativo de la explotación (OIE, 2016), tal como se ha indicado en la sección 2. 4. 4. En el caso de rebaños de producción láctea, el empleo de muestras de tanque de leche para su análisis mediante ELISA y/o PCR así como el análisis serológico de una proporción del rebaño es un planteamiento diagnóstico rápido y económico que ofrece información adecuada para determinar el estatus del rebaño (Guatteo *et al.*, 2007a; Rodolakis *et al.*, 2007).

Por otro lado, como también se ha indicado previamente, es fundamental que ante la presencia de fallos reproductivos tales como abortos, nacidos muertos, infertilidad, placentitis o endometritis, se determine la causa de los mismos, incluyendo la fiebre Q en el diagnóstico diferencial (EFSA, 2010) mediante el empleo de algunas de las pruebas diagnósticas descritas en la sección 2. 4.

Para evitar la entrada de *C. burnetii* en explotaciones negativas es fundamental el empleo de medidas de bioseguridad adecuadas. En la mayoría de los casos, estas medidas son comunes para el control de distintas enfermedades infecciosas de los rumiantes, si bien ha de tenerse en cuenta que la transmisión aerógena de la bacteria y su supervivencia ambiental pueden limitar la eficacia de las mismas (Nusinovici *et al.*, 2015b). Así, es necesario llevar a cabo el control del contacto de animales sanos con otros animales que puedan estar infectados, por lo que deber realizarse un diagnóstico de fiebre Q, al menos

mediante técnicas serológicas, en todos los animales que se vayan a incorporar a la explotación durante el periodo de cuarentena (EFSA, 2010). También debe limitarse el contacto con animales de otros rebaños (así como con fauna silvestre) siempre que sea posible y el sistema de explotación lo permita, mediante sistemas de vallado adecuados, evitando realizar intercambios irregulares de animales como es el caso del uso de machos comunales (Meadows *et al.*, 2015b; Schiller, Oesch *et al.* 2010). Los protocolos de bioseguridad también deben ir dirigidos al control de vectores (incluyendo garrapatas, por su papel como reservorios de la enfermedad), así como a evitar la presencia de animales de compañía, que pueden contribuir a introducir y diseminar la bacteria en la explotación, aunque el papel en la epidemiología de la enfermedad de las mascotas no se conoce con exactitud, por lo que la eficacia de esta medida es desconocida (EFSA, 2010). Finalmente, la aplicación de correctos planes de limpieza y desinfección de las instalaciones es otro aspecto fundamental para evitar la acumulación de *C. burnetii* en el ambiente. Estas medidas, junto con otras estrategias adicionales, deben aplicarse también en explotaciones positivas para contribuir al control del brote.

## **2.5.2. Medidas ante la presencia de infección**

### **2.5.2.1. Medidas generales**

Ante un brote de fiebre Q en rumiantes domésticos, ha de tenerse en cuenta que las distintas medidas para el control de la enfermedad deben emplearse de manera conjunta para garantizar la máxima eficacia de los programas de control (van Asseldonk *et al.*, 2013) ya que ninguna es totalmente efectiva por sí misma para evitar la transmisión dentro del rebaño, entre rebaños y a humanos (EFSA, 2010). Estas medidas están dirigidas a reducir la posibilidad de infección en la población susceptible, así como la infectividad de los individuos infectados en relación al grado de excreción, reducir los contactos entre individuos susceptibles y reducir la carga ambiental de *C. burnetii* (EFSA, 2010). Ha de tenerse en cuenta que la eficacia de dichas medidas dependerá de distintos factores como la prevalencia de infección, las particularidades de la producción de la zona y la epidemiología de la enfermedad en la región.

Una de las medidas de control fundamentales en explotaciones positivas o sospechosas a fiebre Q es la retirada de todo material contaminado con *C. burnetii*. Esto incluye los restos de partos y abortos, principalmente placentas y fetos (Baboudieri, 1959). Además, deben ser adecuadamente destruidos para garantizar la eliminación de su capacidad infectiva, preferiblemente mediante su incineración o enterrándolos con cal viva (Oyston y Davies, 2011). Por otro lado, es fundamental el manejo del estiércol, donde también se



acumulan altas cantidades de bacteria excretadas en las heces, la orina y la contaminación resultante de los partos y abortos de animales infectados. La retirada frecuente del estiércol de las instalaciones de los animales es fundamental, y también debe evitarse su acumulación al aire libre en las explotaciones en grandes cantidades, ya que esto favorece la dispersión de *C. burnetii* si no se somete a un tratamiento que elimine o, al menos, reduzca la carga de la bacteria en el mismo. Así, el estiércol puede ser tratado químicamente con cal viva o cianamida cálcica al 0,4% (Arricau-Bouvery *et al.*, 2001; Baboudieri, 1959) o bien mediante un tratamiento térmico de compostaje. La temperatura que se alcanza durante el compostaje es variable dependiendo de diversos factores como la humedad, la presencia de condiciones aerobias y la duración del tratamiento. El compostaje tradicional suele llevar tres meses (en el que se estima que se alcanza una temperatura mínima de 50°C, que reduciría la carga bacteriana en el orden de  $4,3 \times 10^{-7}$  bacterias), si bien en el caso de *C. burnetii* (debido a su capacidad de resistencia) se recomienda que siempre que sea posible la duración del tratamiento de compostaje sea de entre seis y nueve meses y sea realizado bajo una cobertura plástica (EFSA, 2010; Ganter, 2015) para garantizar una mayor reducción de la carga bacteriana. Asimismo, para evitar la dispersión de la bacteria, como ya se ha citado en la sección 2. 1. 1. 3, se recomienda no emplear el estiércol de explotaciones infectadas como abono ni realizar la distribución del mismo en los campos cuando el tiempo es ventoso (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Por la misma razón, cuando se realice el traslado de estiércol en vehículos éste deberá ir completamente tapado (Roest *et al.*, 2011b). En Cataluña, el Procedimiento ante una comunicación de fiebre Q en una explotación ganadera y/o comunicación de un caso en humanos (Generalitat, 2015) indica que, respecto a las heces de las explotaciones infectadas, se deberá asegurar la desinfección de las mismas, apilándolas un mínimo de 90 días y cubriéndolas con cal viva.

En relación a las medidas de manejo de la reproducción, para evitar la transmisión intra-rebaño se recomienda que los partos tengan lugar en áreas concretas de la explotación para limitar la dispersión de la bacteria, realizando una correcta desinfección de la zona de acuerdo a la información disponible respecto a la susceptibilidad de *C. burnetii* a los distintos productos desinfectantes (sección 2. 1. 1. 3). En Cataluña, el Procedimiento citado anteriormente indica que, siempre que sea posible, los animales se deberán aislar en naves separadas o al menos en corrales diferenciados una semana antes de la fecha prevista del parto, y se mantendrá el aislamiento hasta 15 días post parto. En cualquier caso, ha de tenerse en cuenta que las zonas de partos deben tener una ventilación adecuada ya que si esta es insuficiente se favorece la concentración ambiental de la

bacteria, habiéndose identificado como factor de riesgo para el incremento de la prevalencia intra-rebaño (sección 2. 2. 4. 2).

Otro tipo de medidas que se pueden emplear para controlar un brote de fiebre Q son aquellas en relación al manejo de los animales infectados. Una posibilidad consiste en llevar a cabo la identificación de animales excretores y el sacrificio de los mismos para reducir la prevalencia general del rebaño y la liberación de la bacteria al mismo. Con el fin de maximizar la detección de individuos excretores se recomienda analizar a la vez muestras de leche, hisopos vaginales y heces y realizar más de un muestreo tanto serológico como de muestras para análisis mediante PCR (Niemczuk *et al.*, 2014; Rodolakis, 2009; Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Este protocolo se justifica por el hecho de que la excreción de *C. burnetii* puede tener lugar por diferentes vías y con carácter intermitente (Guatteo *et al.*, 2010). Sin embargo, hay que tener en cuenta que con las herramientas diagnósticas disponibles hasta la fecha resulta difícil la identificación de los animales que presentan una mayor capacidad de excreción de *C. burnetii* y, por tanto, de dispersión en el ambiente y contagio de otros individuos en una explotación (Hogerwerf *et al.*, 2014). Así, un estudio reciente sobre la eficacia de diferentes métodos de control empleando un modelo de transmisión en cabras, puso de manifiesto que el empleo de la PCR en leche y sacrificio de los individuos positivos era una medida poco eficaz a la hora de erradicar un brote de fiebre Q (Bontje *et al.*, 2016).

Otra medida para el control de la fiebre Q es la monitorización de movimientos animales entre granjas con diferente estatus sanitario con el fin de evitar la entrada de animales infectados en explotaciones negativas, e incluso la prohibición de movimientos de animales en las zonas de riesgo. Por ello, ante la presencia de un brote es fundamental un adecuado establecimiento del estatus sanitario de las explotaciones (EFSA, 2010). En Cataluña, según el procedimiento antes citado los movimientos de salida en explotaciones infectadas sólo se pueden realizar con destino a engorde o a matadero, y deberán ir acompañados de un certificado sanitario de movimiento en el que se haga constar que en explotación de origen se ha detectado fiebre Q. Como excepción se podrán mover animales con destino a reproducción si se han analizado individualmente mediante ELISA o PCR, mostrando un resultado negativo en el plazo de 15 días antes de la salida de la explotación, periodo durante el cual se habrán mantenido aislados del resto de animales.

En casos de brotes importantes de fiebre Q en rumiantes domésticos donde exista un riesgo considerable para la salud humana, las autoridades sanitarias pueden determinar el empleo de medidas de control más drásticas, como prohibir la reproducción o incluso

llevar a cabo el sacrificio de todos los animales gestantes de una explotación mientras se llevan a cabo otras labores de control, como se hizo en el brote de Holanda (Hogerwerf *et al.*, 2014; Hogerwerf *et al.*, 2011; Roest *et al.*, 2011b). Sin embargo, Bontje y colaboradores (Bontje *et al.*, 2016) han puesto de manifiesto en un estudio reciente que el sacrificio de animales preñados en una explotación infectada no impide por completo la transmisión de *C. burnetii* y la enfermedad no puede ser erradicada únicamente con esta medida. Asimismo, Van Asseldonk y colaboradores determinaron que estas dos estrategias fueron ineficientes desde un punto de vista de coste-beneficio para el control del brote de Holanda (van Asseldonk *et al.*, 2015).

Por otro lado, el personal que trabaja en granjas positivas o sospechosas debe emplear medidas de bioseguridad para evitar el contagio, especialmente en áreas de alto riesgo de concentración de *C. burnetii* como las zonas de partos, así como al realizar labores de limpieza y de manejo del estiércol y durante las labores de esquileo (Hellenbrand *et al.*, 2001a; Schulz, 2005). Estas medidas incluyen el empleo de ropa y calzado específico, preferiblemente desechable (en caso de no serlo se procederá a su desinfección tras su utilización), el empleo de mascarilla adecuada para evitar el contagio por *C. burnetii* y en el caso de manejo de los partos y restos de los mismos, uso de guantes y gafas de seguridad. Asimismo, durante el esquileo la lana debe ser humedecida para limitar la producción de aerosoles, o incluso desinfectada (EFSA, 2010). En explotaciones incluidas en zonas de riesgo debe restringirse el acceso de personas ajenas a las granjas, especialmente a las zonas de partos, tanto para evitar el contagio de personas en explotaciones positivas (especialmente si se trata de individuos incluidos en grupos de riesgo como embarazadas o personas con patologías cardiovasculares), como para evitar la introducción de la infección en explotaciones negativas a través de vehículos, calzado y otros fómites. En el caso de Cataluña, el procedimiento anteriormente citado indica que el titular de las explotaciones positivas es el responsable de informar a los transportistas de leche y ganado que accedan a la misma sobre las medidas de bioseguridad que deben tomar al acceder a la explotación y proporcionar, como mínimo, ropa y botas de uso exclusivo en la explotación, así como mascarillas.

En explotaciones de aptitud láctea, la leche producida ha de someterse a un tratamiento térmico de pasteurización antes de su consumo para evitar la transmisión al hombre por esta vía (EFSA, 2010).

Muchas de las medidas de control descritas son, en realidad, buenas prácticas que deben tenerse en explotaciones negativas y que pueden ayudar a prevenir la aparición de futuros

brotos (EFSA, 2010). Por otro lado, las distintas medidas de control mencionadas, tales como, por ejemplo, restricciones de movimientos, sacrificio de animales positivos y aplicación de planes de limpieza y desinfección, son comunes al control de otras enfermedades, e incluso se ha descrito cómo la aplicación de las mismas en programas de control de otras patologías ha dado lugar a un descenso de la prevalencia de fiebre Q en determinadas regiones, como ocurrió con el control de la viruela caprina en Taiwan en 2008 (Lai *et al.*, 2015).

### **2.5.2.2. Medidas específicas**

#### **2.5.2.1.1. Tratamiento antibiótico**

La susceptibilidad de *C. burnetii* a los tratamientos antibióticos está condicionada por la naturaleza intracelular de la bacteria, lo que limita su eficacia en animales infectados (van den Brom *et al.*, 2015c).

La terapia antibiótica en rumiantes domésticos se ha empleado como medida de control en explotaciones infectadas por *C. burnetii* principalmente con dos fines; por un lado, limitar la tasa de abortos para restringir las pérdidas económicas y, por otra parte, reducir el nivel de excreción de la bacteria para evitar su dispersión en el medio ambiente y contagio de animales sanos (Berri *et al.*, 2002). Las pautas terapéuticas utilizadas en rumiantes se han basado en la aplicación de tetraciclinas, principalmente oxitetraciclina. Los protocolos más frecuentemente empleados consisten en dos aplicaciones de oxitetraciclina a una dosis de 20 miligramos por kilogramo de peso vivo en el último mes de gestación, generalmente entre los días 100 y 120 (Angelakis y Raoult, 2010; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Astobiza *et al.*, 2009; Astobiza *et al.*, 2013; Berri *et al.*, 2002). La vía de aplicación empleada normalmente es la intramuscular, dado que el empleo de dosis terapéuticas de tetraciclinas por vía oral presenta peor absorción, además de afectar negativamente a la microbiota del individuo (Behymer *et al.*, 1977).

Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en medicina humana donde la eficacia de la terapia antibiótica está plenamente contrastada (Chauhan *et al.*, 2014), en el caso de los rumiantes domésticos la validez de este tipo de tratamientos no ha podido ser totalmente demostrada hasta la fecha y los distintos estudios realizados al respecto muestran resultados dispares y poco concluyentes. De hecho, la EFSA, en su opinión científica sobre fiebre Q en rumiantes domésticos publicada en 2010 (EFSA, 2010), desaconsejaba su empleo basándose en la ausencia de pruebas suficientes que demostraran su eficacia y, por ello, justificasen su aplicación, aludiendo a la importancia del uso responsable de

antibióticos tanto en medicina humana como veterinaria para limitar desarrollo de resistencias (Avorn *et al.*, 2001).

Del mismo modo, en un estudio donde se recogían los resultados de la terapia antibiótica empleada en cabras para limitar la producción de abortos durante el brote de fiebre Q en Holanda, no pudo demostrarse que dicho tratamiento redujese la tasa de fallos reproductivos en esta especie (Wouda y Dercksen, 2007). En esta misma especie tampoco se ha observado la reducción en el grado de excreción ni en la duración de la misma (Blain, 2007 revisado por EFSA, 2010). De igual modo, en dos estudios diferentes (Astobiza *et al.*, 2009; Astobiza *et al.*, 2013) llevados a cabo en explotaciones ovinas infectadas no se observó que el tratamiento antibiótico con oxitetraciclina intramuscular tuviera una influencia en la reducción del número de animales excretores, la cantidad de bacteria excretada ni la duración de la excreción en el tiempo en hembras gestantes en las que se aplicó el tratamiento. Asimismo, tampoco se observó un efecto residual beneficioso del tratamiento en la siguiente paridera de los animales tratados. En el caso del ganado bovino, un estudio realizado en los años 50 puso de manifiesto la ineficacia del tratamiento de clortetraciclina en su aplicación por vía intravenosa o intramamaria en la eliminación de la infección (Luoto *et al.*, 1951). Asimismo, en un estudio actual (Taurel *et al.*, 2014) tampoco se observó un efecto beneficioso de la oxitetraciclina intramuscular en relación a la excreción en leche ni mediante el empleo del tratamiento antibiótico como medida única ni en combinación con la vacunación.

Sin embargo, en ciertos estudios sí se han podido observar algunos efectos beneficiosos del tratamiento antibiótico en rumiantes domésticos para controlar la infección de forma única o en conjunto con protocolos de vacunación. Así, Astobiza y colaboradores observaron una reducción en la tasa de abortos en explotaciones ovinas infectadas tras la instauración del tratamiento antibiótico (Astobiza *et al.*, 2013). También en ovino, otros autores, aunque no observaron una reducción en la excreción ni en los abortos en un brote de fiebre Q en ganado ovino, concluyeron que el tratamiento antibiótico podría haber tenido un efecto positivo a largo plazo en la prevención de la transmisión de ovejas a corderas no infectadas (Berri *et al.*, 2005a). Asimismo, en un estudio realizado sobre un rebaño ovino infectado basado en un protocolo conjunto de vacunación y antibióticos, pudo observarse una disminución en la excreción (Eibach *et al.*, 2013). En bovino, un estudio de los años 70 puso de manifiesto la eficacia del empleo de clortetraciclina vía oral en la reducción de la excreción de la bacteria, si bien no conseguía eliminar por completo la infección (Behymer *et al.*, 1977). En un estudio más reciente realizado en 22 rebaños bovinos se observó que el tratamiento con oxitetraciclina en una aplicación intramuscular

durante el secado reducía significativamente el riesgo de excreción vaginal en el parto, y que la combinación de la vacunación junto con el tratamiento antibiótico se asociaba a una disminución en la excreción por parte de vacas de leche (Taurel *et al.*, 2012a). De hecho, actualmente se contempla el uso del tratamiento antibiótico como medida de control en rebaños bovinos infectados que por sus características en cuanto al manejo de los partos presenten una alta probabilidad de excreción (Guatteo y Beaudeau, 2016).

En cualquier caso, es conveniente la realización de más trabajos para tratar de mejorar la eficacia de las pautas antibióticas disponibles actualmente dado que estas pueden ser de utilidad en determinados escenarios, como en casos de brotes epidémicos con objeto de reducir de las pérdidas económicas asociadas a los fallos reproductivos. En este sentido puede ser interesante el estudio de protocolos combinados basados en el empleo de doxiciclina e hidroxiclороquinona, tratamiento que ha mostrado su efectividad en humanos (Angelakis y Raoult, 2010; Astobiza *et al.*, 2013).

En cualquier caso, ha de tenerse en cuenta que la aplicación de cualquier pauta antibiótica ha de plantearse respetando los periodos de supresión para evitar la aparición de residuos tanto en carne como en leche (Astobiza *et al.*, 2013).

#### **2.5.2.1.2. Vacunación**

La vacunación ha demostrado ser una medida eficaz para el control de la fiebre Q en rumiantes domésticos, ya que contribuye a prevenir el aborto y reducir la excreción de animales infectados en leche, heces y por vía vaginal (Bontje *et al.*, 2016; Roest *et al.*, 2013b; van den Brom *et al.*, 2015c). De hecho, actualmente se considera la medida más efectiva para la reducción de la excreción por parte de los animales infectados y en consecuencia la disminución de la contaminación ambiental en explotaciones positivas (EFSA, 2010). Así, en un reciente estudio publicado en relación a los resultados obtenidos mediante el empleo de las medidas de control aplicadas en el brote de fiebre Q en ganado caprino en Holanda, los autores concluyeron que la vacunación es la única estrategia capaz de prevenir y controlar brotes de fiebre Q en granjas de cabras de leche (Bontje *et al.*, 2016). También en el contexto del citado brote, se determinó que la estrategia de vacunación en granjas infectadas era la medida más adecuada en términos de coste-beneficio (van Asseldonk *et al.*, 2015). Por todo ello la OIE recomienda su empleo como estrategia de control en zonas de alto riesgo (OIE, 2016).

El tipo de antígeno de *C. burnetii* a partir del cual se preparan las vacunas es un aspecto fundamental que determina su eficacia. Así, las vacunas compuestas por antígeno de fase

l han demostrado ser eficaces desde los primeros estudios realizados (Behymer *et al.*, 1976; Biberstein *et al.*, 1977; Brooks *et al.*, 1986; Sadecky y Brezina, 1977; Sadecky *et al.*, 1975), al contrario que las producidas a partir de *C. burnetii* en fase II, que no son útiles para el control de esta enfermedad (EFSA, 2010; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Fishbein y Raoult, 1992; O'Neill *et al.*, 2014; Souriau *et al.*, 2003).

Aunque la aplicación de protocolos de vacunación no evita que los animales se infecten por *C. burnetii*, especialmente en condiciones de alta presión de infección (de Cremoux *et al.*, 2012b), diferentes estudios han puesto de manifiesto la eficacia de la vacunación en rebaños naturalmente infectados con brotes clínicos respecto a la reducción de la tasa de abortos, del número de animales excretores, así como del nivel de excreción por distintas vías, llegándose incluso a la eliminación de la infección tanto en ganado ovino (Astobiza *et al.*, 2013; Astobiza *et al.*, 2011a, b; Eibach *et al.*, 2013) como caprino (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Boarbi *et al.*, 2014; Hogerwerf *et al.*, 2011; O'Neill *et al.*, 2014; Sting *et al.*, 2013a; Rodolakis, 2010; Souriau *et al.*, 2003 revisado por EFSA, 2010). Sin embargo, cabe citar que en un estudio de meta-análisis recientemente publicado, los autores determinaron que la aplicación de vacunas de fase I en ovejas no disminuía ni el riesgo ni los niveles de excreción de acuerdo a los datos bibliográficos incluidos en el mismo, si bien ha de tenerse en cuenta que en el citado estudio se incluyeron únicamente tres trabajos, siendo uno de ellos antiguo (O'Neill *et al.*, 2014).

También en ganado bovino de aptitud láctea se ha observado el efecto positivo de la vacunación en la reducción de la excreción de *C. burnetii* en leche, fluidos vaginales y heces (Biberstein *et al.*, 1977; Guatteo *et al.*, 2008; Piñero *et al.*, 2014a; Taurel *et al.*, 2012a) así como en la reducción de la subfertilidad y la pérdida fetal temprana asociada a la infección por *C. burnetii* (García-Ispuerto *et al.*, 2015; López-Helguera *et al.*, 2013). Asimismo, en un estudio realizado en la década de los 70 se observó la capacidad de la vacunación para evitar el aborto en bovinos infectados experimentalmente (Behymer *et al.*, 1976).

La vacunación puede emplearse de forma preventiva en explotaciones negativas, como por ejemplo en el contexto de un brote de fiebre Q en una determinada región, con el fin de limitar su expansión y las consecuencias derivadas en explotaciones que no han tenido previamente contacto con *C. burnetii*. Asimismo, también puede utilizarse en explotaciones con brotes clínicos para controlar la enfermedad dentro del propio rebaño y evitar su transmisión a explotaciones próximas y al hombre. Sin embargo, la vacunación

preventiva ha demostrado ser más efectiva que si emplea cuando la infección ya ha tenido lugar (EFSA, 2010; Guatteo *et al.*, 2008). Asimismo, la vacunación en rebaños de baja prevalencia (Guatteo *et al.*, 2008) es más eficaz que en rebaños con infección endémica (Astobiza *et al.*, 2010; Astobiza *et al.*, 2011b).

En un contexto clínico, los protocolos de vacunación suelen basarse en la aplicación de la vacuna a los animales de reposición y a los animales jóvenes (normalmente a partir de los tres meses y antes de su primera gestación) y no infectados, junto con revacunaciones periódicas, normalmente anuales. En los individuos jóvenes y seronegativos es donde la vacunación presenta mayor eficacia, ya que son los que presentan mejor respuesta y donde resulta de mayor necesidad ya que son la población de mayor riesgo de excretar grandes cantidades de *C. burnetii* al ambiente en caso de infección (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; de Cremoux *et al.*, 2012b; Hogerwerf *et al.*, 2011; van den Brom *et al.*, 2013b). De hecho, en ciertos estudios se ha puesto de manifiesto que la vacunación puede no ser efectiva para prevenir los abortos ni en la reducción de la excreción cuando se aplica en animales ya infectados, así como en animales gestantes (EFSA, 2010; Biberstein *et al.*, 1977; Guatteo *et al.*, 2008; Roest *et al.*, 2013a; Schmeer *et al.*, 1987). Este hecho podría asociarse a la infección persistente de la glándula mamaria y del útero en individuos previamente infectados, y a un posible efecto adverso de la gestación en el desarrollo de una respuesta inmune vacunal efectiva en el caso de animales gestantes (Guatteo *et al.*, 2008; Rousset *et al.*, 2009b; Stuen y Longbottom, 2011), en los que los cambios hormonales asociados a la gestación limitan la respuesta Th1, lo que da lugar a una disminución de la producción de gamma interferón, molécula esencial para limitar la multiplicación de *C. burnetii* (Tissot-Dupont *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en una explotación ovina con un brote clínico en el que se incluyeron los animales gestantes en el protocolo de vacunación, pudo observarse una reducción en la excreción en los en los mismos, sin observarse efectos adversos (Eibach *et al.*, 2013). Además, en dos estudios realizados recientemente en ganado bovino, se observó que la vacunación aplicada en dos dosis en el último trimestre de gestación reducía la subfertilidad y la pérdida fetal temprana asociada a la infección por *C. burnetii* en vacas de leche de alta producción (García-Ispuerto *et al.*, 2015; López-Helguera *et al.*, 2013).

En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que cuando la vacunación se aplica como medida de control en explotaciones infectadas ha de contemplarse como una medida a medio-largo plazo para conseguir la eliminación de la infección, ya que la alta persistencia de *C. burnetii* en el ambiente favorece la infección de los animales sanos de la explotación, siendo, por tanto, necesarios varios años para eliminar la infección y evitar la reinfección



del rebaño (EFSA, 2010; Roest *et al.*, 2013a). Así con base en los resultados obtenidos en el control del brote de fiebre Q en cabras en Holanda, son necesarios entre dos y siete años de vacunación para erradicar la enfermedad en una explotación de caprino infectada (van Asseldonk *et al.*, 2015). Así, en el caso del ganado bovino se ha descrito que son necesarios cuatro años para eliminar completamente la excreción por leche y por vía vaginal (Camuset y Remmy, 2008 revisado por EFSA, 2010). En esta misma línea, en un estudio realizado por Piñero y colaboradores llevado a cabo en un rebaño de bovino de leche naturalmente infectado en el que se aplicó un programa de vacunación de dos años se puso de manifiesto que, si bien conseguía reducirse el nivel de excreción y el número de animales excretores en ese tiempo, la contaminación ambiental seguía presente en la explotación (Piñero *et al.*, 2014a). En ganado ovino se han observado resultados similares, habiéndose descrito que hasta el segundo año de vacunación en rebaños altamente infectados no se detectaba una reducción clara en los niveles de infección, y que, aunque la infección se eliminaba en la población animal a partir del tercer año de vacunación, *C. burnetii* seguía detectándose en el ambiente (Astobiza *et al.*, 2011b). En la misma línea, en un estudio llevado a cabo durante cuatro años sobre los resultados de la campaña de vacunación en explotaciones caprinas en Bélgica, se observó que el efecto positivo de la vacunación no persistía en explotaciones infectadas ya que en el último muestreo realizado en dicho estudio se producía un nuevo incremento de la excreción de *C. burnetii* en leche (Boarbi *et al.*, 2014). En cualquier caso, un estudio llevado a cabo recientemente en el que se analizaron los resultados obtenidos en el control del brote de Holanda en cabras, puso de manifiesto que la vacunación es una medida adecuada para reducir de una manera rápida los niveles de excreción y que la mejor estrategia para conseguir controlar un brote es realizar una vacunación anual de tipo preventivo en las hembras jóvenes seronegativas en explotaciones en riesgo acompañada de la vacunación reactiva después de una tormenta de abortos o de observar resultados positivos en PCR de tanque de leche (Bontje *et al.*, 2016).

Actualmente, la única vacuna comercial disponible para su empleo en rumiantes domésticos es Coxevac® (CEVA Santé Animale), producida a partir de la cepa *Nine Mile* de fase I completa inactivada con formalina (OIE, 2016; Boarbi *et al.*, 2014), que se administra por vía subcutánea y que, según las especificaciones del producto, contempla la aplicación a animales de más de tres meses con una segunda dosis a las tres semanas y una revacunación anual en el caso del caprino, y cada nueve meses para el ovino. En España, su uso está registrado únicamente para la aplicación en bovino y caprino, si bien puede solicitarse su uso en ganado ovino a las autoridades sanitarias en caso necesario. De hecho, el procedimiento ante una comunicación de fiebre Q en una explotación

ganadera y/o comunicación de un caso en humanos (*Generalitat*, 2015) recomienda la aplicación de la vacunación como medida de control en explotaciones de rumiantes domésticos positivas a fiebre Q. Esta vacuna se emplea actualmente y desde 2010 en Holanda de forma obligatoria en todas las explotaciones de ovino y caprino del país (van den Brom *et al.*, 2015b), donde comenzó a utilizarse desde 2008 a raíz del brote de fiebre Q como medida de control, cuyo principal objetivo durante el brote fue reducir la excreción para limitar la contaminación ambiental y con ello la transmisión al hombre (EFSA, 2010). El empleo de la misma redujo significativamente la prevalencia y el nivel de excreción por parte de los animales (Hogerwerf *et al.*, 2011), contribuyendo significativamente al control del brote, como se ha citado previamente en esta sección (Bontje *et al.*, 2016; van Engelen *et al.*, 2014a). Además, desde el inicio de la vacunación obligatoria en 2010 no se ha diagnosticado ningún aborto por fiebre Q en pequeños rumiantes (van Engelen *et al.*, 2014a), mientras que desde 2006 a dicha fecha, *C. burnetii* era el principal agente productor de abortos en cabras (van den Brom *et al.*, 2012b). Asimismo, en Bélgica, desde el año 2011 la aplicación de un protocolo de vacunación obligatorio empleando Coxevac® en granjas de pequeños rumiantes infectadas por *C. burnetii*, en las que no se diagnosticó ningún aborto también ha demostrado tener un efecto positivo en la reducción de la excreción en leche medida en tanque en explotaciones infectadas, habiéndose observado un descenso de la prevalencia de explotaciones positivas a PCR en tanque de leche del 10% al 2% en cuatro años (Boarbi *et al.*, 2014; O'Neill *et al.*, 2014).

En cuanto a los efectos secundarios asociados a la vacunación, se ha observado que el empleo de la vacuna Coxevac® implica un aumento temporal de la temperatura y una disminución de la producción láctea tras su aplicación, así como la posible aparición de reacciones adversas locales (Schulze *et al.*, 2016; Vellema *et al.*, 2010 revisado por van den Brom *et al.*, 2015b). Además, su aplicación en cabras de leche da lugar a la excreción de ADN vacunal en la misma durante un periodo de hasta nueve días tras la inmunización, aspecto que debe tenerse en cuenta a la hora de realizar labores de vigilancia epidemiológica basadas en la detección molecular de ADN de *C. burnetii* en muestras de tanque de leche (Hermans *et al.*, 2011).

Otra de las limitaciones del tipo de vacunas utilizadas hasta la fecha es que no permiten diferenciar animales vacunados de infectados en las pruebas serológicas (EFSA, 2010). Por otro lado, teniendo en cuenta que *C. burnetii* en fase I es altamente virulenta, el proceso de obtención del antígeno debe llevarse a cabo en instalaciones de nivel III de contención biológica, lo que supone una limitación en su producción (Kadra y Balla, 2006; Roest *et al.*, 2013a). Por todo ello se han llevado a cabo diversos estudios dirigidos al

desarrollo de vacunas de subunidades o de ADN recombinante que solventen dichas limitaciones en la producción (Menzies, 2012), centrados, principalmente, en la evaluación de diferentes proteínas de superficie asociadas al LPS, así como de los adyuvantes más adecuados para generar una correcta inmunogenicidad (Deringer *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2004). Sin embargo, las distintas vacunas candidatas evaluadas hasta la fecha no han mostrado un efecto protector al analizarse en modelos en ratón o en cobaya (Shannon *et al.*, 2009; Tyczka *et al.*, 2005). No obstante, se ha descrito una vacuna recombinante candidata para su evaluación en rumiantes domésticos basada en las proteínas P1 (Vodkin y Williams, 1988), que previamente había demostrado su efecto protector en ratones (Williams *et al.*, 1990), y HspB, previamente identificada como inmunogénica en ratones, ya que la combinación de ambas proteínas mostraba una respuesta humoral y celular superior a su empleo de forma separada así como un grado de protección mayor en cuanto al número de bacterias en el bazo al evaluarse en ratón (Li *et al.*, 2005). También se ha descrito que las células dendríticas derivadas de la médula ósea estimuladas con LPS de fase II inducen protección contra el desafío con *C. burnetii* en ratones (Wei *et al.*, 2011). En cualquier caso, hasta la fecha ninguna de estas posibles vacunas candidatas se ha evaluado para determinar su eficacia en las especies de destino.

En el caso de humanos, Australia es el único país en el que se lleva a cabo la vacunación de determinados grupos de riesgo de contraer fiebre Q, entre ellos veterinarios, estudiantes de veterinaria y trabajadores de matadero (Sellens *et al.*, 2016), así como en personas expuestas a un brote de rumiantes domésticos (Bond *et al.*, 2016). Para ello se emplea una vacuna de fase I inactivada con formalina, Q-Vac® (CSL, Australia), disponible en el país desde 1989 y que ha mostrado una eficacia superior al 98% (Gefenaite *et al.*, 2011). Su principal limitación reside en la necesidad de analizar previamente a los individuos mediante pruebas serológicas y un test cutáneo para garantizar que estos no han tenido contacto con *C. burnetii*, dado que, en caso contrario, pueden desarrollar reacciones adversas de cierta gravedad tras la aplicación de la vacuna, tales como abscesos cutáneos, fiebre, mialgias y cefaleas (Marmion, 2007).

La aplicación de planes de control debe incluir, además, la vigilancia de las explotaciones durante y después de la aplicación de las medidas de control mediante el empleo de pruebas diagnósticas para determinar la evolución del estado sanitario de las mismas respecto a la infección por *C. burnetii* (EFSA, 2010). Así, para el caso del Procedimiento anteriormente citado que aplica en Cataluña, a los seis meses tras la confirmación diagnóstica de una explotación positiva, deberá llevarse a cabo una nueva toma de

muestras por parte de los servicios veterinarios oficiales igual a la descrita para el caso del diagnóstico inicial, consistente en el muestreo de diez hembras que acaben de abortar o parir (si es posible) para su análisis mediante PCR. Las muestras que deben tomarse son dos hisopos vaginales por animal, preferentemente del día del parto/aborto o dentro de los ocho días posteriores, una muestra de heces por animal y una muestra de leche por animal, así como una muestra de tanque de leche siempre que sea posible. En caso de obtenerse resultados positivos, la explotación se monitorizará con periodicidad trimestral hasta la obtención de resultados negativos en las pruebas para poder declararla nuevamente como negativa.

## 2.6. LA FIEBRE Q COMO ZONOSIS

La fiebre Q se considera una zoonosis ocupacional. Aquellas personas que por su trabajo tienen un contacto directo o indirecto con animales o sus productos, especialmente rumiantes domésticos, presentan un mayor riesgo de contraer la enfermedad y los niveles de anticuerpos son más altos en estos colectivos (Chang *et al.*, 2010; van den Brom *et al.*, 2015c). Así, entre las profesiones de riesgo se encuentran los veterinarios (d al Pozzo *et al.*, 2016; Sloan-Gardner *et al.*, 2016) y estudiantes de veterinaria (de Rooij *et al.*, 2012), ganaderos y personal de las explotaciones (Lai *et al.*, 2015; Meadows *et al.*, 2016), pastores (Dolce *et al.*, 2003), trabajadores de mataderos, salas de despique y carniceros (Bell *et al.*, 1997; Esmaeili *et al.*, 2016), transportistas de animales, esquiladores y operarios de fábricas de procesamiento de lana o pieles (Serbezov *et al.*, 1999), cazadores (Gami *et al.*, 2004), tratantes de ganado, productores de pienso para animales domésticos, taxidermistas (Reid y Malone, 2004), personal que trabaja procesando fetos para la industria cosmética (Wade *et al.*, 2006) y, finalmente, personal de laboratorio que trabaja directamente con el agente (Dorko *et al.*, 2012; McQuiston e hijos, 2002; Reid y Malone, 2004) o que maneja rumiantes parturientos como animales de experimentación (Conti *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 1989; Henning *et al.*, 2009; Kovacova y Kazar, 2002; McQuiston e hijos, 2002; Ruppanner *et al.*, 1982). Las ferias de ganado también son una fuente de infección tanto para trabajadores como para visitantes además de para los propios animales (Porten *et al.*, 2006). Cabe mencionar que en el sector militar se han descrito casos y brotes de fiebre Q que, en ocasiones, se han asociado a picaduras de garrapatas, dormir en establos o vivir cerca de zonas de helicópteros en las que los aerosoles producidos por estos podrían facilitar la transmisión de la bacteria (Anderson *et al.*, 2011; Faix *et al.*, 2008; Splino *et al.*, 2003; White *et al.*, 2013). La aparición de casos

en humanos presenta un cierto carácter estacional, que se asocia a los momentos de partos en rumiantes domésticos o a la realización de determinadas prácticas agrícolas de riesgo como la distribución de estiércol en los campos de labor (Dijkstra *et al.*, 2012; Tissot-Dupont *et al.*, 1992).

La fiebre Q en personas puede presentarse de forma esporádica o en brotes epidémicos (Million y Raoult, 2015; van den Brom *et al.*, 2015c), que si bien normalmente han afectado a un máximo de 300 casos agudos/brote a lo largo de la historia, en el brote asociado a cabras que tuvo lugar en el sur de Holanda entre 2007 y 2011 se diagnosticaron más de 4107 casos (Morroy *et al.*, 2016) y de acuerdo a estudios serológicos en la población, se consideró que más de 40 000 personas podrían haberse infectado (Hogema *et al.*, 2012). Este ha sido el mayor brote de fiebre Q humana descrito hasta la fecha, que puso de manifiesto el importante alcance que la fiebre Q puede presentar en salud pública. La tasa de hospitalización fue del 20% (ECDC, 2010; EFSA, 2010) y desde el inicio del brote hasta fecha se han descrito un total de 74 muertes debidas a las distintas complicaciones de la enfermedad (ProMED-mail post, 2016). Algunos otros países en los que han tenido lugar brotes humanos asociados a rumiantes domésticos con un número superior a 50 afectados son Bulgaria (Panaiotov *et al.*, 2009), Croacia (Morovic *et al.*, 2009), Francia (Tissot-Dupont *et al.*, 2007), Alemania (Gilsdorf *et al.*, 2008; Porten *et al.*, 2006), Italia (Santoro *et al.*, 2004), Suiza (Dupuis *et al.*, 1987), Hungría (con un brote activo actualmente) (Gyuranecz *et al.*, 2014), España (Alonso *et al.*, 2015) y Canadá (Hatchette *et al.*, 2001). Otras zonas donde han tenido lugar brotes en los últimos años, aunque con menos de 50 afectados, son Estados Unidos, asociándose a cabras, en Oregón (Anderson *et al.*, 2015), Washington y Montana (Bjork *et al.*, 2014), en Australia, asociándose a pequeños rumiantes (Bond *et al.*, 2016), en Suiza, asociándose a ovejas (Bellini *et al.*, 2014), y en Polonia, asociándose a ganado bovino (Chmielewski y Tylewska-Wierzbanowska, 2013).

La fiebre Q se caracteriza por presentar un gran polimorfismo clínico en personas. Entre un 20 y un 80% de las infecciones primarias son asintomáticas y se caracterizan únicamente por el desarrollo de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* (Million y Raoult, 2015). Así, el porcentaje de casos asintomáticos observado con más frecuencia durante el transcurso de brotes humanos es del 60% (Bamberg *et al.*, 2007; Delgado, 2011; Maurin y Raoult, 1999). El desarrollo o no de sintomatología está asociado a dos aspectos fundamentales: la cepa de *C. burnetii* (D'Amato *et al.*, 2015) y la susceptibilidad del paciente (Eldin y Raoult, 2016). En los casos en los que la infección da lugar a la aparición de sintomatología, con frecuencia ocurre que estos no son adecuadamente

diagnosticados debido a la inespecificidad de los signos clínicos a los que da lugar la infección (de Valk, H. 2012). Todo ello hace que se trate de una enfermedad infradiagnosticada y por lo tanto insuficientemente comunicada (Gidding, H. F. *et al.*, 2009).

La fiebre Q puede cursar de forma aguda o crónica (Anderson *et al.*, 2013), aunque en la actualidad hay autores que consideran que no hay razón para el empleo de esta clasificación, ya que las distintas formas clínicas de la enfermedad descritas están claramente definidas y se ajustan a sus propios criterios diagnósticos (Million y Raoult, 2015). Se considera que solo en torno al 20% de los pacientes infectados requieren atención médica, el 2-3% necesitan hospitalización y la tasa de mortalidad es del 1-2% (Delsing y Kullberg, 2008; Tissot-Dupont y Raoult, 2008). A pesar de la baja mortalidad, es una enfermedad que puede afectar de forma significativa a la calidad de vida de los afectados por su capacidad debilitante y su curso crónico (Schneeberger *et al.*, 2014).

El periodo de incubación para los casos agudos se ha estimado en unos 21 días (Porten *et al.*, 2006). La mayor parte de los casos agudos se caracterizan por presentar síntomas inespecíficos similares a los de una gripe autolimitante y la mayoría de ellos solo llegan a ser diagnosticados de forma retrospectiva o, en caso de brotes, por muestreos sistemáticos en la población (Million y Raoult, 2015). Otras de las manifestaciones más frecuentes de las formas agudas son la neumonía, la trombocitopenia, el incremento de las transaminasas y la hepatitis granulomatosa. También se han descrito casos de meningitis y meningoencefalitis, pericarditis miocarditis, colecistitis, adenitis (Million *et al.*, 2009) y sarpullido (Dijkstra *et al.*, 2012; Tissot-Dupont *et al.*, 1992). Las manifestaciones agudas normalmente se resuelven exitosamente después de una terapia antibiótica adecuada (basada en la aplicación de doxiciclina), pero pueden llegar a requerir hospitalización (OIE, 2016) y, en el caso de las pericarditis e infecciones vasculares, pueden resultar mortales (Million y Raoult, 2015).

Las manifestaciones clínicas propias de la fiebre Q crónica, que aparece en menos del 5% de los casos y tiene una duración de entre seis meses y varios años (Maurin y Raoult, 1999), son las infecciones persistentes localizadas (endocarditis valvular, infecciones vasculares, hepatitis, y neumonía) y el síndrome de fatiga crónica (Eldin y Raoult, 2016). A partir del brote de fiebre Q en Holanda se ha adoptado un consenso en cuanto al criterio diagnóstico para definir la fiebre Q crónica. Este criterio no solo considera las manifestaciones clínicas sino también los resultados de PCR y de serología de los pacientes (Wegdam-Blans *et al.*, 2012). Las formas clínicas anteriormente citadas

requieren una terapia antibiótica prolongada (durante al menos dos años) basada en la aplicación de tratamientos combinados de doxiciclina y hidroxiclороquinona (Anderson *et al.*, 2013), junto a un seguimiento serológico como método para detectar el posible empeoramiento del paciente de manera precoz (OIE, 2016). Las complicaciones de las formas crónicas pueden ser graves o incluso mortales, especialmente las relacionadas con el sistema cardiovascular. Además, el hecho de que la fiebre Q crónica pueda manifestarse en formas clínicas distintas e inespecíficas es un factor que dificulta el diagnóstico y contribuye al retraso en la implementación de un tratamiento adecuado (OIE, 2016).

La complicación más frecuente de la enfermedad es la endocarditis (Million *et al.*, 2013), que tiene lugar en el 1% de los infectados. El principal factor de riesgo asociado, además de los estados de inmunosupresión, es la presencia de prótesis valvulares y en menor medida la existencia de patologías cardíacas tales como la insuficiencia mitral, el prolapso de la válvula mitral, la presencia de válvula aórtica bicúspide y la estenosis aórtica (Raoult *et al.*, 2011). El desarrollo de endocarditis está asociado con altos niveles de IgG anticardiolipina durante la infección aguda, por lo que los enfermos que los presenten son considerados como pacientes de riesgo para desarrollar endocarditis y, por lo tanto, han de monitorizarse (Million *et al.*, 2014). El tratamiento de las endocarditis por *C. burnetii* es vital dado que la ausencia del mismo desemboca en la muerte (Rolain *et al.*, 2005a).

Otra de las manifestaciones de la fiebre Q en el sistema cardiovascular son las infecciones vasculares, que suelen tener lugar en individuos con patologías vasculares previas, aneurismas o prótesis vasculares. Estas infecciones vasculares suelen presentar mal pronóstico, el peor de todas las manifestaciones clínicas asociadas a *C. burnetii*, especialmente en los casos en los que no se retira el tejido infectado mediante cirugía, donde la tasa de mortalidad es muy alta (Botelho-Nevers *et al.*, 2007; Melenotte *et al.*, 2012).

Para evitar que una infección aguda por *C. burnetii* pueda progresar al desarrollo de manifestaciones clínicas cardiovasculares, que son las que implican mayor riesgo para el paciente, ha de seguirse una adecuada monitorización (Million y Raoult, 2015), acompañada o no de tratamientos antibióticos prolongados (Kampschreur *et al.*, 2014; Limonard *et al.*, 2011; Million *et al.*, 2013), especialmente en pacientes pertenecientes a los grupos de riesgo descritos más adelante.

Las infecciones del sistema musculo-esquelético por *C. burnetii*, consideradas tradicionalmente poco frecuentes, han demostrado tener mayor prevalencia de la que se

había considerado hasta la fecha (Million y Raoult, 2015) y actualmente las infecciones articulares por *C. burnetii* son consideradas como procesos emergentes (Angelakis *et al.*, 2014; Million *et al.*, 2014; Tande *et al.*, 2013).

El síndrome de fatiga crónica ha sido descrito en el 20 - 30% de los enfermos de fiebre Q en todo el mundo (Arashima *et al.*, 2004; Hatchette *et al.*, 2003b; Ledina *et al.*, 2007; Leung-Shea y Danaher, 2006; Wildman *et al.*, 2002), cuya duración en el paciente es siempre superior a seis meses y puede prolongarse hasta más de 20 años (Ayres *et al.*, 1998; Wildman *et al.*, 2002). Se caracteriza por la aparición de fatiga y un mal estado de salud general que limita la normal actividad de la persona, y los síntomas asociados a la misma son muy amplios. Entre estos se encuentran problemas pulmonares, musculoesqueléticos, neurocognitivos (como la pérdida de concentración y memoria a corto plazo, alteraciones del carácter), problemas del sueño, sudoración nocturna, dolores de cabeza y visión borrosa, entre otros (Ayres *et al.*, 1998; Hatchette *et al.*, 2003b; Hickie *et al.*, 2006; Marmion *et al.*, 1996; Morroy *et al.*, 2016; van Loenhout *et al.*, 2014; Wildman *et al.*, 2002). Sin embargo, no existe una definición internacional uniforme sobre este síndrome y actualmente aún existen dudas acerca de su etiología, aunque las teorías actuales asocian la aparición del síndrome de fatiga crónica por fiebre Q a una desregulación en la producción de citoquinas debido a una estimulación crónica del sistema inmune que da lugar a la formación de inmunocomplejos de ADN no degradado de *C. burnetii* o sus antígenos (Morroy *et al.*, 2016). Del mismo modo, también existen dudas en cuanto al adecuado tratamiento, que no solo implica la administración de antibioterapia a largo plazo (Keijmel *et al.*, 2013) sino también rehabilitación física y terapia psicológica (Hickie *et al.*, 1996; Morroy *et al.*, 2016).

Las mujeres embarazadas son un importante grupo de riesgo (Anderson *et al.*, 2013). Aunque durante el brote de fiebre Q en Holanda se cuestionó el impacto de la infección por *C. burnetii* en la gestación (Munster *et al.*, 2013; van der Hoek *et al.*, 2011b), estudios recientes han demostrado que el desarrollo de fiebre Q durante el embarazo puede provocar inflamación de la placenta, asociándose al aborto espontáneo y muerte fetal. Este riesgo es más alto si la infección tiene lugar durante el primer tercio de la gestación, pudiendo manifestarse con crecimiento fetal retardado, malformaciones fetales, nacimiento prematuro (en las fases posteriores de la gestación) y muerte fetal (OIE, 2016; Million y Raoult, 2015). Aunque estos problemas pueden prevenirse mediante tratamiento antibiótico basado en la aplicación de trimetoprim y sulfatoxazol (Anderson *et al.*, 2013), el diagnóstico de la fiebre Q en mujeres embarazadas es especialmente difícil ya que suelen presentar una sintomatología más leve o ser asintomáticas con más frecuencia



que el resto de individuos (Tissot-Dupont *et al.*, 2007), observación que se ha asociado a los efectos de los estrógenos y la progesterona (Leone *et al.*, 2004; Stein *et al.*, 2000). También se ha observado que los altos títulos serológicos durante el embarazo, fenómeno muy común, están asociados a una mayor adherencia de *C. burnetii* a las válvulas cardíacas de la madre, lo que favorecería el desarrollo de endocarditis (Carcopino *et al.*, 2009; Stein *et al.*, 2000).

En general, tanto la existencia de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* como los casos clínicos de fiebre Q son más frecuentes en personas con edades comprendidas entre los 30 y 60 años, incrementándose la gravedad de las manifestaciones clínicas con la edad (Maurin y Raoult, 1999; Tissot-Dupont *et al.*, 2007). Por otro lado, la enfermedad es más frecuente en varones que en mujeres, aspecto que se ha asociado por una parte a una menor exposición ocupacional en el caso de las mujeres. Así, las mujeres expuestas al contacto con vacas y/o ovejas presentan mayor porcentaje de seropositividad que las que no (Nielsen *et al.*, 2013). Esta observación también podría explicarse por el posible efecto beneficioso del 17- $\beta$ -estradiol en hembras, como se ha podido validar en estudios realizados en animales (Leone *et al.*, 2004). Los varones mayores de 40 años son además el grupo poblacional donde es más frecuente la aparición de sintomatología clínica, así como el paso de la presentación aguda al desarrollo de manifestaciones crónicas, especialmente endocarditis (Million y Raoult, 2015).

La enfermedad es poco frecuente en niños (Hackert *et al.*, 2015) y cursa de forma más leve que en adultos (Anderson *et al.*, 2013). A diferencia de los adultos, suelen observarse con frecuencia síntomas gastrointestinales y erupciones cutáneas (Maltezou *et al.*, 2004; Richardus *et al.*, 1985; Terheggen y Leggat, 2007). Entre las manifestaciones crónicas, especialmente raras, la más común es la osteomielitis (Nourse *et al.*, 2004).

### **2.7. IMPACTO ECONÓMICO DE LA ENFERMEDAD**

La demostrada capacidad de *C. burnetii* de producir problemas reproductivos en las explotaciones de rumiantes domésticos, principalmente abortos a término y nacidos débiles y muertos y en menor medida metritis e infertilidad (sección 2. 3. 1.), puede conducir a importantes pérdidas económicas directas en las explotaciones infectadas (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005). Además, estas pérdidas no se limitan exclusivamente a aquellas debidas a los fallos reproductivos en rumiantes, sino que también resultan en pérdidas indirectas relacionadas con las limitaciones en el comercio de animales y sus productos (Porter *et al.*, 2011), así como las importantes pérdidas asociadas con el impacto en salud pública.

Sin embargo, a pesar de la amplia distribución de *C. burnetii* en las explotaciones de rumiantes domésticos de todo el mundo (EFSA, 2010; Guatteo *et al.*, 2010; Maurin y Raoult, 1999), el hecho de que este agente patógeno produzca con frecuencia una sintomatología leve en el rebaño, que puede incluso pasar desapercibida para el productor (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005), junto con la ausencia de planes para su vigilancia y control sistemáticos a nivel mundial, han sido dos factores que han contribuido a que la información disponible sobre el impacto económico real de la enfermedad en la producción animal sea muy limitada. Esta carencia de datos económicos es aún más acusada en el caso del bovino, donde la sintomatología clínica producida es más leve que en pequeños rumiantes y donde aún existen dudas de la relevancia de *C. burnetii* como agente patógeno (García-Ispierto *et al.*, 2014).

No obstante, aunque *C. burnetii* tiene un impacto limitado en sanidad animal según la opinión científica de la EFSA (*European Food Safety Authority*), menor al de otras enfermedades asociadas a problemas reproductivos y abortos a término como la brucelosis ovina y el aborto enzoótico (EFSA, 2010), ha demostrado ser un patógeno relevante capaz de producir un grave impacto en la producción de pequeños rumiantes (Oporto *et al.*, 2006) siendo una de las principales causas de aborto infeccioso en estas especies en Europa (Berri *et al.*, 2002; García-Pérez *et al.*, 2009; Kennerman *et al.*, 2010; Masala *et al.*, 2004; Rodolakis, 2006; Ruiz-Fons *et al.*, 2010). En este sentido, la elevada incidencia de abortos descrita en ciertos brotes (del 30 al 90%, sección 2. 3. 1.), implica la posibilidad de graves pérdidas económicas para los productores de las explotaciones afectadas (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005; Hatchette *et al.*, 2003a; Palmer *et al.*, 1983; Sanford *et al.*, 1994; Wouda y Dercksen, 2007 revisado por Moore *et al.*, 1991; Roest *et al.*, 2011b; van den Brom *et al.*, 2015c; van den Brom, 2009; Waldhalm *et al.*, 1978; Wouda y Dercksen, 2007 revisado por EFSA, 2010; van den Brom *et al.*, 2015c). En España, por ejemplo, se estima que cada aborto caprino supone unas pérdidas directas de entre 200 y 400 euros para el productor (Martínez-Ibeas, 2016). Además, el brote de fiebre Q ocurrido en el sur de Holanda puso de manifiesto la capacidad de esta enfermedad para afectar a un elevado número de explotaciones [más de 100 granjas positivas en el citado brote, 28 de ellas con problemas de abortos (Bontje *et al.*, 2016)], y, a su vez, dar lugar a importantes brotes epidémicos en personas por la naturaleza zoonótica de la bacteria, habiéndose documentado en dicho brote un total de 4160 afectados (Bontje *et al.*, 2016).

Es precisamente el alcance que puede llegar a tener la fiebre Q en salud pública lo que en caso de brotes en ganado doméstico incrementa la necesidad de implementar planes de control en las explotaciones afectadas para eliminar la enfermedad, así como evitar la

transmisión a otras explotaciones y a las personas. Estas medidas de control de brotes pueden tener que mantenerse durante varios años e implicar por ello un importante desembolso económico.

En lo que se refiere a las importantes pérdidas económicas tanto directas como indirectas asociadas a la enfermedad en personas que puede generar la fiebre Q en brotes humanos se contemplarían tanto los gastos en medicamentos, pruebas diagnósticas y hospitalización como los gastos asociados a las bajas laborales. En este sentido, y según los datos recogidos en el brote de Holanda, se estima que el tiempo medio de baja laboral en un caso agudo es de 7,5 días, y que el tiempo medio de recuperación en los casos de fatiga crónica es de 7,5 años, durante los que el afectado solo habrá podido trabajar el 50% del tiempo (van Asseldonk *et al.*, 2013). El carácter crónico de esta enfermedad implica, además, la administración de tratamientos prolongados y monitorización periódica de pacientes de riesgo para evitar la progresión de la enfermedad a sus formas graves (principalmente problemas cardiovasculares) (Million y Raoult, 2015). De hecho, se considera que el síndrome de fatiga crónica ha constituido uno de los principales costes en salud pública en el anteriormente citado brote (Tempelman, 2011 revisado por Morroy *et al.*, 2016). En este apartado también habría de tenerse en cuenta el gasto de las administraciones públicas en la aplicación de programas de vigilancia en grupos de riesgo como embarazadas (Munster *et al.*, 2013) o la aplicación de programas de vacunación humana durante brotes, como en Holanda (Isken *et al.*, 2013) y en zonas endémicas de fiebre Q como Australia, donde los veterinarios, técnicos y estudiantes son vacunados por considerarse población de riesgo ocupacional (Gidding *et al.*, 2009; Kermodé *et al.*, 2003; Sellens *et al.*, 2016).

Debido al impacto sin precedentes observado en el brote de Holanda, han sido varios los estudios que han evaluado las pérdidas económicas del mismo y que sirven como referencia para conocer el impacto que la fiebre Q puede tener en la economía de un país. Así, se ha estimado una cifra de 307 millones de euros invertidos en la lucha contra la enfermedad o perdidos a causa de la misma (van Asseldonk *et al.*, 2013), donde menos del 1% de las pérdidas estarían directamente producidas por los abortos en las explotaciones, correspondiendo el resto a la aplicación de medidas de control para eliminar la enfermedad en animales y así evitar la transmisión a personas [aplicación obligatoria de estrictas medidas de higiene y bioseguridad, vacunación, inmovilización de animales, prohibición de la reproducción y sacrificio de animales gestantes (habiendo supuesto 19 millones de euros tan solo las compensaciones por parte de la administración pública a los ganaderos por este último concepto)] y las pérdidas asociadas al impacto en

salud pública antes citadas. Así, el sector ganadero asume los primeros costes a corto plazo derivados de la aplicación de este tipo de planes de control, mientras que los beneficios a largo plazo se observan en salud pública. Por otro lado, Tempelman y colaboradores (Tempelman, 2011 revisado por van Asseldonk *et al.*, 2013) estimaron que las pérdidas económicas asociadas a dicho brote y a su control oscilaron entre 161 y 336 millones de euros, con 55 millones asociados a los costes directos de la aplicación de medidas de control en el sector ganadero. En esta misma línea Morroy y colaboradores (Morroy, 2011 revisado por van Asseldonk *et al.*, 2013) estimaron estas pérdidas entre 250 y 600 millones de euros. Estos dos últimos estudios, a diferencia del de Van Asseldonk y colaboradores, incluyeron también las pérdidas estimadas en calidad de vida humana. Asimismo, años después de que se consiguiera controlar el brote, se desarrolló un modelo para evaluar las diferencias económicas dependiendo del modo de aplicación de las distintas estrategias de control a emplear, como la utilización de diferentes pautas de vacunación (con un enfoque preventivo o reactivo) o la prohibición de la reproducción y sacrificio de animales gestantes, y que puede servir de referencia para afrontar futuros brotes de fiebre Q (van Asseldonk *et al.*, 2015).

Por todo lo anteriormente descrito, ante la aparición de un brote de fiebre Q en humanos asociado a animales domésticos, encontrar un equilibrio entre los intereses económicos del sector ganadero y las medidas de salud pública supone un reto en el diseño y aplicación de medidas de control eficaces (Morroy, 2011 revisado por van Asseldonk *et al.*, 2013).

## **2.8. SITUACIÓN ACTUAL DE LA FIEBRE Q EN ESPAÑA**

### **2.8.1. Fiebre Q y salud pública en España**

En España el primer caso documentado de fiebre Q en humanos, una mujer que presentaba estrecho contacto con ganado ovino, fue descrito en el año 1950 en la provincia de Salamanca (Prada J, 1950). Sin embargo, la presencia de *C. burnetii* en nuestro país ya había sido descrita un año antes, cuando se aisló el agente patógeno a partir de garrapatas de los géneros *Rhipicephalus* e *Hyalomma* recogidas en rumiantes domésticos (Pérez Gallardo F, 1949). Dos años después la presencia de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en muestras de suero condujo a la identificación de los conejos y lirones como posibles reservorios de la bacteria en el país (Pérez-Gallardo F, 1952). En los años posteriores a la descripción del primer caso humano, la información recogida sobre la enfermedad fue limitada, y se resume en la descripción de un brote de cuatro casos adquiridos en el laboratorio en el año 1952 (Clavero *et al.*, 1952) y la escasa

información en la década de los años setenta procedente de un único estudio serológico llevado a cabo en Madrid [en el que se observó una seroprevalencia del 11,7% (Aparicio-Garrido, 1970)] y en la descripción de algunos casos aislados (Moya, 1976; Torres, 1978; Urbano, 1978a; Urbano, 1978b), incluyendo la infección en turistas Finlandeses con posterioridad a su visita a las Islas Canarias (Palosuo *et al.*, 1974).

Así, no fue hasta los años ochenta cuando comenzó a disponerse de información más amplia acerca del nivel de exposición al patógeno de las poblaciones humanas en nuestro país. De manera paralela, fue también a partir de la citada década cuando la comunidad médica comenzó a tomar conciencia de la repercusión que *C. burnetii* podía tener en salud pública en España. Este punto de inflexión vino propiciado por el primer brote epidémico de fiebre Q ocurrido en nuestro país, en el municipio de Murguía (Álava) en la comunidad autónoma del País Vasco en 1981 (Sobradillo, 1983; Ruiz-Téllez A, 1985a, b), que afectó a más de 60 personas en un periodo de 21 días. El segundo brote documentado tuvo lugar de nuevo en el País Vasco, en la localidad de Balmaseda (Vizcaya) al año siguiente, siendo en este caso 42 las personas afectadas (Aguirre, 1984; Astobiza, 2012). En total, entre 1981 y 1984 se registraron 249 casos en toda España (la mitad de ellos ocurridos en el País Vasco), incluyendo no solo los dos brotes mencionados anteriormente sino también casos esporádicos (Téllez *et al.*, 1988). Asimismo, entre los años 1981 y 1991 se diagnosticaron un total de 914 casos en toda España (Pascual-Velasco, 1996).

Así, desde el primer brote notificado se han publicado multitud de casos tanto esporádicos como asociados a brotes en todas las comunidades autónomas (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resumen de los principales estudios sobre casos humanos de fiebre Q en España reportados en la literatura. ND = no disponible.

Región de estudio	Tipo de estudio	Nº de casos descritos	Año de estudio	Referencia
Toda España	Recopilación de casos esporádicos y brotes	249 (51 en brotes)	1981-85	(Téllez <i>et al.</i> , 1988)
Bilbao	Brote	50	2014	(Alonso <i>et al.</i> , 2015)
Vizcaya	Brote	33	2009-10	(Bamberg <i>et al.</i> , 2007; Delgado, 2011; Maurin y Raoult, 1999)
Guipúzcoa	Recopilación de casos esporádicos y brotes locales	1261	1984-04	(Montes <i>et al.</i> , 2006)
País Vasco	Recopilación de casos esporádicos y brotes locales	130	1981-84	(Montejo-Baranda <i>et al.</i> , 1985)
	Recopilación de casos	164	1982-86	(Sobradillo <i>et al.</i> , 1989)

Región de estudio	Tipo de estudio	Nº de casos descritos	Año de estudio	Referencia
Barcelona	Recopilación de casos	13	1978-81	(Prats, 1982)
	Recopilación de casos	13	1976-80	(Mensa, 1983)
	Recopilación de casos	63	1985-87	(Domingo <i>et al.</i> , 1999)
	Recopilación de casos	66	1989-99	(Sampere <i>et al.</i> , 2003)
	Recopilación de casos	71	1995-09	(Espejo <i>et al.</i> , 2014)
Tarragona	Recopilación de casos	85	1988-95	(Moreno, 1995 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
Sevilla	Recopilación de casos	35	1983-84	(Martínez-Luengas <i>et al.</i> , 1985)
	Recopilación de casos	29	1996-99	(Álvarez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2001)
	Recopilación de casos	108	1984-91	(Viciana, 1991 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
	Recopilación de casos	231	1983-89	(Alarcón <i>et al.</i> , 2003)
Huelva	Recopilación de casos	50	1986-92	(Morón, 1992)
	Recopilación de casos	109	1987-99	(Romero-Jiménez <i>et al.</i> , 2003)
Burgos	Recopilación de casos	18	2011-12	(González-Quijada <i>et al.</i> , 2015)
	Recopilación de casos	14	2009-10	(Quijada <i>et al.</i> , 2012)
	Brote	48	1992	(Yáñez-Ortega, 1992)
Madrid	Recopilación de casos	54	2001-08	(Ruiz-Seco <i>et al.</i> , 2011)
	Brote	22	2004	(Ríos-Martín <i>et al.</i> , 2006)
	Recopilación de casos	37	1982-84	(Fernández, 1985)
	Recopilación de casos	8	1980-84	(Puras, 1984)
	Recopilación de casos	23	1977-80	(Hellín, 1981)
Asturias	Brote	60	2003	(García-Clemente <i>et al.</i> , 2007)
	Recopilación de casos	12	1996-01	(Nuño-Mateo <i>et al.</i> , 2002)
Soria	Estudio seroprevalencias (a raíz de un brote)	14	1998	(Nebreda <i>et al.</i> , 2001)
Soria	Recopilación de casos	13	1984-96	(Merino <i>et al.</i> , 1998)
Ávila	Recopilación de casos	39	2010-14	(Otero, 2016)
Extremadura	Recopilación de casos	124	1992-05	(Muñoz-Sanz <i>et al.</i> , 2007)
Badajoz	Recopilación de casos	42	1992-95	(Pijierro, 1995 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
Huesca	Recopilación de casos	22	1987-91	(González-Sinde, 1991)
Murcia	Caso esporádico	1	2001	(Bautista-Hernández <i>et al.</i> , 2004)
Valencia	Caso esporádico	32	ND	(Abril, 1995 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
Alicante	Caso esporádico	1	2001	(Murcia <i>et al.</i> , 2002)
La Rioja	Recopilación de casos	27	1995-09	(Espejo <i>et al.</i> , 2014)
Gran Canaria	Recopilación de casos	85	2005-09	(Espejo <i>et al.</i> , 2014)
	Recopilación de casos	86	2004-09	(Bolaños <i>et al.</i> , 2003b)
	Recopilación de casos	29		(Farfante, 1992; Santana, 1995)
La Palma	Recopilación de casos	35	1986-88	(Millán, 1989 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
Lanzarote	Recopilación de casos	23	ND	(Pascual-Velasco, 1994)
Tenerife	Recopilación de casos	35	ND	(Layne, 1994 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
Mallorca	Recopilación de casos	87	2003-11	(Raya-Cruz <i>et al.</i> , 2014)

## INTRODUCCIÓN

Región de estudio	Tipo de estudio	Nº de casos descritos	Año de estudio	Referencia
Castilla-La Mancha	Recopilación de casos	35	1997-02	(Bartolomé <i>et al.</i> , 2004)
La Coruña	Recopilación de casos	11	1990	(Sesma-Sánchez., 1990)
Orense	Recopilación de casos	31	1992-95	(Zúñiga, 1991 revisado por Pascual-Velasco, 1996)

En relación a los casos clínicos, cabe destacar que España es el país en el que se describió la que fue la mayor serie de casos de neumonía causada por *C. burnetii* en el mundo hasta el brote en Holanda en 2007 [ciento treinta casos en un periodo de tres años (1981-1984), y que tuvo lugar también en el País Vasco (Montejo-Baranda *et al.*, 1985)].

Asimismo, en lo que respecta a los niveles de seroprevalencia en personas, la información ofrecida por los diversos trabajos publicados en zonas geográficas y segmentos poblacionales diferentes ha puesto de manifiesto el contacto de la población española con el patógeno en diversas regiones (Tabla 9). Dichos estudios muestran importantes variaciones en los niveles de seroprevalencia dependiendo de la localización, el tipo de población estudiada (rural o urbana, en contacto o no con animales domésticos, población sana o individuos enfermos, entre otros) y la técnica analítica empleada (fijación del complemento o inmunofluorescencia indirecta), así como la interpretación de la misma (punto de corte empleado), habiéndose descrito valores de seroprevalencias que oscilan entre un 3% (Peacock *et al.*, 1983) y un 92% (Pérez-Trallero *et al.*, 1995). En cualquier caso, la mayoría de los estudios de seroprevalencia fueron realizados durante las décadas de los años ochenta y noventa, existiendo poca información a partir del año 2000 (Tabla 9)].

Por todo lo anteriormente citado, España es considerada un país endémico de fiebre Q (Bartolomé *et al.*, 2007; Cardeñosa *et al.*, 2006b). Además, actualmente se considera una enfermedad en expansión en nuestro país, asociándose este fenómeno a determinados cambios en los sistemas de producción ganadera (relacionados con la intensificación de la producción y la concentración de partos en determinadas épocas para satisfacer las demandas de mercado), así como con factores sociales, como son la urbanización de zonas de pastoreo y el cada vez más frecuente uso de granjas para fines educativos y recreativos (Fernández-Guerrero, 2014).

**Tabla 9.** Principales estudios sobre seroprevalencias humanas a *C. burnetii* en España. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. MAP = microaglutinación en porta.

Comunidad Autónoma	Localización. Segmento poblacional estudiado	Año de estudio	Número de muestras	Técnica analítica empleada	Prevalencia (%)	Referencia
País Vasco	País Vasco. Población general	1993	810	IFI	32,3 (38,5 en áreas rurales) 15,7	(Sanzo <i>et al.</i> , 1993)
	Vizcaya. Donantes de sangre	1985	1286	FC	5,4 en Bilbao 30,2 en zonas rurales	(Alayo-Arrugaeta, 1986)
	Vizcaya. Donantes de sangre San Sebastián.	1983	556	FC	9,5	(Cisterna, 1983)
	Trabajadores de matadero	1995	36	IFI	91,7	(Pérez-Trallero <i>et al.</i> , 1995)
	Navarra Población general	1989	100	FC	25	(Cour-Boveda, 1990)
	Manipuladores de carne	1981	82	FC	12,2	(Alayo-Arrugaeta, 1986)
Galicia	Comarca de El Ferrol (La Coruña). Donantes de sangre	1990	923 FC 529 IFI	FC IFI	11 FC 18 IFI	(Sesma-Sánchez, 1990)
	Orense. Población general	1986-91	1345	IFI	4,9	(Zúñiga, 1991 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
	Zona oriental de la Comunidad. Pacientes con neumonía		66		53	(Pascual-Velasco, 1996)
Cantabria					48,6	
	Zona noreste de la Comunidad	1998	595	IFI	32,8 zonas urbanas 54; 55 y 82,3 zonas rurales	(Pascual-Velasco <i>et al.</i> , 1998)
Castilla y León	Burgos. Pacientes hospitalizados de más de 65 años con un accidente cerebrovascular (casos) y sin éste (controles)	2011-12	803	IFI	14,5 casos 6,1 controles	(González-Quijada <i>et al.</i> , 2014)
	Burgos. Pacientes hospitalizados de más de 65 años con arteriosclerosis (casos) y sin arteriosclerosis (controles)	2011-12	513	IFI	51,2 casos 37,6 controles	(González-Quijada <i>et al.</i> , 2014)
	León. Población general	1994	406	IFI	40,6	(Suárez-Estrada <i>et al.</i> , 1996)
	Soria. Municipio con un brote declarado en 1998	1996-99	253	IFI	60	(Nebreda <i>et al.</i> , 2001)



## INTRODUCCIÓN

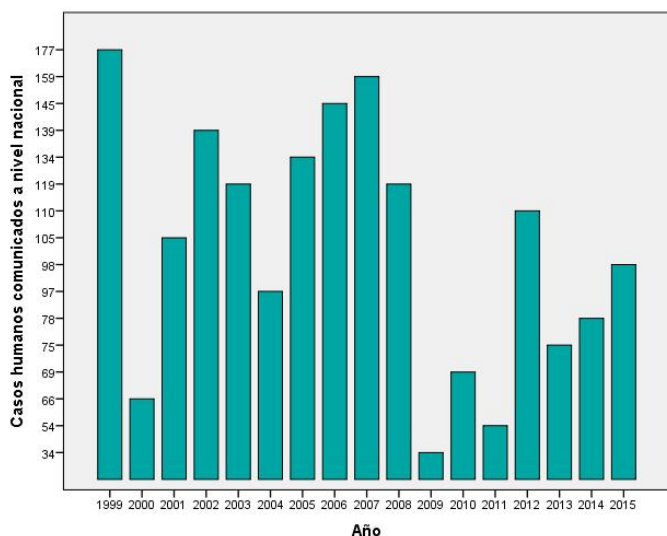
Comunidad Autónoma	Localización. Segmento poblacional estudiado	Año de estudio	Número de muestras	Técnica analítica empleada	Prevalencia (%)	Referencia
	Soria	1991	298	IFI	20,8	(Saz <i>et al.</i> , 1993)
	Valladolid.	1991	1166	FC + IFI	13,6	(Palenzuela, 1991)
	Población general				9,3	
	Valladolid.	1983	290	FC	14 en población rural	(Ortiz de Lejarazu, 1983)
	Salamanca	1987	400	IFI	50,2	(Ruiz-Beltrán <i>et al.</i> , 1990)
	Población general					
	Segovia.	1994	508	IFI	57,3	(Yacub, 1994)
	Población rural					
Aragón	Zaragoza. Estudiantes de veterinaria	1994-95	479	FC	10	(Valencia <i>et al.</i> , 2000)
	Barcelona. Vallés occidental	2004-05	216	IFI	15,3	(Cardeñosa <i>et al.</i> , 2006b)
Cataluña	Cataluña.				4,2 Barcelona	
	Distintas áreas rurales y urbanas	1988	1253	FC	39,2 zonas rurales 8,8 en la capital	(Ausina, 1988)
	Madrid capital	1989	219	IFI	15,4 zonas rurales 28,2	(Téllez <i>et al.</i> , 1989)
Madrid	Zonas rurales					
	Zona urbana y zonas rurales	1988	519	FC	Medio rural (Bustarviejo) 34,5	(Cour-Boveda, 1990)
	Población urbana	1980	160	MAP	6,2	(Daza-Pérez, 1980)
Extremadura	Área rural	1988	86	FC	59,3	(Cour-Boveda, 1990)
	Albacete.	2004-05	863	IFI	23	(Bartolomé <i>et al.</i> , 2007)
Castilla-La Mancha	Donantes de sangre					
	Localidad de Guadalajara	1988	36	FC	33,3	(Cour-Boveda, 1990)
	Huelva.	1999	1654	IFI	5,08	(Lepe <i>et al.</i> , 1999)
	Zona norte de la provincia Huelva.	1994	1654	IFI	4,8	(Lepe <i>et al.</i> , 1994)
Andalucía	Zona norte de la provincia Huelva.	1990	149	IFI	30,9	(Igual, 1990)
	Zona norte de la provincia Sevilla.	1984	544	IFI	10,8	(García-Curiel, 1984)
	Población general					
	Islas Canarias	1998-2000	1358	IFI	23,9	(Bolaños <i>et al.</i> , 2003a)
Canarias	Tenerife	1995	308	IFI	11,6	(Del Castillo, 1995)
	Lanzarote	1991	1016	FC	10,9 FC	(Pascual-Velasco, 1994)
				IFI		

Comunidad Autónoma	Localización. Segmento poblacional estudiado	Año de estudio	Número de muestras	Técnica analítica empleada	Prevalencia (%)	Referencia
					18,7 IFI	
	Lanzarote	1989	390	FC	6	(Pascual-Velasco, 1992)
	Lanzarote	1986	100	IFI	3	(Peacock <i>et al.</i> , 1983)

A pesar de que la circulación de *C. burnetii* en poblaciones humanas en España y su impacto en salud pública han sido ampliamente demostradas desde hace más de tres décadas, no fue hasta el año 2015 cuando la fiebre Q pasó a ser una enfermedad de declaración obligatoria en la totalidad del territorio español (BOE-A-2015-2837). Anteriormente, la declaración de la enfermedad tenía carácter voluntario según la normativa nacional, si bien cabe destacar que en determinadas comunidades autónomas ya existía previamente obligatoriedad en la declaración de casos antes de la entrada en vigor de la actual normativa de ámbito nacional. Valga como ejemplo el caso de la comunidad autónoma de Castilla y León, donde los casos de fiebre Q en humanos se han declarado de manera obligatoria desde 2007 (Orden SAN/2128/2006, de 27 de diciembre, por la que se regula el Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria de Castilla y León.-BOCyL nº 5 de 8-1-2007).

Esta ausencia de armonización en la comunicación oficial de casos clínicos de fiebre Q ha contribuido significativamente a la histórica subestimación de la incidencia real de la enfermedad en nuestro país. A ello se suma el hecho de que muchos de los casos no llegan a ser diagnosticados correctamente debido a la naturaleza inespecífica de los síntomas y a su carácter con frecuencia autolimitante. En este sentido cabe citar que diversos estudios sobre casos de fiebre Q humana realizados en pacientes hospitalizados demostraron que el diagnóstico se logró posteriormente al alta hospitalaria de los mismos, con base en las historias clínicas y pruebas serológicas realizadas en el marco de trabajos de investigación y llevados a cabo de manera retrospectiva (González-Quijada *et al.*, 2014; Raya-Cruz *et al.*, 2014). En este contexto, se considera que la información sobre los casos de fiebre Q oficialmente comunicados en territorio español publicados por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (boletines anuales de vigilancia epidemiológica en enfermedades transmisibles de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en [www.isciii.es](http://www.isciii.es)) hasta la fecha no es representativa de la distribución real de la enfermedad en la población nacional debido al bajo número de laboratorios que han comunicado este tipo de información a lo largo de los años. De esta forma, según datos del ISCIII, se estima

que la representatividad de los resultados en los años 2012 y 2013 estuvo en torno al 30% y 34% de la población, respectivamente, y del 25% en 2011, de tal modo que los datos oficiales, que muestran una media de 105 casos notificados anualmente entre 1999 y 2015 (con un máximo de 177 casos en 1999 y un mínimo de 34 en 2009) (Figura 1), subestimarían los casos reales.



**Figura 1.** Representación del número de casos humanos anuales de fiebre Q en España recogidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Fuente: informes anuales de enfermedades de declaración obligatoria del ISCIII. [www.isciii.es](http://www.isciii.es).

A pesar de ello, desde el año 2008 hasta la actualidad España se encuentra entre los cuatro países europeos con mayor tasa de comunicación de casos en Europa (habiendo sido el primer país en 2012) (EFSA y ECDC, 2011; 2012; 2013; 2014; 2015a; 2016), superando la tasa de comunicación de países donde la fiebre Q era considerada una enfermedad de declaración obligatoria con anterioridad, (consideración que recibe actualmente en 24 Estados Miembros). Los casos descritos en nuestro país en este periodo han sido en su mayoría de tipo esporádico y no ligados a brotes epidémicos como fue el caso de Holanda de 2007 a 2011 (Schneeberger *et al.*, 2014) o de Hungría desde 2013 (Gyuranecz *et al.*, 2014), con la excepción del País Vasco, donde desde 2007 hasta la actualidad se han descrito cuatro brotes: uno en 2007 y dos en 2008 que afectaron a cuatro y siete personas respectivamente (revisado por Delgado, 2011), otro en 2011 que afectó a 33 personas (Delgado, 2011) y el último descrito en Bilbao en 2014 (Alonso *et al.*, 2015), con 50 personas afectadas. En esta línea, España fue el país con mayor tasa de comunicación por número de habitantes (0,54/100 000 habitantes) en 2015 (datos más recientes disponibles), frente a la tasa general en toda Europa de 0,16/100 000 en 2015 (EFSA y ECDC, 2016), seguida de Croacia (0,49) y Chipre (0,47).

Por otro lado, cabe citar que existen casos importados de fiebre Q en España, si bien son anecdóticos [cinco casos descritos en la bibliografía hasta la fecha (Ta *et al.*, 2008)]. Los viajes a España también se han asociado a casos esporádicos de fiebre Q en otros países

(cuatro casos en 2014, seis en 2013), si bien se considera que, de manera general, son pocos los casos de infección por *C. burnetii* descritos en viajeros a lo largo de la historia [menos de 50 casos notificados hasta 2008 (Ta *et al.*, 2008)].

En lo que respecta a las consecuencias en salud pública y a pesar de que muchas de las infecciones por *C. burnetii* son asintomáticas o autolimitantes, en determinados casos los pacientes desarrollan cuadros clínicos de gravedad variable que requieren hospitalización. Como ejemplo puede citarse un estudio de casos clínicos de distintas regiones de España (Espejo *et al.*, 2014), donde el 60% de los casos requirieron admisión en el hospital, lo que tiene importancia no solo desde el punto de vista sanitario sino también desde un punto de vista económico. Por otro lado, y siguiendo con su impacto en salud pública, la fiebre Q es la causa más frecuente del síndrome de fiebre de duración intermedia (FDI) en España (Espinosa *et al.*, 2010), y la segunda causa de neumonía en el País Vasco (Montejo-Baranda *et al.*, 1985; Sobradillo *et al.*, 1989). Asimismo, a pesar de que es poco frecuente que esta enfermedad llegue a causar la muerte, en España se ha observado un 13,2% de mortalidad en aquellos casos de fiebre Q asociados a endocarditis (Mogollón *et al.*, 2011), una de sus formas crónicas más frecuente.

Por otro lado, en España, al igual que en la mayoría de partes del mundo, se considera a los rumiantes domésticos (vacas, ovejas y cabras) como los principales **reservorios** y fuente de infección de *C. burnetii* más importante para el hombre (van den Brom *et al.*, 2015).

En general y dependiendo de la región, los pequeños rumiantes desarrollan un papel clave en la epidemiología de la enfermedad, como es el caso del ganado ovino en el País Vasco (García-Pérez *et al.*, 2009), con las cabras y el bovino de carne como reservorios secundarios (Ruiz-Fons *et al.*, 2010), o del caprino en Canarias (Rodríguez *et al.*, 2010b). Así, en distintos trabajos realizados en nuestro país se ha observado un mayor número de casos entre personas con contacto directo o indirecto con rumiantes domésticos en diferentes zonas, como el País Vasco (Montejo-Baranda *et al.*, 1985), Sevilla (Alarcón *et al.*, 2003; Romero-Jiménez *et al.*, 2003), Badajoz (Muñoz-Sanz *et al.*, 2007), Ávila (Otero, 2016) o Gran Canaria (Bolaños *et al.*, 2003b). Diversos estudios de seroprevalencia arrojan resultados en esta misma línea. Así, en Cantabria se observó que el 74% de personas que tenían contacto con ganado bovino eran seropositivas (Pascual-Velasco, 1996). En el caso de Segovia, se detectó un porcentaje de seropositivos similar (73,6%) cuando se analizaron varones con profesiones que implicaban contacto directo con rumiantes (Yacub, 1994). Asimismo, diferentes trabajos han puesto de manifiesto que la

realización de actividades relacionadas con la ganadería y el contacto con ovejas, cabras y vacas son factores de riesgo de infección por *C. burnetii* (Bartolomé *et al.*, 2007; Sanzo *et al.*, 1993; Valencia *et al.*, 2000).

En la misma línea se ha demostrado que las seroprevalencias de fiebre Q en **áreas rurales** en distintas partes de España son mayores que las observadas en zonas urbanas de una misma región, llegando a alcanzar niveles superiores al 80% (Pascual-Velasco *et al.*, 1998) (Tabla 9), lo que podría atribuirse a una mayor presencia de rumiantes domésticos en estas zonas, y por tanto una mayor exposición al patógeno. En varias series de casos en Sevilla (Alarcón *et al.*, 2003) y Extremadura (Muñoz-Sanz *et al.*, 2007) también se ha podido observar este fenómeno de mayor incidencia en áreas rurales. Asimismo, de la serie de 16 brotes registrados en el País Vasco hasta el año 1993 (Sanzo *et al.*, 1993), la mayoría tuvo lugar en áreas rurales. Sin embargo, como excepción cabe citar un estudio de seroprevalencias llevado a cabo en Albacete, en el que las prevalencias encontradas en la capital de la provincia fueron superiores a las prevalencias generales de toda la región (Bartolomé *et al.*, 2007).

En cualquier caso y al igual que los descrito en otras regiones, una proporción significativa de los casos observados en España se dan en personas que viven en áreas urbanas sin contacto directo con ganado y en muchas ocasiones no puede establecerse una asociación directa entre el contacto con rumiantes domésticos y la enfermedad (Bartolomé *et al.*, 2007; Cardeñosa *et al.*, 2006b; García-Clemente *et al.*, 2007). Este fenómeno podría explicarse en parte por la compleja epidemiología de la fiebre Q, en la que aspectos como la resistencia ambiental y baja dosis infectiva de *C. burnetii* (Maurin y Raoult, 1999), así como la capacidad de la bacteria para propagarse con el viento a largas distancias desde su foco de origen (Hawker *et al.*, 1998; Tissot-Dupont *et al.*, 2004), complican el establecimiento del vínculo epidemiológico. Por otro lado, en determinadas zonas endémicas, como el País Vasco, se han observado brotes en los que la población urbana se ha visto más afectada que la rural en la misma zona, lo que podría deberse a una menor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad de aquellas personas que han tenido contacto previo con el patógeno (Ruiz, 1985).

En lo que respecta al **género** de las personas infectadas por *C. burnetii* en España, existe un predominio de casos en varones respecto a mujeres (Espejo *et al.*, 2014; Montejo-Baranda *et al.*, 1985) de acuerdo a lo descrito en otras regiones (Maurin y Raoult, 1999). Así, entre los años 2005 y 2015 y según los datos recogidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (informes anuales de enfermedades de declaración obligatoria

disponibles en [www.isciii.es](http://www.isciii.es)) el porcentaje de positivos varones osciló entre el 67% y el 79%, dependiendo del año, al igual que se observa al analizar los datos por regiones (Tabla 10).

**Tabla 10.** Proporciones de casos humanos positivos a fiebre Q en España en función del género en trabajos publicados en la literatura científica entre 1985 y 2014.

	Región	% varones positivos a fiebre Q	Referencia
Casos clínicos	Castilla-La Mancha	71%	(Bartolomé <i>et al.</i> , 2004)
	Asturias	71%	(García-Clemente <i>et al.</i> , 2007)
	País Vasco	74%	(Montejo-Baranda <i>et al.</i> , 1985)
	Mallorca	79%	(Raya-Cruz <i>et al.</i> , 2014)
	Extremadura	80%	(Muñoz-Sanz <i>et al.</i> , 2007)
	Gran Canaria	85%	(Bolaños <i>et al.</i> , 2003b)
	Cataluña	92%	(Domingo <i>et al.</i> , 1999)
	Huelva	92%	(Romero-Jiménez <i>et al.</i> , 2003)
	Distintas regiones	78%	(Mogollón <i>et al.</i> , 2011)
	Distintas regiones	80%	(Espejo <i>et al.</i> , 2014)
Estudio de seseroprevalencias	País Vasco	36,3% (vs. 29% mujeres)	(Sanzo <i>et al.</i> , 1993)
	León	46,9% (vs. 35,8% mujeres)	(Suárez-Estrada <i>et al.</i> , 1996)
	Albacete	29% (vs. 18% mujeres)	(Bartolomé <i>et al.</i> , 2007)
	Cataluña	19% (vs. 14% mujeres)	(Cardeñosa <i>et al.</i> , 2006b)
	Madrid	15,4% (vs. 8,8% mujeres)	(Téllez <i>et al.</i> , 1989)

Este predominio de casos en varones coincide con lo observado en otras partes del mundo, como la mayoría de los países europeos, California y Australia (Davies *et al.*, 1997; Garner *et al.*, 1997; Montejo-Baranda *et al.*, 1985; Raoult *et al.*, 2000; Sanzo *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1994; Tissot-Dupont *et al.*, 1992), donde se considera que los bovinos son el principal reservorio de la enfermedad y fuente de infección para el hombre, destacando también el caso Holanda y el brote ocurrido entre 2007 y 2010 asociado a cabras de leche, donde la razón de casos hombre:mujer fue de 1,7:1 (Schneeberger *et al.*, 2014). Este hecho se ha justificado tradicionalmente por una mayor exposición al patógeno en hombres, principalmente asociado a la realización de actividades profesionales ligadas al contacto con animales de producción (Maurin y Raoult, 1999; Pascual-Velasco *et al.*, 1998), aunque algunos autores señalan que este fenómeno

también puede estar asociado a factores hormonales ligados al género (Raoult *et al.*, 2005).

En lo que respecta a la **edad** de los afectados, y en parte asociado a la exposición al patógeno en el ámbito profesional por contacto con rumiantes domésticos, en líneas generales se observa que la mayoría de los casos en España se dan en personas de entre 30 y 65 años [boletines anuales (2005-2009) de vigilancia epidemiológica en enfermedades transmisibles de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (ISCIII, 2017)] coincidiendo con los datos recogidos por Maurin y Raoult (Maurin y Raoult, 1999). En este sentido, esta tendencia se ha observado en distintos estudios en diferentes regiones de España (Espejo *et al.*, 2014), en las comunidades autónomas de Cataluña (Cardeñosa *et al.*, 2006a), País Vasco (Montejo-Baranda *et al.*, 1985; Montes *et al.*, 2006), Madrid (Ruiz-Seco *et al.*, 2011), Asturias (García-Clemente *et al.*, 2007) o Extremadura (Muñoz-Sanz *et al.*, 2007), en la provincia de Sevilla (Alarcón *et al.*, 2003), y la isla de Mallorca (Raya-Cruz *et al.*, 2014), Sin embargo, también se han descrito excepciones a esta tendencia. Así, por ejemplo, de forma ocasional se han detectado mayores porcentajes de casos en personas mayores de 50 años (González-Quijada *et al.*, 2015; Otero, 2016) y menores de 40 años (Bartolomé *et al.*, 2007). Asimismo, y aunque la fiebre Q no es una enfermedad frecuente en niños, se ha observado un 40,8% de seropositividad a la enfermedad en niños con cuadros febriles en una zona rural de Vizcaya (Alayo-Arrugaeta, 1986).

### **2.8.2. Particularidades geográficas y medioambientales de las distintas regiones españolas**

A pesar de que todo el país es considerado zona endémica, la distribución geográfica de los casos así como de las manifestaciones clínicas más frecuentes no es homogénea en todo el territorio español, al igual que se ha observado en otros países (Maurin y Raoult, 1999), como es el caso de Canadá [(donde el síndrome febril y la hepatitis son las formas de presentación más frecuentes en Ontario (Vellend, 1982), mientras que en Nueva Escocia lo es la neumonía (Marrie, 1988)], Australia (Derrick, 1937), Francia (Tissot-Dupont *et al.*, 1992), Grecia (Gikas *et al.*, 2001) o Taiwán (Chang *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2014).

En términos generales, la zona norte del país se caracteriza por presentar una mayor prevalencia respecto a las regiones del centro y del sur (Cardeñosa *et al.*, 2006a; Téllez

*et al.*, 1988), siendo el ganado ovino y, en menor medida el bovino, los principales reservorios en esta zona (Téllez *et al.*, 1988).

A este respecto, merece una mención especial la comunidad autónoma del País Vasco, considerada una zona hiperendémica a nivel mundial (Maurin y Raoult, 1999). Así, hasta el año 1993 se documentaron al menos 16 brotes que afectaron a más de 300 personas (Aguirre, 1984, 1983; Marco, 1985; Ruiz-Téllez A, 1985a; Sanzo *et al.*, 1993; Sobradillo, 1983; Sobradillo, 1986). Además, son también numerosos los casos esporádicos que se han detectado en esta autonomía desde los años ochenta. A este respecto cabe destacar un trabajo (Montes *et al.*, 2006) donde se indica que el número total de casos entre 1984 y 2004 solo en la provincia de Guipúzcoa (donde el número de casos por año en ausencia de brotes oscila entre 30 y 60), fue de 1261. En lo que respecta a investigaciones de seroprevalencia, el estudio poblacional más reciente disponible, publicado en 1993, mostró niveles del 32,3% en la población general de la región. Sin embargo, en un estudio realizado en 1995 en trabajadores de un matadero se describió una prevalencia del 91,7% (Pérez-Trallero *et al.*, 1995), poniendo de manifiesto la importante exposición de los operarios al agente patógeno y la importancia de los rumiantes domésticos como reservorios de la enfermedad, así como potenciales fuentes de contagio para el hombre en esta región geográfica.

A partir de los años 90 el número de brotes en el País Vasco ha sido limitado, habiéndose descrito desde 2007 hasta la actualidad cuatro brotes: uno en 2007 y dos en 2008 con un alcance limitado que afectaron a cuatro y siete personas respectivamente (revisado por Delgado, 2011), otro en 2011 que afectó a 33 personas y que tuvo lugar en una industria de la provincia de Vizcaya y cuya fuente más probable de infección fue rebaño de cabras situado junto a la fábrica (Delgado, 2011), y el último brote documentado hasta la fecha en la región en Bilbao en 2014 (Alonso *et al.*, 2015), con un total de 50 casos confirmados y 12 sospechosos. Este brote tuvo lugar entre los trabajadores de una planta de tratamiento de residuos urbanos (Alonso *et al.*, 2015), atribuyéndose el posible origen (sin confirmación epidemiológica) a restos de cadáveres de pequeños rumiantes indebidamente desechados que llegaron a dicha instalación. A pesar del número limitado de brotes, se ha descrito un número de casos significativo a partir de 1994. Así, desde ese año hasta 2007 el número de casos notificados según la información recogida por el Servicio de Epidemiología de Salud pública del Gobierno Vasco osciló entre 65 y 126 casos dependiendo del año, con una media de 102 casos anuales (Astobiza, 2012). En esta línea, entre los años 2009 y 2015, los datos más recientes a este respecto publicados por el Sistema de Información Microbiológica del ISCIII ([www.isciii.es](http://www.isciii.es)), mostraron que el



País Vasco sigue siendo la región con mayor número de casos oficialmente declarados (con una media de 30 casos anuales), seguida por Andalucía (12 casos), Canarias (12 casos), Asturias (ocho casos) y Cataluña (seis casos) ([www.isciii.es](http://www.isciii.es)) (Tabla 11).

**Tabla 11.** Número de casos por comunidad autónoma recogidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica entre 2009 y 2015. Fuente: ISCIII ([www.isciii.es](http://www.isciii.es)).

	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	Total
<b>País Vasco</b>	25	38	36	40	12	36	24	211
<b>Andalucía</b>	-	-	-	52	18	13	-	83
<b>Canarias</b>	43	9	15	4	6	2	-	79
<b>Asturias</b>	9	9	4	10	16	10	6	64
<b>Cataluña</b>	9	12	11	2	1	6	-	41
<b>Aragón</b>	11	10	8	2	-	-	-	31
<b>Castilla y León</b>	-	-	-	-	-	1	3	4
<b>Castilla-La Mancha</b>	-	-	-	-	1	-	1	2
<b>Extremadura</b>	1	-	1	-	-	-	1	3
<b>Total</b>	98	78	75	110	54	69	34	518

En cualquier caso, el hecho de que la declaración de casos humanos no haya tenido carácter obligatorio hasta 2015 (BOE-A-2015-2837), y que la participación de los hospitales en el Sistema de Información Microbiológica haya sido voluntaria, hacen que el número de casos comunicados por cada comunidad autónoma no sea necesariamente representativo del número real en cada región de España.

La **manifestación clínica aguda** más frecuente en el norte del país es la neumonía, como queda reflejado en varios trabajos realizados en el País Vasco en distintos periodos de tiempo [Montes *et al.*, 2006 (996 casos de un total de 1261 descritos en Guipúzcoa entre 1984 y 2004; 79%), Antón, 1990 (cuarenta y cinco pacientes con neumonía de un total de 60 descritos; 75%), Montejo-Baranda *et al.*, 1985; Sobradillo *et al.*, 1989)]. Otras regiones donde se ha descrito un predominio de casos de neumonía son Asturias, con un 87% (García-Clemente *et al.*, 2007) y un 83% (Nuño-Mateo *et al.*, 2002) de casos, dependiendo del estudio; La Rioja con un 41% (Espejo *et al.*, 2014); Soria, con un 78% (Merino *et al.*, 1998) y Baleares, con un 45% (Raya-Cruz *et al.*, 2014).

Por el contrario, en el centro y en el sur de España, donde las prevalencias tienden a ser menores (Montes *et al.*, 2006), la sintomatología más frecuentemente asociada a las presentaciones agudas es un cuadro clínico de síndrome febril y hepatitis (Alarcón *et al.*, 2003; Pascual-Velasco, 1996). De esta forma, se ha observado un predominio de estos signos en la provincia de Huelva [55%-100% (Lepe *et al.*, 1999; Romero-Jiménez *et al.*,

2003)], Sevilla [64% (Alarcón *et al.*, 2003)], Extremadura [53% fiebre y 43% hepatitis (Muñoz-Sanz *et al.*, 2007)], Castilla-La Mancha [48% (Bartolomé *et al.*, 2004)], Madrid [67% (Ruiz-Seco *et al.*, 2011)] y Canarias [87,5% (Bolaños *et al.*, 2003b)]. A pesar de su localización geográfica en el norte del país, en Cataluña el síndrome febril y la hepatitis son también los síntomas predominantes de fiebre Q aguda (Domingo *et al.*, 1999; Sampere *et al.*, 2003). En cualquier caso, también se han observado excepciones en cuanto a la sintomatología prevalente dependiendo de la zona geográfica. A este respecto cabe citar un brote ocurrido en Guipúzcoa en los 90, en el que el 86% de los pacientes presentó signos de hepatitis y ninguno neumonía (Martínez, 1992).

Por otro lado, en lo que respecta a las manifestaciones crónicas de la enfermedad, cabe destacar que, en el País Vasco, a pesar del importante número de casos agudos descritos, el porcentaje de casos crónicos que se reporta es notoriamente bajo [0,16% (Montes *et al.*, 2006), 3,3% (Téllez, 1992, 1993)], mientras que en otras zonas de España el porcentaje de casos crónicos es notablemente mayor [35,6% en Madrid, 28,8% en Andalucía o del 15,2% en Cataluña (Téllez, 1992, 1993)].

Los factores asociados al predominio de unas manifestaciones clínicas u otras en las diferentes zonas geográficas de España no se conocen aún con certeza, y de hecho siguen existiendo muchas incógnitas en cuanto a este aspecto de la epidemiología de la fiebre Q en todo el mundo (Maurin y Raoult, 1999). Si bien se ha descrito la circulación de diferentes genotipos de *C. burnetii* en diferentes regiones geográficas (Astobiza *et al.*, 2012b; González-Barrio *et al.*, 2016a; González-Barrio *et al.*, 2016b; Jado *et al.*, 2012), no existen suficientes datos que permitan establecer una asociación entre los genotipos de los aislados y las presentaciones clínicas observadas.

Algunos autores han sugerido que el predominio de los casos neumónicos tendría lugar en pacientes con alguna enfermedad de base, si bien los resultados obtenidos en diversos trabajos contradicen esta teoría (Abad *et al.*, 1999; García-Clemente *et al.*, 2007). Por otro lado, cabe citar también la asociación entre el incremento de las formas clínicas neumónicas y los meses más fríos del año (de noviembre a febrero) observada en un trabajo realizado sobre casos de tres regiones españolas (Espejo *et al.*, 2014). Según estos autores, este incremento podría estar asociado al incremento de la susceptibilidad del tracto respiratorio debido al tiempo frío y las infecciones víricas propias del mismo. Además, el hecho de que gran parte de los estudios de casos en nuestro país sea de tipo retrospectivo, lleva consigo limitaciones respecto a la información disponible sobre los pacientes, lo que dificulta el estudio de los factores de riesgo, así como los factores

predisponentes para el desarrollo de un cuadro clínico u otro (Romero-Jiménez *et al.*, 2003). Así, dos estudios realizados en el mismo hospital de Sevilla en periodos próximos en el tiempo encontraron, por una parte, que la elevación de las enzimas hepáticas era el hallazgo de laboratorio más frecuente en casos de fiebre Q (Alarcón *et al.*, 2003) y que *C. burnetii* era el principal causante de neumonías atípicas en el hospital (Álvarez-Gutiérrez *et al.*, 2001). Entre las observaciones más recientes relacionadas con esta peculiar distribución geográfica de las manifestaciones clínicas y sus posibles explicaciones, cabe citar un trabajo (González-Barrio *et al.*, 2016b) en el que se sugiere la posible implicación de un ciclo silvestre entre garrapatas y animales silvestres (ciervo común y conejo) y su transmisión a personas en las diferencias observadas en las manifestaciones clínicas en humanos dependiendo de la región geográfica en España. Algunas de las observaciones que sustentarían esta hipótesis son el hecho de que la mayoría de los genotipos aislados en dicho trabajo en pacientes con hepatitis pertenecían a los grupos VI y VII, que, a su vez fueron los dos genotipos observados en garrapatas de distintas especies, así como los más prevalentes en ciervos y conejos de la zona centro y sur de España (ambos reservorios de *C. burnetii* en nuestro país). Dado que en estas regiones la densidad de estas especies silvestres es mayor, podría favorecerse el mantenimiento y la transmisión de la enfermedad en las mismas, así como la multiplicación de garrapatas que parasitaran ambas especies hospedadoras y, por tanto, su infección, siendo así más probable la transmisión al hombre, lo que explicaría la coincidencia entre los genotipos aislados en personas, garrapatas, ciervos y conejos. A esta hipótesis también se sumaría el hecho de que el 8,7% de garrapatas de la especie *Hyalomma lusitanicum* recogidas en la zona central de España estaban infectadas con *C. burnetii* (Toledo *et al.*, 2009), a diferencia de otras especies de garrapatas en la zona norte que presentaron una baja o nula prevalencia (Barandika *et al.*, 2008).

Por otro lado, tampoco ha podido establecerse por el momento una relación entre la presentación clínica más frecuente y la vía de infección. El consumo de leche sin tratamiento térmico se considera una posible forma de adquisición de la enfermedad [si bien actualmente esto sigue siendo objeto de debate (EFSA, 2010; Gale *et al.*, 2015)] y algunos estudios apuntan a que la exposición al patógeno por la vía oral aumentaría la probabilidad de desarrollar una sintomatología hepática (La Scola *et al.*, 1997; Marrie *et al.*, 1996). Sin embargo, en España no se ha observado una asociación entre los casos de hepatitis y el consumo de productos lácteos no tratados térmicamente (Alarcón *et al.*, 2003; Domingo *et al.*, 1999).

La **estacionalidad** en la presentación de los casos es otro de los aspectos característicos de la fiebre Q en España y en Europa (EFSA, 2010; Maurin y Raoult, 1999), relacionándose con la época de partos de los rumiantes domésticos. Según los datos recogidos por la EFSA, en Europa son los meses comprendidos entre abril y agosto (EFSA y ECDC, 2013; 2015b; 2016) el periodo en el que se observa una mayor concentración de casos. En España, se ha observado que el periodo de mayor concentración de casos en líneas generales comprende los meses de marzo a junio (Maurin y Raoult, 1999), si bien se han detectado ciertas diferencias dependiendo de la región y la distribución de las parideras del ganado predominante en la región. Así, distintos trabajos han puesto de manifiesto una concentración de los casos principalmente en los meses de primavera y, en menor medida, en verano: de marzo a junio en Cataluña y Canarias (Espejo *et al.*, 2014), de abril a julio en Canarias [asociado en este caso a la época de paridera caprina, especie predominante en la región (Bolaños *et al.*, 2003b)], marzo y abril en Sevilla (Alarcón *et al.*, 2003) de marzo a mayo en Cataluña (Domingo *et al.*, 1999) y de marzo a julio en el País Vasco (Montejo-Baranda *et al.*, 1985). Sin embargo, también se han observado otros patrones estacionales en zonas donde la producción del ganado ovino es relevante, pudiendo asociarse al manejo específico de dicha especie en cada región. Así, algunos estudios en el País Vasco han señalado la primera mitad del año como el momento de mayor número de casos, época en las que tiene lugar el esquila y el movimiento a nuevos pastos (Montes *et al.*, 2006; Sanzo *et al.*, 1993). Por otro lado, otros autores describieron una concentración del 95% de los casos humanos entre los meses de enero y mayo en el País Vasco, relacionándolos con la paridera de ovino en la zona (desde diciembre a marzo-abril) (Sobradillo, 1986). Asimismo, en la Rioja la mayor concentración de casos se observaba durante los meses de noviembre a febrero, pudiendo asociarse a la concentración de partos ovinos dirigidos a la venta de cordero en la época de navidades (Espejo *et al.*, 2014). Una observación similar se realizó en Cataluña (Domingo *et al.*, 1999), donde una segunda agrupación de casos (menos importante que la observada en primavera) se detectó entre los meses de noviembre y diciembre.

### **2.8.3. Situación de la fiebre Q en humanos en las regiones de estudio de la presente tesis**

La comunidad autónoma de Madrid es considerada una zona endémica de fiebre Q (Pascual-Velasco, 1996). Si bien los datos al respecto en esta región son escasos, la información disponible pone de manifiesto la circulación del patógeno entre la población y la presencia de casos clínicos. Así, en una tesis doctoral (Hellín, 1990) se recogieron un

total de 258 casos en un solo hospital en un periodo de once años. Asimismo, un trabajo más reciente encontró un total de 54 casos desde 2001 hasta 2008 en el hospital Santa Sofía (Ruiz-Seco *et al.*, 2011). Por otro lado, también se han descrito brotes de fiebre Q en esta región, como es el ocurrido en 1987 que afectó a 25 cazadores (Hellín, 1990) o, más recientemente, el brote acaecido en marzo de 2004, que afectó a 22 personas y se asoció a la visita a una granja-escuela (Ríos-Martín *et al.*, 2006). Los estudios de seroprevalencia disponibles, aunque antiguos (ninguno de ellos es posterior al año 1990), han demostrado una amplia exposición de la población madrileña en general al patógeno, con prevalencias que oscilaron entre un 6,2 y un 34,5%, siendo esta más alta en zonas rurales, de acuerdo a lo observado en otras regiones (Tabla 9).

Respecto a la vecina comunidad autónoma de Castilla y León, y a pesar de la ausencia de trabajos que reflejen la situación global de toda la región, diversos estudios han puesto de manifiesto el contacto de la población humana con *C. burnetii* en varias provincias (Tabla 9). Así, se han detectado brotes de fiebre Q, como el ocurrido en 1992 en la provincia de Burgos en un grupo de 48 soldados que pernoctaron en un establo abandonado (Yáñez-Ortega, 1992), o el observado en 18 personas en San Leonardo de Yagüe (Soria), localidad que contaba con un censo ovino de más de 2500 cabezas y un 60% de seropositividad en dicha especie (Nebreda *et al.*, 2001). En lo que se refiere a casos clínicos esporádicos, en esta comunidad autónoma se dieron el 6,8% de los 234 casos de fiebre Q descritos por Téllez y colaboradores entre 1981 y 1985 (Téllez *et al.*, 1988). Asimismo, en un estudio realizado entre los años 2010 y 2014 se describieron 39 casos en un único hospital de Ávila (Otero, 2016), y en un estudio de casos y controles sobre pacientes con arteriosclerosis vascular del hospital de Burgos se observaron seroprevalencias de entre un 37,6% (en los controles) y un 51,2% (en los casos) (González-Quijada *et al.*, 2014). Finalmente, según los boletines sobre enfermedades de declaración obligatoria de Castilla y León, la media de casos humanos oficialmente declarados entre 2007 y 2014 fue de ocho casos por año (Portal de Salud de Castilla y León, 2017).

#### **2.8.4. Fiebre Q en rumiantes domésticos**

En España la Fiebre Q es una enfermedad de declaración obligatoria en los animales, regulada por la Ley 8/2003, por el Real Decreto 526/2014 y por la Orden ARM/831/2009 y sujeta a comunicación semestral (salvo en caso de aumentos bruscos de prevalencia, brotes importantes o detección en zonas indemnes, en cuyo caso la declaración ha de ser inmediata). La obligatoriedad y periodicidad de su comunicación son las mismas que

aplican para el resto de países de la Unión Europea, al estar esta enfermedad incluida en la lista única de enfermedades de declaración obligatoria en los animales de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) [si bien cabe citar que no lo está en la Directiva 82/894/CEE del Consejo relativa a la notificación de las enfermedades de los animales ni en su última modificación (la Decisión de la Comisión de 30 de julio de 2008)].

A pesar de ser una enfermedad de declaración obligatoria, la fiebre Q no está sujeta a programas de control en nuestro país, por lo que no se realizan análisis rutinarios oficiales en las poblaciones animales. Esto hace que el conocimiento referente a los niveles de infección y distribución geográfica de *C. burnetii* en las distintas especies de abasto sea limitado, existiendo muy pocos datos disponibles y un problema de falta de armonización en cuanto a la obtención de los mismos. Así, la mayor parte de la información existente se circunscribe principalmente a estudios de investigación publicados sobre el tema, como se expone en los siguientes apartados. En cualquier caso, cabe destacar que a pesar de que la información disponible es limitada, se ha descrito la exposición a *C. burnetii* en rumiantes domésticos en todas aquellas regiones donde se ha evaluado, en ocasiones con elevadas prevalencias.

#### **2.8.4.1. Distribución geográfica y prevalencias**

Una de las principales razones que suelen llevar a evaluar la presencia de esta enfermedad en los animales domésticos es precisamente la aparición de casos de enfermedad en el hombre en una región determinada. Por ello, la mayor parte de la información disponible sobre especies de abasto procede de zonas de España con elevada prevalencia y frecuente presencia de brotes en humanos, como el caso del País Vasco, u otras comunidades autónomas como Canarias o Madrid, no existiendo estudios sistemáticos en animales domésticos de muchas regiones españolas.

#### **Fiebre Q en ganado bovino**

En la Tabla 12 se recogen los trabajos más relevantes relativos a la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en ganado bovino en distintas regiones de España (a partir de muestras de suero o de leche en rebaños de aptitud láctea). La región en la que se han realizado más estudios es el País Vasco (5/14), al tratarse de una zona hiperendémica (Maurin y Raoult, 1999). A pesar de que tradicionalmente el ganado ovino es considerado como principal reservorio en la región, el ganado bovino está ampliamente distribuido por la misma y tiene un papel relevante, con censo de más de 200 000 cabezas censadas en mayo de 2016 (MAPAMA, 2017e), considerándose

reservorio secundario de la enfermedad junto con el ganado caprino (García-Pérez *et al.*, 2009; Ruiz-Fons *et al.*, 2010).

**Tabla 12.** Resumen de los principales trabajos basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en ganado bovino en distintas regiones de España. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

Región	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Año de estudio	Referencia
	Individual (nº de muestras de suero analizadas)	Nivel de rebaño (nº de rebaños analizados)			
Vizcaya	*(2670) 2009-10	6,8 en suero 2009-10 8,7 en suero 2011-12		2009-10	
Solo rebaños de leche en intensivo	*(1410) 2011-12	60,6 en 2009-10 en tanque de leche 48,9 en 2011-12 en tanque de leche (178)	ELISA	2011-12	(Piñero <i>et al.</i> , 2014b)
Vizcaya					
Solo rebaños de leche en intensivo	6,7 (1306)	50 en suero 66,9 en tanque de leche (178)	ELISA	2009-10	(Astobiza <i>et al.</i> , 2012a)
País Vasco					
Solo rebaños de carne en semi extensivo	7 (626)	43 en suero (11)	ELISA	2007-08	(Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2010)
Vizcaya (localidad de Arceniaga)	3,4 (557)	-	FC	1985	(Alayo-Arrugaeta, 1986 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
País vasco/Navarra	1,8 (1789)	-	FC	1981-85	(Muñiz, 1986 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
	10,67 (253)	50 en suero (18)	ELISA	2011	(Valcárcel <i>et al.</i> , 2011)
	5,6 (106)	-	ELISA	2007-08	(Carballedo, 2008 revisado por Astobiza, 2012)
Madrid			FC		
	17,7 (17)	75 en suero (4)	IFI	1989	(Téllez <i>et al.</i> , 1989)
	66,9 (106)	-	IFI	1985	(Palau, 1989)
Parque Natural de la Serranía de Cuenca	0,24 (407)	-	ELISA	2003-13	(Candela <i>et al.</i> , 2016)
Cádiz	39 (79)	-	ELISA	2004-05	(Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2008)
Gran Canaria	12,12 (147)	-	ELISA	2007-08	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2010b)
Galicia	22,10 (ND)	ND	ELISA	ND	(Saegerman <i>et al.</i> , 2016)
Cataluña					
Solo rebaños de leche	-	74 en suero (90)	ELISA	2010	(Nogareda <i>et al.</i> , 2013)
Gerona	10,9 (0-61) (708)	-	FC	1988	(Ausina, 1988 revisado por Pascual-Velasco, 1996)

Región	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Año de estudio	Referencia
	Individual (nº de muestras de suero analizadas)	Nivel de rebaño (nº de rebaños analizados)			
Valladolid	7,9 (554)	-	FC/IFI	1991	(Palenzuela, 1991 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
Huesca	1,1 (362)	-	FC	1990	(González Sinde, 1995 revisado por Pascual-Velasco, 1996)

Los resultados obtenidos en los distintos estudios muestran un rango de seroprevalencias muy amplio. Si se tienen en cuenta únicamente los trabajos realizados en los últimos 15 años, los resultados oscilan entre un 6% y un 39% a nivel individual (con una media del 13%), dependiendo del estudio, de la zona geográfica y de la aptitud productiva de los animales. Este rango de prevalencias estaría dentro de los resultados observados en distintos países europeos en los últimos años, oscilando entre un 0% en Noruega (Kampen *et al.*, 2012) y un 38% en Hungría (Gyuranecz *et al.*, 2012a), con resultados también variables dependiendo de la región y el estudio [8,2% en Suecia (Nusinovici *et al.*, 2015a), 25-39,8% en Dinamarca (Angen *et al.*, 2011; Paul *et al.*, 2014), 10-12,5% en Bélgica (Naesens *et al.*, 2012; Vangeel *et al.*, 2012) y 16% en los Países Bajos (Muskens *et al.*, 2011a)].

Asimismo, las prevalencias de anticuerpos detectadas en España en rebaño oscilan entre un 6,8 y un 74% (Tabla 12), estando también dentro del amplio rango observado en Europa [entre un 3,6% en Dinamarca (Paul *et al.*, 2014) y un 81,6% en Holanda (Muskens *et al.*, 2011a)], si bien en los últimos años los valores descritos son más elevados, y oscilando entre el 40% y el 70% en países como Portugal [46%-61% (Anastacio *et al.*, 2016; Pimenta *et al.*, 2015)], Francia [69% (Pandit *et al.*, 2016)], Irlanda [37,9% ((Ryan *et al.*, 2010)], Dinamarca [59%-79% (Agger y Paul, 2014)] y Bélgica [57% (Vangeel *et al.*, 2012)]. Los resultados observados en España en animales y en rebaños son también comparables a los descritos en otros continentes, con valores medios de alrededor del 20% individual y 37,75% de rebaño (Guatteo *et al.*, 2010).

Más escasos aún son los estudios de prevalencias basados en la detección directa de *C. burnetii* mediante **PCR** a partir de muestras de tanque de leche, realizados únicamente en la región hiperendémica de Vizcaya. Dichos trabajos describieron valores que oscilaron entre un 42,6% y un 59,6% dependiendo del año y del estudio (Astobiza *et al.*, 2012a; Piñero *et al.*, 2014b), valores similares a las prevalencias de anticuerpos en rebaño observadas en la región (Tabla 12).



A la vista de los resultados disponibles, cabe destacar la ausencia de información sobre la distribución y prevalencias de fiebre Q en algunas de las comunidades autónomas donde la producción de ganado bovino tiene una gran relevancia nacional. Este es el caso de Castilla y León, Extremadura o Andalucía, posicionadas en el primer, tercer y quinto lugar, respectivamente, en cuanto a número de cabezas de bovino en España, con cifras de ~2,1, 1,9 y 1,3 millones de cabezas en el año 2016 según los datos más recientes disponibles publicados en las encuestas ganaderas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2017e).

En esta misma línea, también son limitados los estudios en los que se evalúan los factores de riesgo asociados a la detección de mayores prevalencias en España en el ganado bovino, habiéndose llevado a cabo estos exclusivamente en la comunidad autónoma del País Vasco con resultados en consonancia con lo descrito en otros países, como se desarrolla a continuación.

En primer lugar, la **aptitud productiva** (láctea vs. cárnica) y el **tipo de manejo** (intensivo vs. extensivo), dos factores íntimamente ligados entre sí, han sido identificados en repetidas ocasiones como aspectos íntimamente relacionados con la prevalencia de fiebre Q observada en el ganado bovino, y son numerosos los estudios en los que se han observado niveles de seroprevalencia significativamente mayores en rebaños de aptitud láctea frente a los de carne (Kim *et al.*, 2005; McCaughey *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2010; Vangeel *et al.*, 2012). Este hecho se asocia principalmente al manejo intensivo de las explotaciones de leche, que favorece la transmisión y el mantenimiento de la infección en el rebaño (Capuano *et al.*, 2001). Sin embargo, en los dos estudios realizados en la provincia de Vizcaya sobre rebaños de leche con manejo intensivo y semi-intensivo y rebaños de carne de tipo extensivo, se observaron prevalencias de rebaño e individuales similares (Tabla 12) (Astobiza *et al.*, 2012a; Ruiz-Fons *et al.*, 2010), si bien la prevalencia intra-rebaño observada fue superior en el caso de explotaciones de leche respecto a las de carne (13,5% de los rebaños de leche estudiados presentaban una prevalencia intra-rebaño superior al 20% frente a un 7,1% en los de carne).

En cuanto a la **edad** de los animales, otro de los factores típicamente asociados con una mayor prevalencia de fiebre Q (Muskens *et al.*, 2011a; Paul *et al.*, 2014), en los trabajos de Astobiza y colaboradores (Astobiza *et al.*, 2012a) y Piñero y colaboradores (Piñero *et al.*, 2014b) se observaron niveles más altos de positividad en animales de mayor edad en rebaños de aptitud láctea. Sin embargo, en el único trabajo en el que se ha evaluado hasta la fecha este aspecto en rebaños de carne en España (Ruiz-Fons *et al.*, 2010), no

se observó asociación entre ambas variables, como ha sido previamente descrito por otros autores (Ryan *et al.*, 2011b).

La presencia de **pequeños rumiantes** en las explotaciones de bovino también ha sido identificada como un factor asociado a un mayor nivel de seroprevalencia intra-rebaño en el único trabajo en el que se ha evaluado este aspecto en el País Vasco (Piñero *et al.*, 2014b). Este hallazgo coincide con lo observado previamente (Taurel *et al.*, 2011), sugiriendo una vez más el papel del ganado ovino como principal reservorio y transmisor de *C. burnetii* en la citada región.

El **tamaño de rebaño** también se ha asociado con mayores niveles de seroprevalencia en los rebaños de aptitud láctea de la provincia de Vizcaya (Piñero *et al.*, 2014b), habiéndose observado que los rebaños positivos en tanque de leche tanto a PCR como a ELISA y con al menos un animal seropositivo, tenían un censo significativamente mayor que aquellas explotaciones negativas a las tres citadas pruebas diagnósticas o bien positivas en solo una o dos de ellas, en la misma línea de lo descrito en otros trabajos (Anastacio *et al.*, 2016; Paul *et al.*, 2014). Sin embargo, en un trabajo anterior (Astobiza *et al.*, 2012a) en el mismo segmento poblacional (los rebaños de leche de Vizcaya) no se observó tal asociación.

En cuanto al efecto de posibles **factores geográficos y ambientales** asociados a la detección de prevalencias de rebaño más elevadas, en España solo se ha publicado un estudio (Nogareda *et al.*, 2013), analizando datos de prevalencias de anticuerpos en rebaños de leche en Cataluña. Dicho trabajo se basó en la aplicación de herramientas de modelización de nicho ecológico (*ecological niche modeling*) de máxima entropía para evaluar las variables bioclimáticas (asociadas a la pluviometría y la temperatura) relacionadas con la detección de rebaños positivos. El trabajo identificó el nivel de precipitaciones en el mes más frío del año y la elevación del terreno como principales variables predictoras de un mayor riesgo de detección de rebaños positivos.

Finalmente, cabe destacar que la asociación entre la aparición de **fallos reproductivos** y los niveles de seroprevalencia en granja, aspecto de la enfermedad no totalmente esclarecido en el caso del bovino, ha sido también evaluada (Piñero *et al.*, 2014b), no observándose una asociación significativa entre los niveles de seroprevalencia y la presencia o no de problemas reproductivos en la explotación. Esta ausencia de asociación ha sido observada antes en áreas de alta prevalencia (Muskens *et al.*, 2011a), poniendo de manifiesto el hecho de que la circulación de *C. burnetii* en un rebaño bovino puede no

causar problemas reproductivos aparentes (Muskens *et al.*, 2011b; Muskens *et al.*, 2012). Por el contrario, estudios más recientes (también realizados en rebaños bovinos en España) han demostrado la influencia de la infección por *C. burnetii* en determinados parámetros reproductivos (García-Ispierto *et al.*, 2010b; García-Ispierto *et al.*, 2013).

Por último, en lo que respecta a los **genotipos** de *C. burnetii* identificados en el ganado bovino en nuestro país, y a pesar de la escasez de trabajos al respecto, se han llegado a identificar 18 diferentes en aislados procedentes del País Vasco mediante la técnica MLVA (Astobiza *et al.*, 2012b; Jado *et al.*, 2012; Piñero *et al.*, 2015), dos de ellos previamente descritos en otros países europeos y en Estados Unidos (Sulyok *et al.*, 2014; Tilburg *et al.*, 2012). Además, solo el 11% de dichos genotipos identificados en bovino en España estaban relacionados filogenéticamente de forma estrecha con genotipos humanos, lo que podría sugerir el limitado papel del ganado bovino en la transmisión de *C. burnetii* a humanos en dicha región (Piñero *et al.*, 2015), como también se ha descrito en Estados Unidos (Kersh *et al.*, 2016). En esta misma línea, en un estudio de caracterización molecular realizado en aislados de *C. burnetii* procedentes de muestras ambientales y clínicas de distintas regiones de España (basado en una PCR múltiple de ocho genes y una hibridación con sondas específicas), se observó que el único genotipo detectado en bovino no se identificó en ninguna muestra clínica humana (Jado *et al.*, 2012).

### Fiebre Q en ganado ovino

En la Tabla 13 se recogen los principales trabajos sobre prevalencias de anticuerpos frente a fiebre Q en ganado ovino en nuestro país entre los años 1985 y 2014, que son en líneas generales más altos que los descritos para bovino (Tabla 12). Los valores observados en distintas regiones de España en ovino están dentro del rango de prevalencias detectado en Europa, donde si bien en determinados países los niveles son bajos [2% individual y 15% en rebaño en Holanda (Van den Brom *et al.*, 2013a), 0,7% a nivel individual y 8,4% a nivel de rebaño en Irlanda (Ryan *et al.*, 2011a)] o incluso inexistentes [0% en Noruega (Kampen *et al.*, 2012)], en gran parte de los países evaluados las prevalencias oscilan entre un 9% y un 20% individualmente y entre un 38% a un 100% en rebaño. Así, cabe citar como ejemplos las prevalencias observadas en países como Portugal [9% individualmente, 38% en rebaño (Anastacio *et al.*, 2013)], Italia [16,3% individualmente y del 38,7% en rebaño, (Rizzo *et al.*, 2016)], Reino Unido [12% individualmente, 62% en rebaño (McCaughey *et al.*, 2009)] o Grecia [(10% individualmente y 100% en rebaño (Pape *et al.*, 2009)].

En ciertas regiones de España, como el País Vasco, el ganado ovino se ha postulado como la principal fuente de infección de *C. burnetii* para el hombre (García-Pérez *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2011; Ruiz-Fons *et al.*, 2010). Así, son dos los aspectos que refuerzan la hipótesis sobre el papel epidemiológico de las ovejas en la fiebre Q en nuestro país. Por un lado, está la relación directa entre una mayor tasa de casos hospitalarios humanos de fiebre Q y un mayor porcentaje de rebaños positivos. Así, según un estudio realizado en 2006 en el País Vasco se observó que Vizcaya, la provincia con mayor tasa de casos hospitalarios registrados en 2005 (4,2 casos por cada 100 000 habitantes, frente a 2,7 casos en Álava y 1,8 en Guipúzcoa) era, asimismo, la provincia de esta región hiperendémica que presentaba el mayor porcentaje de rebaños ovinos seropositivos (un 77%, frente a un 63% en Guipúzcoa y un 30% en Álava) (ELIKA, 2007). Por otro lado, el segundo factor sería la existencia de genotipos de *C. burnetii* compartidos entre la especie ovina y el hombre en aislados procedente de distintas regiones de España (Jado *et al.*, 2012) Sin embargo, la información disponible hasta la fecha a este respecto es limitada, siendo necesario la realización de más estudios que permitan determinar con mayor precisión la significación epidemiológica de los hallazgos obtenidos hasta la fecha.

De forma similar a lo anteriormente descrito para el caso del ganado bovino, la mayor parte de los estudios de seroprevalencia en ovejas han sido llevados a cabo en el País Vasco que, como se ha mencionado previamente, es considerada una zona hiperendémica de fiebre Q a nivel mundial (Maurin y Raoult, 1999). El estudio exhaustivo de la distribución de la infección en esta especie animal vendría a explicarse por dos aspectos relacionados entre sí: (i) la relevancia de la enfermedad en humanos en dicha región de España, que ha fomentado la realización de estudios para identificar las posibles fuentes de infección para el hombre y (ii) la importancia de la producción del ganado ovino en el País Vasco, el rumiante doméstico con mayor censo de la región [más de 259 000 cabezas censadas en 2015, por encima del bovino y el caprino (MAPAMA, 2017a)].

Las prevalencias observadas en el País Vasco mediante la detección de anticuerpos en muestras de suero y de tanque de leche en los últimos diez años muestran una amplia exposición al patógeno en el ganado ovino, además de una tendencia creciente (Tabla 13). Así, los valores oscilan entre el 7 y el 13% individualmente y en torno al 70% en rebaño entre los años 2007 y 2014 (Tabla 13). En cualquier caso, estos altos niveles de seroprevalencia no se circunscriben solo a esta región del norte del país, ya que las prevalencias individuales superan el 20% en la serranía de Cuenca (Candela *et al.*, 2016),

el 30% en Gran Canaria, y se han descrito incluso en un 83% en la Comunidad de Madrid y en un 92% en muestras de matadero procedentes de Badajoz y Córdoba (Tabla 13).

Por otro lado, cabe citar el hecho de que España es uno de los pocos países en los que se ha evaluado la presencia de *C. burnetii* mediante **PCR a partir de muestras de tanque de leche** en ganado ovino en un único estudio llevado a cabo en el País Vasco (García-Pérez *et al.*, 2009). En él se observó un 22% de rebaños positivos de un total de 154 muestreados. Este grado de prevalencia de rebaño en ganado ovino es el más alto descrito hasta la fecha en Europa, en contraste con un 6,3% en rebaños de Portugal (Anastacio *et al.*, 2016) y del 5,7% en Irán (Rahimi *et al.*, 2011), y la ausencia de positivos en estudios realizados en Suiza (Fretz *et al.*, 2007) y Holanda (van den Brom *et al.*, 2012a). No obstante, cabe citar que estas prevalencias observadas en el ganado ovino del País Vasco mediante esta aproximación (PCR en tanque de leche), son sensiblemente más bajas que las encontradas en dos estudios del mismo tipo realizados en rebaños bovinos en la provincia de Vizcaya, donde se observó un porcentaje de rebaños positivos del 42,6% (Astobiza *et al.*, 2012a) y del 59,6% (Piñero *et al.*, 2014b), respectivamente. Sin embargo, en líneas generales los niveles de seroprevalencia observados en la especie bovina son más altos que los detectados en el ganado ovino (Tablas 12 y 13). Este hallazgo podría venir determinado por los distintos patrones de excreción de *C. burnetii* dependiendo de la especie, siendo la leche una vía más importante en el caso del ganado bovino que en el ovino (Guatteo *et al.*, 2012; Rodolakis, 2009).

En cuanto a la influencia de la infección por *C. burnetii* en la **producción ovina** española, dicha bacteria fue identificada en dos trabajos como el segundo-tercer patógeno más frecuentemente asociado a abortos ovinos tras *Chlamydia abortus* y *Salmonella enterica* serovariedad Abortusovis (Esnal, 2010; Oporto *et al.*, 2006), identificándose que 135 de los 230 de los abortos en pequeños rumiantes referidos en el trabajo de Esnal y colaboradores tuvieron lugar en Castilla y León. Así, en el estudio de Oporto y colaboradores se identificó *C. burnetii* en el 9% los casos mediante PCR, porcentaje similar al 8% observado en otro estudio basado en inmunohistoquímica (Villa, 2002). Estos porcentajes están en consonancia con un estudio realizado en la región de Cerdeña en Italia, donde se observó un 11% de abortos positivos a *C. burnetii* mediante PCR (Masala *et al.*, 2007), pero por debajo de los señalados en un estudio reciente en Hungría, donde el 47,6% de las muestras de placenta procedentes de abortos ovinos eran positivas mediante PCR, y en el que el 14,3% de los casos estudiados se confirmó que la causa de los mismos fue la infección por *C. burnetii* (resultados positivos a PCR e inmunohistoquímica, así como la presencia de placentitis observada por histología).

(Kreizinger *et al.*, 2015). Sin embargo, en otro estudio (Fernández, 2012) se detectó la presencia de *C. burnetii* mediante inmunohistoquímica únicamente en un 2,7% del total de abortos ovinos en Castilla y León entre los años 2004 y 2010. Este porcentaje estaría en la línea de los valores observados en los escasos estudios publicados a este respecto en otros países, que oscilan entre el 0,1% y el 4% de abortos positivos empleando métodos inmunohistoquímicos o de detección por PCR (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002; Kirkbride, 1993b; Plagemann, 1989; Rahman *et al.*, 2016; Szeredi *et al.*, 2006; van den Brom *et al.*, 2012a).

**Tabla 13.** Resumen de los principales trabajos sobre prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en ganado ovino en distintas regiones de España. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible. BTM: *bulk tank milk*.

Región	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Año de estudio	Referencia
	Individual (nº de muestras analizadas)	Rebaño (nº de rebaños analizados)			
País Vasco	12,7 (251)	75 (12)	ELISA	2010-14	(Fernández-Aguilar <i>et al.</i> , 2016)
País Vasco	11,8 (1379)	74 (46)	ELISA FC	2007-08	(Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2010)
País Vasco. Rebaños de leche (raza Latxa)	8,9 (1101)	67,6 (34)	ELISA	2006	(García-Pérez <i>et al.</i> , 2009)
País Vasco. Rebaños de leche (raza Latxa)	-	40,3 (154) en tanque de leche Suero: 2,8 en rebaños BTM negativos 15,2 en rebaños BTM positivos débiles 34,4 en rebaños BTM positivos	ELISA	2005	(Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2011)
País Vasco. Rebaños de leche (raza Latxa)	6,4 (1500)	40 (50)	FC	1987	(Sáez de Ocariz, 1987 revisado por ELIKA, 2007)
País Vasco/Navarra	2,4 (1273)	-	FC	1981-84	(Muñiz, 1986 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
País Vasco. Vizcaya	1,7 (3090)	-	FC	1985	(Alayo Arrugaeta, 1986 revisado por Pascual- Velasco, 1996)
Madrid	33,1 (360)	83,3 (12)	ELISA	2007-09	(Valcárcel <i>et al.</i> , 2011)

Región	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Año de estudio	Referencia
	Individual (nº de muestras analizadas)	Rebaño (nº de rebaños analizados)			
Madrid	No evaluable (11)	66,6 (3)	FC IFI	1989	(Téllez <i>et al.</i> , 1989)
Parque Natural de la Serranía de Cuenca	22,5 (3739)	-	ELISA	2003-13	(Candela <i>et al.</i> , 2016)
Badajoz y Córdoba	13,9 (209)	91,7 (12)	ELISA	2011	(Astorga <i>et al.</i> , 2014)
Gran Canaria	31,7 (369)	-	ELISA	ND	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2010a)
Lanzarote	8,7%	-	FC	1991	(Pascual-Velasco, 1994)
Galicia	3,9 (204)	18,2 (44)	ELISA	2010	(Díaz <i>et al.</i> , 2014)
Asturias	3,5-4,5	-	ND	ND	(Espí, 2001 revisado por Valcárcel <i>et al.</i> , 2011)
Zaragoza y ribera del Ebro	8,4 (369)	-	FC	1992	(Sanz, 1994)
Huesca	18,8 (329)	-	FC	1990	(González Sinde, 1991 revisado por Pascual-Velasco, 1996)
Valencia (rebaños con fallos reproductivos)	17,8 (135)	-	IFI	1999-2001	(Villa, 2002)

### Fiebre Q en ganado caprino

El ganado caprino es la especie de rumiante doméstico en la que hay información más limitada sobre fiebre Q en España. Este hecho está asociado a la menor importancia socioeconómica de la producción caprina, reflejada en un menor censo [aproximadamente tres millones de cabezas de caprino censadas 2016, frente a casi 16,8 millones de ovino y 9,5 millones de bovino (MAPAMA, 2017e; 2017g)]. Sin embargo, España presenta una destacada posición como productor de ganado caprino en la Unión Europea, habiendo sido en 2015 como el segundo país en número de animales, por detrás de Grecia (MAPAMA, 2017c), y en producción de leche, por detrás de Francia (MAPAMA, 2017f).

En lo que se refiere a los niveles de **prevalencias de anticuerpos** [y al contrario de lo que ocurría en el caso del ganado bovino y ovino, donde gran parte de los estudios habían sido llevados a cabo en el País Vasco (Tablas 12 y 13)], la región más evaluada hasta la fecha han sido las Islas Canarias (Tabla 14), zona hiperendémica a fiebre Q en humanos, ya que la especie de rumiante doméstico con mayor importancia es la caprina. Las seroprevalencias observadas en el ganado caprino en el archipiélago canario son más altas que las de ovejas y vacas [un 60% de seroprevalencia individual en caprino frente a un 33% en ovino y un 12% en bovino (Rodríguez *et al.*, 2010b)]. Este resultado vendría a

sustentar la hipótesis de una mayor relevancia de esta especie en el mantenimiento de la enfermedad en la región.

La seroprevalencia en otras regiones de España es menor, con excepción de un estudio llevado a cabo en la Comunidad de Madrid en el año 1985 donde se detectó un 76% de positivos individualmente (Téllez *et al.*, 1989), si bien solo se analizaron 43 animales. Por el contrario, un estudio más reciente en la misma zona describió valores más reducidos (en torno al 28%) en una muestra de 210 animales (Valcárcel *et al.*, 2011). En cualquier caso, la Comunidad de Madrid constituye también una anomalía con respecto al conjunto de España ya que las prevalencias individuales en caprino son mayores a las observadas en bovino (17,6%) (Valcárcel *et al.*, 2011). Sin embargo, las prevalencias descritas en las Islas Canarias y en Madrid, entre el 16% y el 76% individual y hasta del 92% en rebaño en el caso de Madrid, dependiendo del estudio (Tabla 14), estarían dentro del rango de prevalencias observado en ciertos países como Estados Unidos [42% individual (McQuiston e hijos, 2002)], Irán [66% individual, 100% rebaño (Khalili y Sakhaee, 2009)], Chipre [48% individual (Psaroulaki *et al.*, 2006)], Croacia [31% individual (Morovic *et al.*, 2009)], Holanda entre 2009 y 2010 [durante el brote descrito en humanos asociado a cabras (21% individual, 47% rebaño) (Schimmer *et al.*, 2011)] o Canadá [13% individual (Hatchette *et al.*, 2002)]. Los niveles de seroprevalencia más bajos observados en el País Vasco, de entre el 5 y el 9% individual (Tabla 14) también son comparables a los observados en otros países como Italia [13% individual (Masala *et al.*, 2007)], Reino Unido [9% individual (McCaughey *et al.*, 2009)] o Grecia [7% (Pape *et al.*, 2009)].

En cualquier caso, y pese a la limitada información disponible respecto a las seroprevalencias de la enfermedad en otras regiones de España, diversos trabajos han documentado la presencia de **abortos caprinos asociados a *C. burnetii*** en varias comunidades autónomas, incluyendo Castilla y León, Castilla-La Mancha, Aragón, Valencia y Murcia, entre otras (Esnal, 2010; Jado *et al.*, 2012; Villa, 2002), lo que refuerza la hipótesis de la circulación del patógeno en ganado caprino en nuestro país.

Por otro lado, y en relación con el posible papel del ganado caprino en la **transmisión de la fiebre Q al hombre**, se han detectado genotipos compartidos entre aislados procedentes de casos clínicos humanos y abortos caprinos de distintas regiones de España (Jado *et al.*, 2012), si bien la información disponible a este respecto es limitada para sacar conclusiones que permitan establecer una asociación directa entre los casos humanos y la infección en el ganado caprino.



Por otra parte, en cuando a la información relativa al **impacto en la producción caprina** que la infección por este patógeno puede tener en nuestro país, esta es muy escasa. A este respecto, cabe citar únicamente dos estudios. En uno de ellos se detectó la presencia de *C. burnetii* mediante inmunohistoquímica en el 11% de los abortos caprinos estudiados (12/112) (Villa, 2002), mientras que en otro trabajo llevado a cabo en 230 brotes de abortos de pequeños rumiantes se identificó a *C. burnetii* como el segundo patógeno más prevalente, detectándose en un 16% de los brotes, si bien únicamente 16 de los mismos procedían de explotaciones de cabras (Esnal, 2010). En cualquier caso, estos porcentajes estarían en la línea de los resultados observados en estudios realizados en otros países, en los que el porcentaje de abortos asociados a este patógeno estaría en torno al 10% en el caso de Suiza (Chanton-Greutmann *et al.*, 2002) y del 19% en California (Moeller, 2001) claramente más altos a los observados en ovino a nivel mundial, como se ha descrito en la anterior sección, si bien también se han descrito porcentajes más bajos, como el 3,4% observado recientemente en Egipto (Abdel-Moein y Hamza, 2017).

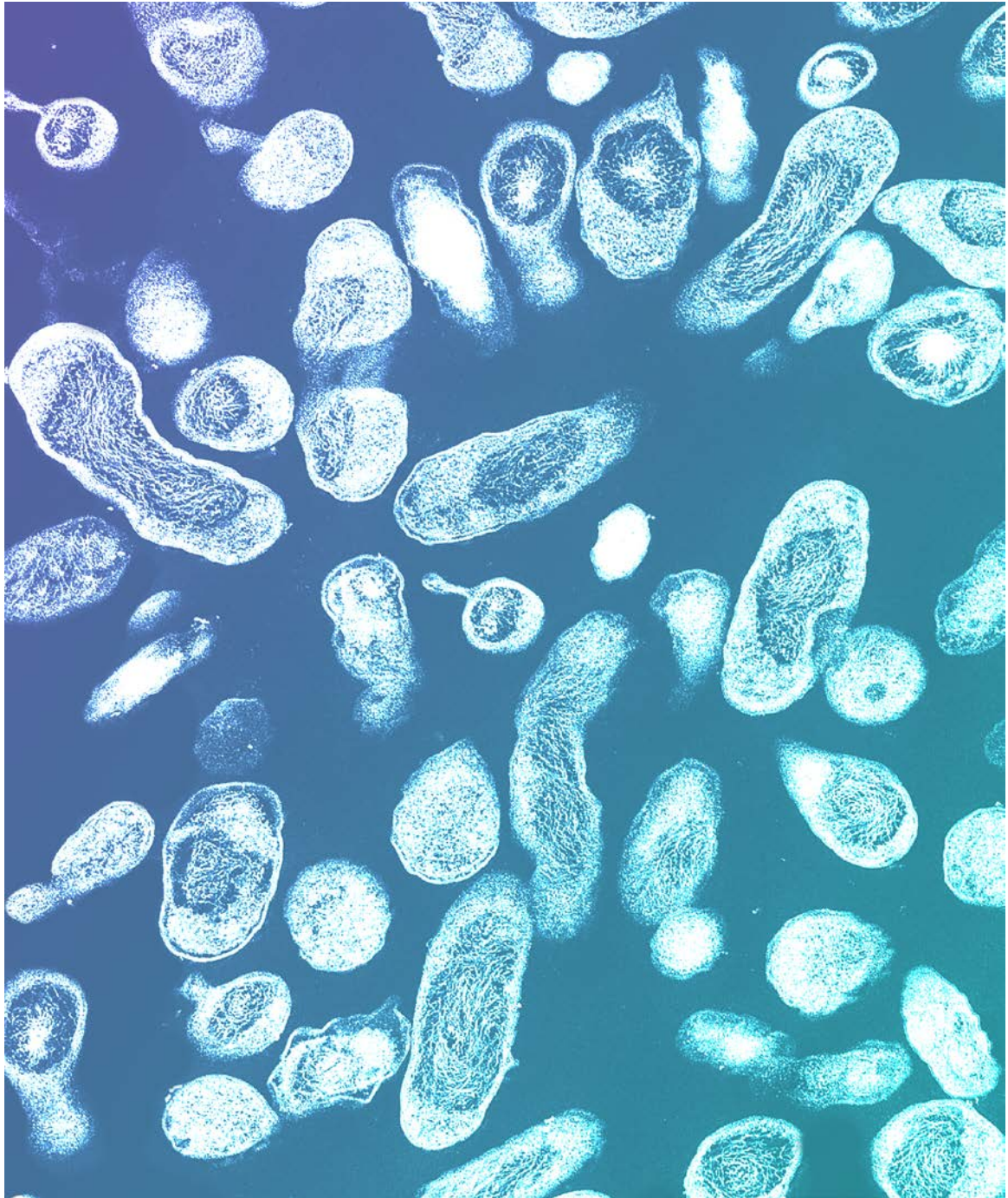
Finalmente, en España no se ha publicado ningún estudio hasta la fecha en el que se evalúe la presencia de la bacteria en leche, bien sea de forma individual o en tanque.

**Tabla 14.** Resumen de los principales trabajos sobre prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en ganado caprino en distintas regiones de España. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

Región	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Año de estudio	Referencia
	Individual (nº de muestras analizadas)	Rebaño (nº de rebaños analizados)			
País Vasco	8,7 (115)	45 (11)	ELISA	2007-08	(Ruiz-Fons <i>et al.</i> , 2010)
País Vasco/Navarra	4,8 (1117)	-	FC	1981-84	(Muñiz, 1986)
Madrid	28,6 (210)	92,9 (14)	ELISA	2007-09	(Valcárcel <i>et al.</i> , 2011)
Madrid	76,8 (43)	100 (2)	IFI	1985	(Téllez <i>et al.</i> , 1989)
Gran Canaria	60,4 (733)	-	FC	ND	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2010b)
Canarias (región sin especificar, cabras con abortos)	37,5 (1158)	-	ELISA	1995	(Gómez-Calcerrada, 1995)
Lanzarote	32,7 (2285)	-	FC	1991	(Pascual-Velasco, 1994)
La Palma	21,2 (132)	-	IFI	1997	(Solá-Graffigna, 1997 revisado por Velasco, 2010)
La Gomera	16 (94)	-	IFI	1997	(Solá-Graffigna, 1997 revisado por Velasco, 2010)

Región	% prevalencia de anticuerpos		Técnica analítica	Año de estudio	Referencia
	Individual (nº de muestras analizadas)	Rebaño (nº de rebaños analizados)			
Valencia (rebaños con fallos reproductivos)	27,5 (40)	-	IFI	1999-2001	(Villa, 2002)





## **ORGANIZACIÓN Y OBJETIVOS**



### 3. ORGANIZACIÓN Y OBJETIVOS

La fiebre Q, cuyo agente etiológico es la bacteria *C. burnetii*, es una zoonosis que presenta una amplia distribución geográfica y cuyos principales reservorios en la naturaleza son los rumiantes domésticos, que son también la principal fuente de infección para el hombre, y en los que la principal manifestación clínica es el aborto. A pesar de que la enfermedad se conoce desde la década de los años 30, tradicionalmente se había considerado que *C. burnetii* presentaba un impacto menor tanto en producción animal como en salud pública, por lo que la fiebre Q ha sido tradicionalmente una enfermedad desatendida. Sin embargo, la percepción sobre esta enfermedad ha cambiado en la última década, debido al incremento del número de casos humanos comunicados en ocasiones en forma de importantes brotes, normalmente asociados a rumiantes domésticos, que han llegado a afectar a miles de personas. Si bien la enfermedad es a menudo auto limitante, puede producir cuadros crónicos altamente invalidantes, así como la muerte a causa de las complicaciones propias de algunas de sus presentaciones clínicas más graves. Por todo ello, en los últimos años se ha generado un interés creciente por la enfermedad tanto por parte de los organismos públicos como por la comunidad científica y es actualmente una enfermedad de declaración obligatoria tanto en animales como en el hombre en gran número de países. Sin embargo, aún siguen existiendo numerosas incógnitas respecto a distintos aspectos de su epidemiología, así como sobre su distribución en distintas regiones del mundo.

En España la enfermedad se considera endémica, existiendo regiones como el País Vasco y Canarias donde han tenido lugar numerosos casos y brotes humanos a lo largo de los años, asociados al ganado ovino y caprino, respectivamente. Sin embargo, los estudios sobre esta enfermedad llevados a cabo en nuestro país son escasos y en muchas regiones se desconoce en gran medida la situación de la fiebre Q en rumiantes domésticos, a pesar de que se haya descrito la presencia de la enfermedad en personas. Una de estas regiones es la meseta central, región de importante producción ganadera donde la información sobre la fiebre Q en rumiantes domésticos es muy limitada. En este contexto, el **objetivo general** de la presente memoria de tesis es determinar la situación epidemiológica de la fiebre Q en rumiantes domésticos en las comunidades autónomas de Castilla y León y Madrid, evaluando si los niveles de seroprevalencia en especies susceptibles de la región, así como los factores de riesgo asociados con esa prevalencia,

son similares en las dos comunidades autónomas incluidas y a los descritos en otras regiones de España y el mundo.

Para la consecución de este objetivo general se han llevado a cabo tres estudios, cada uno de los cuales centrado en la evaluación de distintos aspectos de la epidemiología de la fiebre Q en una comunidad autónoma y especie de rumiante doméstico concreta:

**Estudio 1:** Determinación de los niveles de seroprevalencia, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado ovino de Castilla y León.

**Estudio 2:** Determinación de los niveles de seroprevalencia, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado bovino de la Comunidad de Madrid.

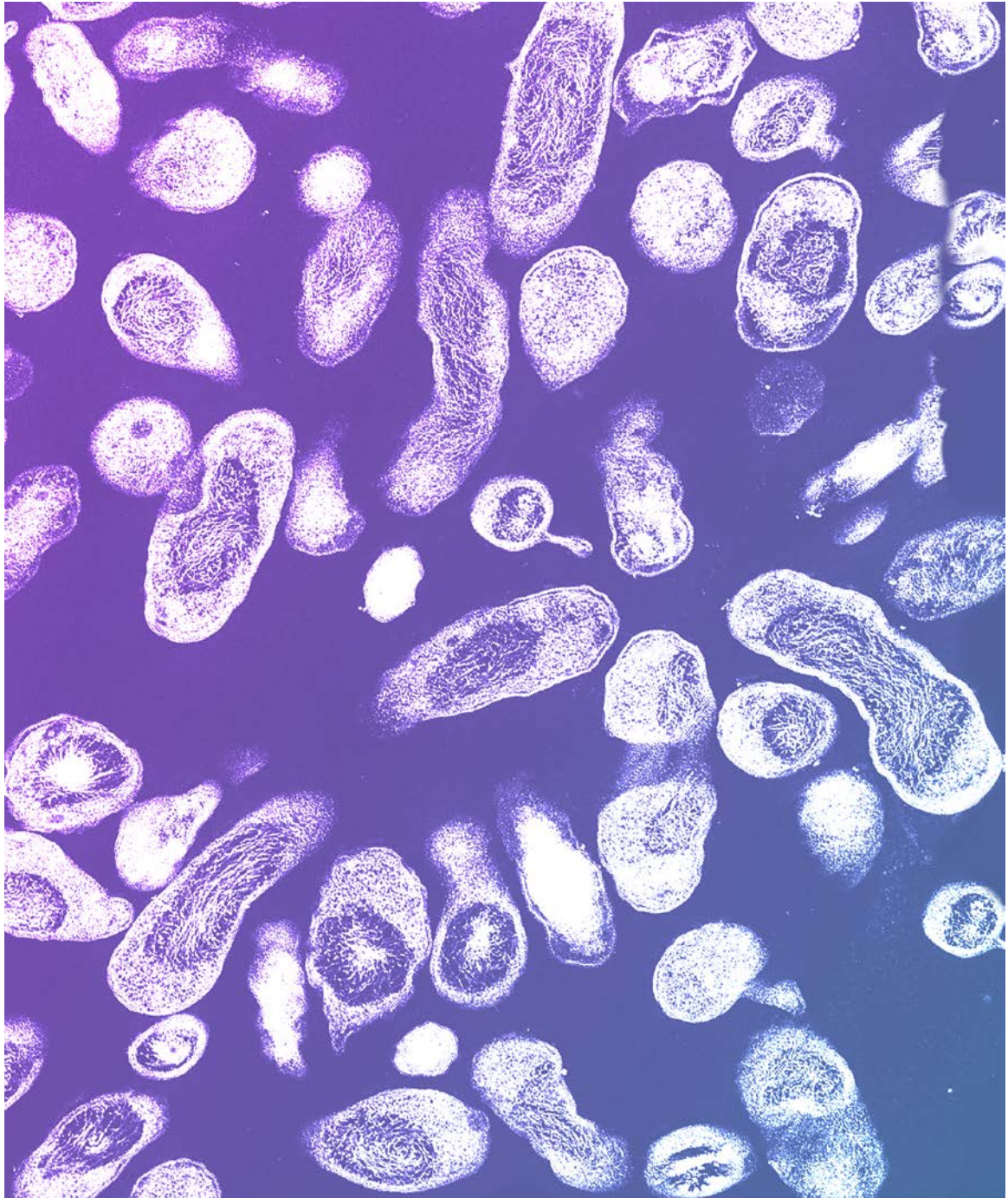
**Estudio 3:** Determinación de los niveles de seroprevalencia, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid.

Así, los subobjetivos específicos de cada uno de los estudios, comunes en los tres, pero aplicados en cada caso a la especie y región de estudio correspondiente, se exponen a continuación:

**Subobjetivo 1:** Estimación de los niveles de exposición a *C. burnetii* en la población de ganado ovino de Castilla y León (estudio 1) y de ganado bovino (estudio 2), ovino y caprino (estudio 3) de la Comunidad de Madrid mediante la evaluación de la presencia de anticuerpos específicos frente a la bacteria a través el análisis de muestras de suero empleando un test ELISA comercial.

**Subobjetivo 2:** Evaluación de la distribución espacial de la fiebre Q, así como determinación de patrones de agregación espacial tanto a nivel global como local en la población de ganado ovino de Castilla y León (estudio 1) y de ganado bovino (estudio 2), ovino y caprino (estudio 3) de la Comunidad de Madrid, mediante el empleo de herramientas de geoprocesamiento en GIS (*Geographic Information System*).

**Subobjetivo 3:** Identificación de factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* a nivel de municipio y de rebaño en la población de ganado ovino de Castilla y León (estudio 1) y a nivel de rebaño e individual en ganado bovino (estudio 2), ovino y caprino (estudio 3) de la Comunidad de Madrid, mediante el empleo de modelos de regresión multivariantes.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**





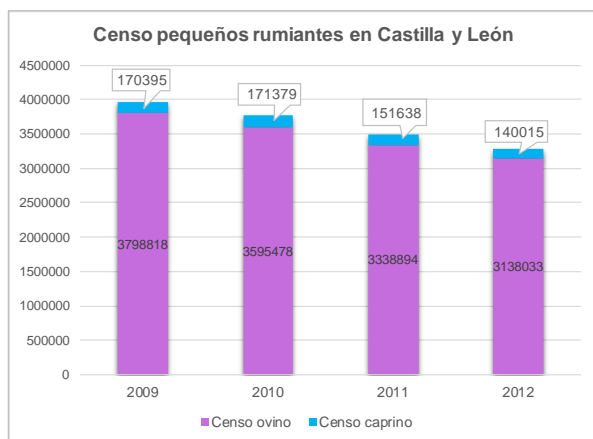
## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. POBLACIÓN EN ESTUDIO

#### 4.1.1. Estudio 1. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado ovino de Castilla y León

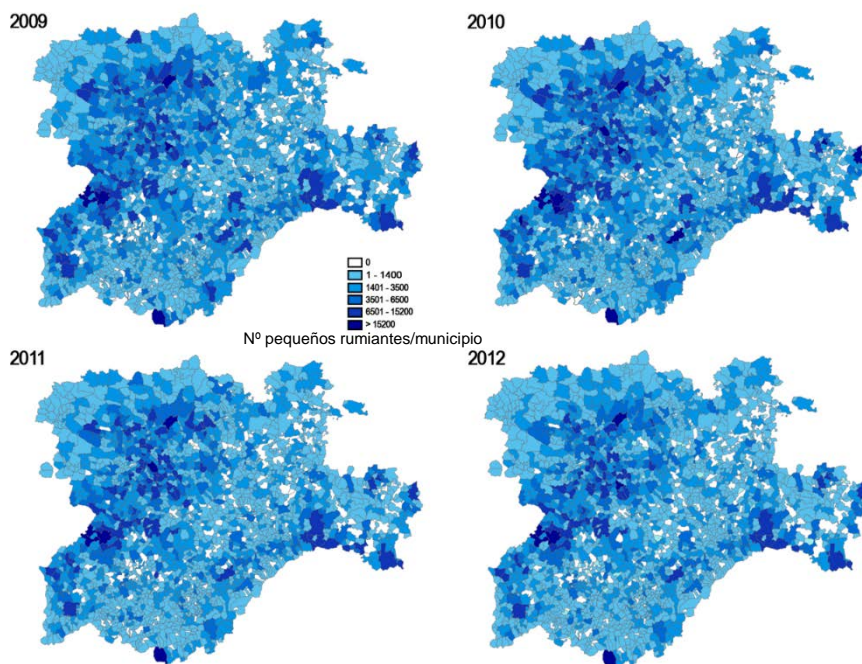
Este estudio se llevó a cabo en explotaciones de ganado ovino de Castilla y León entre los años 2009 y 2012. Esta comunidad autónoma está situada en el cuadrante noroccidental de la península ibérica y cuenta con un área de 94 220 km<sup>2</sup>, lo que la convierte en la comunidad autónoma de mayor extensión de España. Su orografía está compuesta principalmente por una zona mesetaria (la zona norte de la meseta central, caracterizada por su paisaje seco y árido consecuencia de los materiales arcillosos que la componen y en la que se encuentran amplias áreas destinadas al pastoreo), rodeada por un cinturón de relieves montañosos. El clima de la región se define como clima mediterráneo continentalizado, con inviernos largos y fríos y veranos cortos y calurosos, con entre tres y cuatro meses de aridez estival característicos del clima mediterráneo. La pluviosidad es escasa, con una media de 450-500 litros/m<sup>2</sup> anuales, acentuándose dicha escasez en las regiones más bajas de la región.

Esta comunidad autónoma se encuentra dividida en 103 Unidades Veterinarias Locales (UVLs), subregiones establecidas de acuerdo a criterios administrativos, geográficos y veterinarios. Castilla y León es una región eminentemente ganadera en la que la producción de ganado ovino presenta un papel socioeconómico fundamental. Según las encuestas ganaderas publicadas por el Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente (MAPAMA) durante los cuatro años en los que se realizó este estudio (2009-2012) Castilla y León se situó entre el primer y segundo puesto (por detrás de Extremadura) en censo ovino, con aproximadamente el 19% del número de cabezas totales de España (MAPAMA, 2017e). El número total de ovinos censados de acuerdo a la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León y sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos fue de 3,8 millones en 2009, pasando a 3,1 millones en 2012, como se representa en la Figura 2. En dicha figura se refleja el número total de pequeños rumiantes censados en los cuatro años de estudio, donde puede apreciarse que el censo caprino representa una proporción muy reducida del total. Asimismo, el número total de explotaciones ovinas registradas, sin incluir los cebaderos, osciló entre 11 800 en 2009 a 10 500 en 2012.

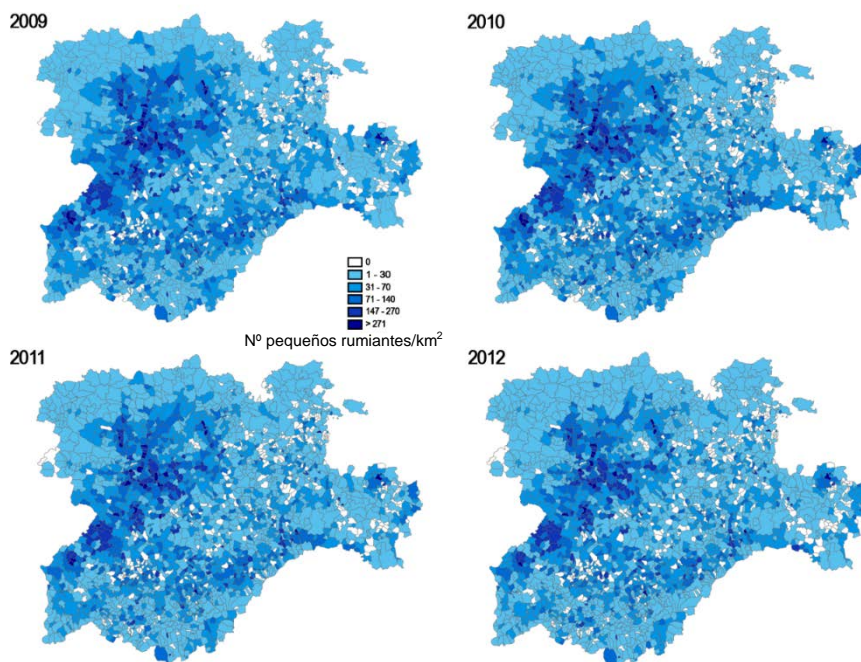


**Figura 2.** Número de pequeños rumiantes censados en Castilla y León entre los años 2009 y 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

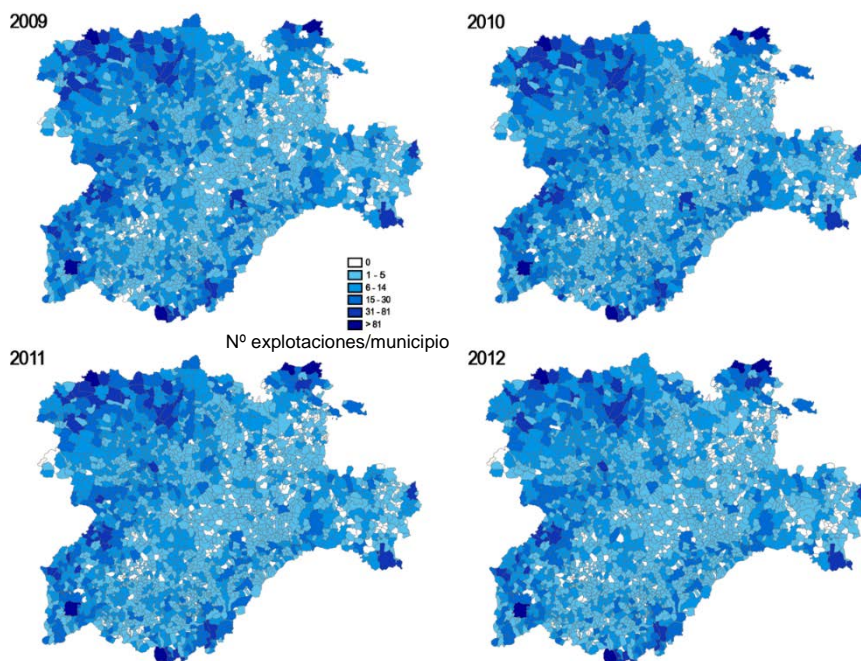
El censo total de pequeños rumiantes osciló entre cero y 32 000 cabezas por municipio, con una media y mediana anuales de, respectivamente, 1700 y 1000 animales aproximadamente (Figura 3). Asimismo, la densidad total de pequeños rumiantes por municipio osciló entre cero y 630 cabezas/km<sup>2</sup>, con una media entre 42 y 49 individuos/km<sup>2</sup> y una mediana entre 24 y 31 (Figura 4).



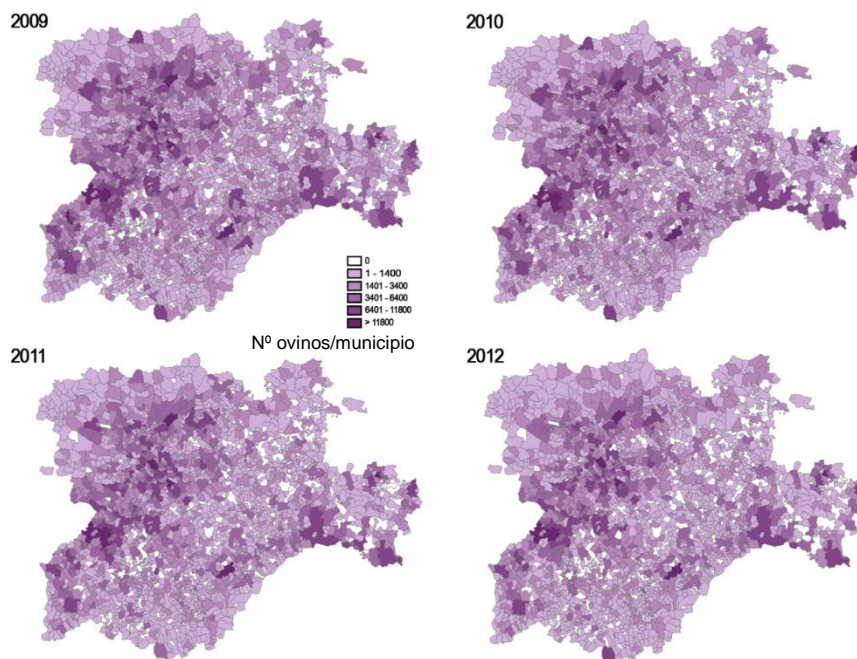
**Figura 3.** Distribución del censo de pequeños rumiantes por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.



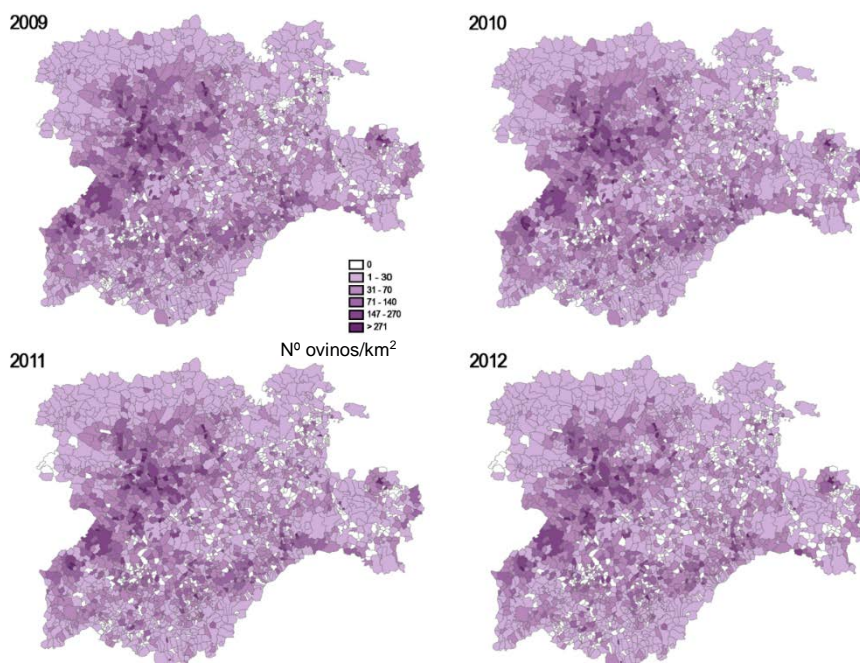
**Figura 4.** Distribución de la densidad de pequeños rumiantes por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.



**Figura 5.** Distribución del número de explotaciones de pequeños rumiantes por municipio en la Comunidad de Castilla y León en los años 2009-2012, sin incluir aquellas con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.



**Figura 6.** Distribución del censo de ovinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.



**Figura 7.** Distribución de la densidad de ovinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

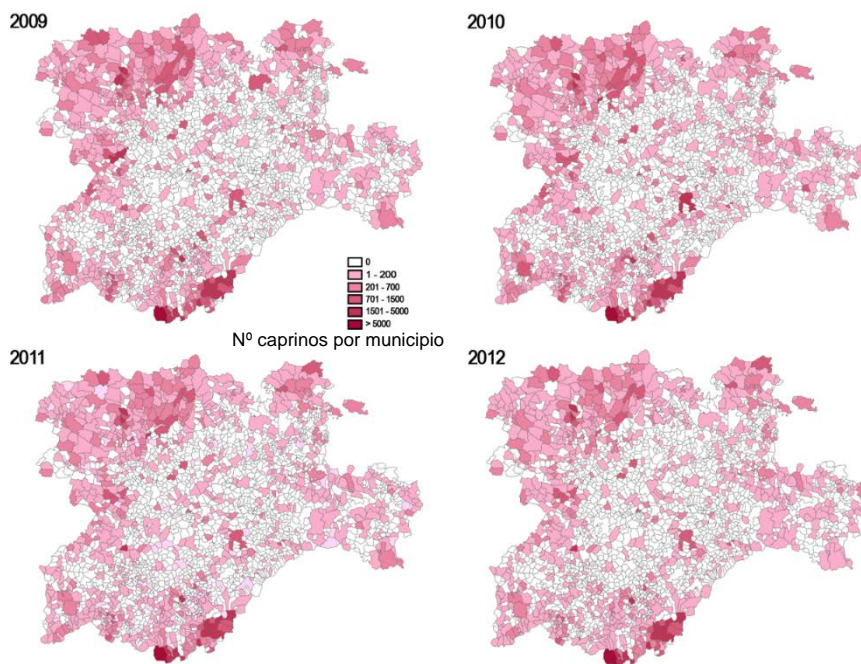
En cuanto al número de explotaciones de pequeños rumiantes por municipio, la media fue de seis y la mediana de entre tres y cuatro explotaciones dependiendo del año de estudio, oscilando entre cero y 189 (Figura 5).

En función de la especie de pequeño rumiante, el número de ovinos por municipio fue muy variable en los cuatro años de estudio, oscilando desde ningún animal a más de 30 000, con una media anual entre de 1600 y 1800 animales y una mediana de entre 1000 y 1100 animales (Figura 6). En cuanto a la densidad de esta especie por municipio, varió entre cero y 600 ovinos/km<sup>2</sup> (Figura 7), con una media anual de entre 23 y 29 ovinos/km<sup>2</sup> y una mediana de entre 40 y 47 ovinos/km<sup>2</sup>.

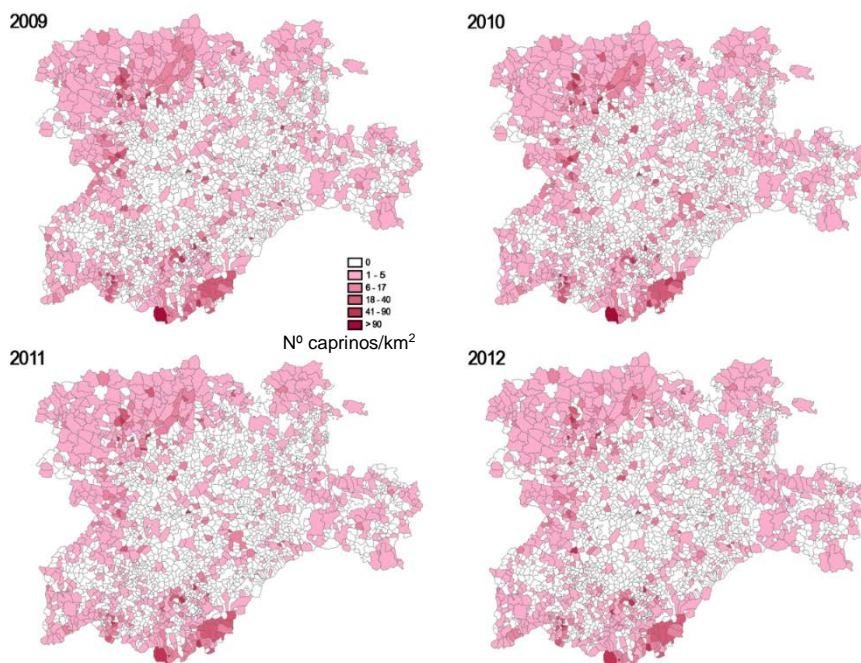
Asimismo, el número total de caprinos osciló entre cero y 19 800 por municipio en los cuatro años de estudio, con una media anual entre 160 y 200 cabezas y una mediana entre 24 y 36 (Figura 8). La densidad de esta especie por municipio osciló entre cero y 190 animales/km<sup>2</sup>, con una media de aproximadamente 1,5 individuos/km<sup>2</sup>, siendo la mediana de cero individuos en los cuatro años de estudio (Figura 9).

Asimismo, Castilla y León también es la comunidad autónoma con mayor producción nacional de carne de ovino. Entre los años de estudio 2009 y 2011 esta osciló entre 28 000 toneladas en 2009 y cerca de 33 000 en 2011, valores similares a los últimos disponibles, con 29 mil toneladas producidas en 2015, que representan el 25% de la producción total española. Además, Castilla y León cuenta con una de las seis indicaciones geográficas protegidas en cuando a la producción de corderos, el Lechazo de Castilla y León (MAPAMA, 2017b).

En cuanto al tipo de producción ovina en Castilla y León, en los últimos años se ha producido una evolución y mejora de la misma acorde con la tendencia nacional, debido principalmente a la sustitución a gran escala de efectivos de razas autóctonas por otras de razas foráneas mejoradas, como es el caso de la Assaf y la Lacaune. Este cambio ha modificado el perfil productivo principalmente en Castilla y León, pero también en la Comunidad de Madrid (región evaluada en el estudio 3 de la presente memoria de tesis) y en Castilla-La Mancha, con un incremento de las explotaciones intensivas en estabulación permanente y una mayor especialización de la mano de obra (MAPAMA, 2017f).



**Figura 8.** Distribución del censo de caprinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

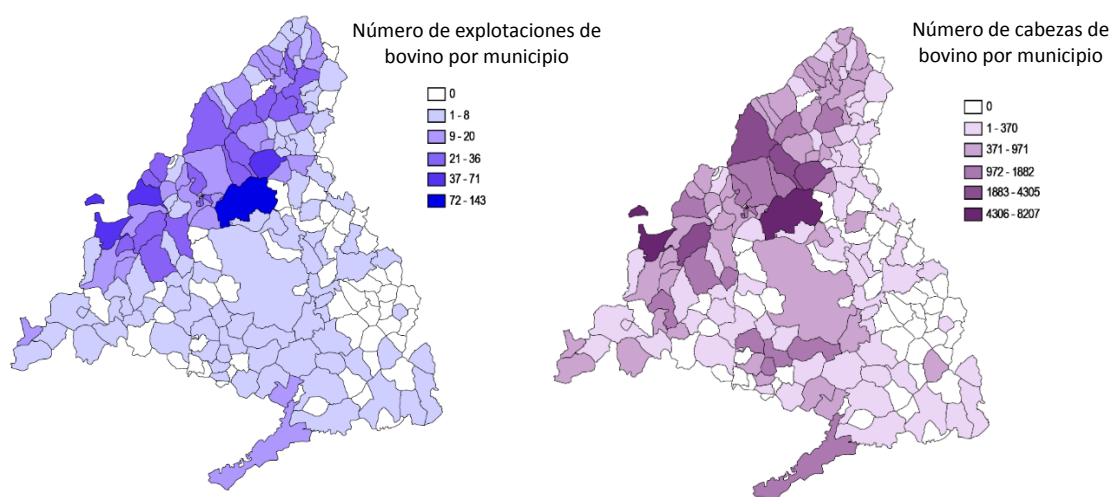


**Figura 9.** Distribución de la densidad de caprinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

Para llevar a cabo el presente estudio se realizó una selección de los rebaños ovinos a muestrear en cada uno de los cuatro años de estudio (2009-2012). Así, se realizó el muestreo en dos fases, determinándose primero cada año qué UVL se incluían en el estudio de acuerdo a los criterios que se describen en la siguiente sección, y seleccionándose en segundo lugar las explotaciones a muestrear cada año dentro de cada UVL.

#### 4.1.2. Estudio 2. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado bovino de la Comunidad de Madrid

Este estudio se llevó a cabo en ganado bovino de la Comunidad de Madrid en 2009. Esta comunidad autónoma está situada en el centro de la península ibérica y presenta un área de 8 021 km<sup>2</sup>. En la misma existen dos tipos de relieves bien diferenciados: un área montañosa que coincide con la zona limítrofe de esta provincia con Castilla y León y el resto de la región, constituido por zonas de campiñas, páramos y vegas. En cuanto a la meteorología, la zona de sierra presenta un clima de montaña mientras que el resto del territorio se caracteriza por un clima mediterráneo continentalizado de veranos cálidos, con inviernos algo más suaves a los de la vecina comunidad autónoma de Castilla y León. Las precipitaciones, también escasas, no suelen superar los 700 litros/m<sup>2</sup> al año, concentrándose en la primavera y el otoño.



**Figura 10.** Distribución del número de explotaciones y número de cabezas de bovino por municipio en la Comunidad de Madrid en el año 2011. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Área de Ganadería de la Comunidad de Madrid.



La citada comunidad autónoma contaba en noviembre de 2009 con un total de 92 552 bovinos y 1209 explotaciones según el censo agrario publicado por el Instituto Nacional de Estadística (Figura 10), lo que situaba a esta comunidad autónoma en el decimosegundo puesto nacional tanto respecto a censo (que contaba en esas fechas con cerca de seis millones de animales censados) como respecto a número de explotaciones (con cerca de 112 000 rebaños en total censados en España) (Instituto Nacional de Estadística, 2011). Asimismo, cabe destacar que Madrid es una comunidad autónoma en la que convive la producción de bovino de carne, leche y lidia, además de ser una región superficie notable de áreas naturales, lo que da lugar a una variedad considerable de sistemas productivos y condiciones ambientales.

Respecto a la producción de carne de bovino, en el año de estudio, 2009 se produjeron un total de 37 900 toneladas en peso a la canal en la Comunidad de Madrid, un 6% de la producción total estatal. En los últimos años se ha producido un cierto descenso de la producción, con un total de 28 700 toneladas en el año 2015, representando en este caso el 9% de la producción total en España (MAPAMA, 2017a).

En lo que se refiere a la producción láctea, la Comunidad de Madrid produjo 55 000 litros en 2009 (el 0,9% del total de ese año), valores muy similares a los últimos descritos en el año 2015 (también con 55 000 litros, representando el 0,8% del total nacional). La raza frisona es la predominante dentro de la aptitud láctea, que viene representando en torno al 99% de las hembras de leche desde 2009 hasta la actualidad (MAPAMA, 2017a).

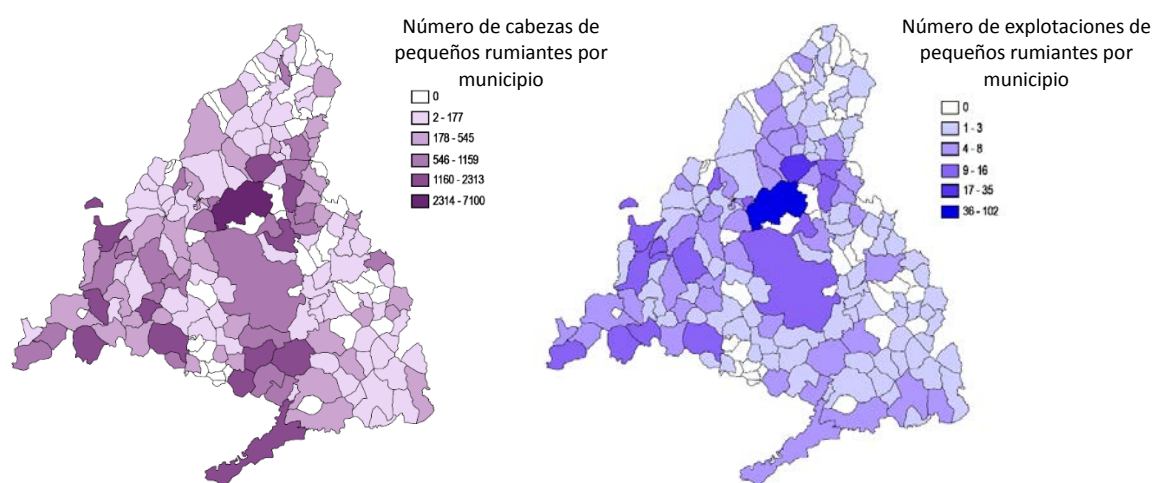
La población en estudio de este trabajo fueron las explotaciones de ganado bovino de la Comunidad de Madrid muestreadas en el marco del Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis Bovina en 2009, en el que se incluyen todos los rebaños bovinos censados en la región.

### **4.1.3. Estudio 3. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid**

Este estudio se llevó a cabo en rebaños de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid en 2011. De acuerdo con los datos facilitados por las autoridades de Sanidad Animal del gobierno de la Comunidad de Madrid, en el año 2011 existían 653 explotaciones de pequeños rumiantes [405 de ovino (62,2%), 74 de caprino (11,3%) y 173 mixtas (26,5%)] (Figura 11).

El número de animales censados por explotación en el año de estudio muy fue variable, oscilando entre 2 y 842 individuos, con una mediana de 35 animales; 19 en el caso de las explotaciones de caprino, 43 en las de ovino, y 24 en las mixtas.

En lo que se refiere al censo de animales, en noviembre del año de estudio (2011), y de acuerdo con las citadas encuestas ganaderas, la Comunidad de Madrid ocupaba el puesto 14 en cuando a censo ovino en España, con un total de 101 307 cabezas (el 0,6% del censo total) (Figura 11), siendo el censo nacional de 17 millones de ovejas (MAPAMA, 2017a).



**Figura 11.** Distribución del número cabezas de pequeños rumiantes (ovino y caprino) y del número de explotaciones de pequeños rumiantes (ovino, caprino y mixtas) por municipio en la Comunidad de Madrid en el año 2011. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Área de Ganadería de la Comunidad de Madrid.

Asimismo, en cuanto a la producción de carne, la Comunidad de Madrid produjo en 2011 un total de 1739 toneladas de peso a la canal, lo que la situaba en el puesto número 12 en España.

Respecto a las cabras, en noviembre de 2011 la Comunidad de Madrid ocupaba la decimotercera posición en cuanto al censo por comunidades autónomas, con 25 307 cabezas (0,94% del total nacional, constituido por 2 692 898 cabezas).

Respecto a la producción de leche de cabra, en 2011 se produjeron 5,5 millones de litros, el 1% de la producción nacional, producción que ha aumentado según los últimos datos disponibles, siendo de 6,3 millones en 2015 (el 1,3% de la producción total nacional dicho año).

Cabe destacar el hecho de que, en la Comunidad de Madrid, el número total de explotaciones de pequeños rumiantes se ha visto incrementada en los últimos años, siguiendo la tendencia general en España, donde se ha pasado de aproximadamente 70 000 explotaciones y 2,9 millones de cabezas en 2006 a cerca de 79 000 explotaciones y 3,1 millones de cabezas en 2016 (MAPAMA, 2017g). Así, esta comunidad contaba en 2016 con un total de 955 explotaciones con animales de la especie ovina y 474 explotaciones con caprinos. En cuanto a número de cabezas, la Comunidad de Madrid presentaba un censo aproximado de 100 000 ovinos y 33 000 caprinos en 2016 (MAPAMA, 2017g; 2017f). En cuanto a la producción de bovino en la Comunidad de Madrid, esta contaba con más de 91 000 cabezas y 1500 explotaciones censadas en 2015 (Consejería de Medio Ambiente, 2015).

En este trabajo la población en estudio fueron las explotaciones de pequeños rumiantes (ovejas y cabras) de la Comunidad de Madrid muestreadas en el marco del Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis de los pequeños rumiantes en 2011, en el que se incluyen todos los rebaños de estas dos especies censados en la región.

## 4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

### 4.2.1. Estudio 1. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado ovino de Castilla y León

Este estudio se llevó a cabo dentro del marco del Procedimiento integral de investigación epidemiológica de tularemia y otras zoonosis asociadas a roedores silvestres y lagomorfos de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (2008-2012), con la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León como órgano responsable. Este procedimiento surgió dentro del conjunto de medidas de vigilancia y control del topillo campesino (*Microtus arvalis*) a raíz de la plaga de dicha especie de roedor en 2007 en la región [en la que se llegaron a alcanzar densidades de 1000 topillos por hectárea en determinadas zonas (Luque-Larena *et al.*, 2015)] y por su posible papel en la transmisión de diferentes zoonosis, incluida la fiebre Q (Meerburg y Reusken, 2011). La enfermedad a la que se dirigieron los mayores esfuerzos del programa fue la tularemia, dada la conocida susceptibilidad del topillo campesino a la infección por *Francisella tularensis* y su papel como reservorio, amplificador y transmisor de dicha bacteria (Gyuranecz *et al.*, 2012b; Rossow *et al.*, 2014). De hecho, en un estudio realizado con datos obtenidos entre 1997 y 2014 se puso de manifiesto la asociación entre el incremento de la densidad del

topillo y el aumento de casos humanos de tularemia en la región (Luque-Larena *et al.*, 2015).

Así, para llevar a cabo este estudio en primer lugar se seleccionaron las UVL que se incluyeron cada uno de los cuatro años del mismo en función de dos factores: la descripción en las mismas de uno o más casos humanos de tularemia y/o la densidad de topillo campesino que presentaban. De este modo un total de 57, 63, 62 y 59 UVL de la zona mesetaria de Castilla y León (donde se concentra el 90% del censo ovino de la comunidad autónoma) fueron incluidos en el estudio en los años 2009, 2010, 2011 y 2012, respectivamente.

El número de rebaños a muestrear dentro de cada UVL se estimó considerando una seroprevalencia de rebaño esperada del 5%, con un nivel de confianza del 95% y un error admitido de  $\pm 1\%$ . Así, el número mínimo de rebaños a muestrear anualmente fue de 1825. Finalmente, se incluyeron en el estudio un total de 1972, 2049, 2219 y 2039 rebaños en los años 2009, 2010, 2011 y 2012, respectivamente, que fueron seleccionados por conveniencia por los Servicios Veterinarios Oficiales de Castilla y León.

El número mínimo de animales a muestrear por explotación se estimó de acuerdo al método propuesto por Cameron y Baldock (Cameron y Baldock, 1998), considerándose una seroprevalencia intra-rebaño esperada del 30% (Guatteo *et al.*, 2010) y teniendo en cuenta una sensibilidad y especificidad diagnósticas del test ELISA empleado del 95 y 99% respectivamente (Kittelberger *et al.*, 2009; Ruiz-Fons *et al.*, 2010; Scolamacchia *et al.*, 2010), de modo que se obtuviera una sensibilidad de rebaño superior al 80%. De este modo, se determinó que el número mínimo de animales a muestrear por explotación era de diez individuos, cifra que permitía garantizar una sensibilidad diagnóstica del muestreo a nivel rebaño del 83%. Para realizar dicha estimación se empleó el programa *EpiTools epidemiological calculators* (Cameron, 1999). El muestreo de los animales se llevó a cabo junto con las labores de saneamiento ganadero del Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis de los Pequeños Rumiantes. Las muestras de cada explotación se seleccionaron aleatoriamente del total de animales muestreados en el marco de dicho programa de saneamiento ganadero.

Las muestras de sangre fueron tomadas en tubos con sistema de vacío sin anticoagulante mediante punción en la vena yugular. Una vez en el laboratorio, las muestras de suero se recogieron previa centrifugación de las mismas y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

Por otro lado, con el fin de llevar a cabo el estudio espacial y de factores de riesgo a partir de los resultados serológicos obtenidos, se recogió información referente a las explotaciones en estudio. El acceso a dicha información fue facilitado por el Servicio de Sanidad Animal de la Dirección General de Producción Agropecuaria e Infraestructuras Agrarias de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León. Así, la información de rebaño recogida incluyó su aptitud productiva, el manejo (intensivo, extensivo o mixto), el censo, la fecha de muestreo, el municipio de origen y las coordenadas geográficas del municipio al que pertenecía cada explotación. Asimismo, también se recogió la información referente al número de explotaciones ovinas y caprinas de cada municipio de Castilla y León (sin contar los cebaderos), así como el censo total de cada especie por municipio para cada año de estudio.

### **4.2.2. Estudio 2. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado bovino de la Comunidad de Madrid**

En este estudio, el tamaño muestral se determinó con el fin de estimar la seroprevalencia individual de fiebre Q en el ganado bovino de la Comunidad de Madrid, para lo que se empleó la fórmula para estimación de prevalencias  $n = (Z^2 \times P(1 - P))/e^2$ , asumiendo una seroprevalencia individual esperada del 12% (Muskens *et al.*, 2011a) con un error admitido del  $\pm 2\%$  y un nivel de confianza del 95%. Así, se determinó que el número total de bovinos a muestrear era 1015, número que se incrementó hasta 1100 animales en previsión de posibles pérdidas durante el muestreo. Asimismo, teniendo en cuenta una seroprevalencia mínima de rebaño en rebaños infectados del 25% y una sensibilidad y especificidad diagnósticas aproximadas del test ELISA del 100%, se decidió dividir el número de muestras total en 10 por explotación, de modo que se alcanzara una sensibilidad de rebaño del 95% de acuerdo al método de Cameron y Baldock (Cameron y Baldock, 1998).

Por tanto, el número total de explotaciones que se muestrearon fueron 110 (10 animales por granja, 1100 animales testados en total).

Los rebaños a incluir en el estudio se seleccionaron mediante un muestreo aleatorio simple de entre las explotaciones muestreadas durante los meses de octubre y noviembre de 2009 dentro de la Campaña de erradicación de Brucelosis Bovina de dicho año. Asimismo, las muestras de suero de cada rebaño de cada una de las explotaciones

incluidas en el estudio fueron aleatoriamente seleccionadas de entre los todos los sueros bovinos de animales de más de 12 meses de edad recogidos dentro el marco del Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis Bovina en 2009.

La toma de muestras de sangre, recogida de suero y conservación del mismo hasta su análisis se realizó de la misma forma descrita en el estudio 1 con la diferencia de que la extracción de sangre se realizó mediante punción en la vena coccígea, como es habitual en el bovino.

También de forma similar a lo descrito en el estudio 1, a partir del acceso al Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) se recogió información epidemiológica referente a cada uno de los rebaños incluidos en estudio con el fin de poder evaluar la distribución espacial de los resultados serológicos y los factores de riesgo asociados a estos. Así, se recogió información sobre el censo, el tipo de producción (láctea, cárnica o de lidia), la delegación de origen y las coordenadas geográficas de cada rebaño. También se recogió información referente a las características individuales de los animales muestreados, incluyendo la edad, el género, la raza, el origen (nacido en la explotación o comprado) y el número de movimientos entre granjas que había realizado en individuo hasta el momento de la toma de muestras.

#### **4.2.3. Estudio 3. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid**

En este estudio realizado sobre los pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid el tamaño muestral se estableció con el fin de determinar la prevalencia de rebaño de fiebre Q mediante la misma fórmula empleada en el segundo estudio para estimación de prevalencia, asumiendo una prevalencia de rebaño esperada del 25%, un error admitido del  $\pm 6\%$  (Guatteo *et al.*, 2010) y un nivel de confianza del 95%. Así, se determinó que el número de explotaciones necesarias eran 150, número que se aumentó hasta 152 para compensar posibles pérdidas durante el estudio. El muestreo se estratificó por especie (ovino/caprino/rebaño mixto) de manera proporcional a la distribución de especies presentes en la Comunidad de Madrid, por lo que se escogieron 94 rebaños de ovejas, 18 de cabras y 40 mixtos, que se seleccionaron aleatoriamente a partir del listado total de explotaciones usando el generador de números aleatorios de Excel. Siete de las explotaciones (4,6%) tuvieron que excluirse del estudio por no poder localizarse muestras

de las mismas, por lo que la muestra final a analizar fue de 145 rebaños (90 rebaños de ovejas, 16 de cabras y 39 mixtos).

El número de animales a muestrear por explotación ( $n = 10$ ) se calculó utilizando la aproximación descrita anteriormente (Cameron y Baldock, 1998) para garantizar una sensibilidad de rebaño no inferior al 75% (que llegaba al 85% en explotaciones de tamaño medio, 113 animales), asumiendo una sensibilidad y especificidad individual del test del 95% y 99% respectivamente (Kittelberger *et al.*, 2009; Ruiz-Fons *et al.*, 2010; Scolamacchia *et al.*, 2010) La estimación fue realizada utilizando la misma calculadora *on-line* citada para el estudio 1 (Cameron, 1999).

Las muestras de suero de cada rebaño incluido en el estudio fueron aleatoriamente seleccionadas mediante un muestreo sistemático de entre los todos los sueros de pequeños rumiantes recogidos en 2011 en cada una de las explotaciones seleccionadas, que fueron tomados dentro el marco del Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis de los Pequeños Rumiantes de ese año.

De igual modo a lo descrito para el estudio anterior, con el fin de poder realizar posteriormente el análisis espacial y de factores de riesgo de los resultados serológicos obtenidos, se recogió información tanto de explotación [delegación de origen, coordenadas geográficas, tipo de explotación (carne, leche, mixta), censo y especies de animales presentes (ovejas, cabras o ambas)] como individual (raza, aptitud, y edad de los animales) a partir de la base de datos del REGA (Registro General de Explotaciones Ganaderas).

### **4.3. ANÁLISIS DE LABORATORIO**

Las muestras de suero de los tres estudios se analizaron mediante el empleo del mismo kit comercial de ELISA, el ID Screen® Q fever Indirect Multi-species, de la casa comercial IDvet (Grabels, Francia), válido para el análisis de sueros bovinos, ovinos y caprinos y cuyos pocillos están tapizados con antígenos de fase I y II de una cepa de *C. burnetii* aislada a partir de un aborto ovino. El protocolo de trabajo empleado se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante como se describe a continuación:

Para llevar a cabo la prueba, tanto las muestras de suero como los reactivos del kit y las tiras con los pocillos tapizados se dejaban atemperar hasta alcanzar la temperatura ambiente del laboratorio y se homogeneizaban convenientemente antes de su empleo. Para dispensar los distintos reactivos, así como las muestras de suero se emplearon

micropipetas que cubrieran el rango de volúmenes necesario en cada caso, así como puntas desechables adaptadas a estas.

En primer lugar se dispensaban 90 microlitros del diluyente 2 del kit listo para su empleo en todos los pocillos a utilizar en la prueba.

A continuación, por cada placa ELISA se añadían diez microlitros del control negativo del kit a los dos pocillos elegidos para tal fin, y del mismo modo, diez microlitros del control positivo del kit a sus dos pocillos correspondientes. En el resto de pocillos de la placa se dispensaban diez microlitros de cada muestra de suero problema a analizar.

Las placas ELISA se incubaban durante 45 minutos ( $\pm$  cinco minutos) a la temperatura ambiente del laboratorio cubriendo las mismas con un papel adhesivo protector. El tiempo de incubación se controlaba mediante el empleo de un cronómetro. Durante esta incubación se produce la fijación de los anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* presentes en la muestra problema (si esta es positiva) al antígeno que tapiza los pocillos.

Durante el periodo de incubación se preparaba la solución de lavado necesaria para los siguientes pasos a su concentración de uso (1X) a partir de la solución de lavado concentrada (20X) que proporciona el kit, realizando la dilución correspondiente con agua destilada.

Tras la incubación se vaciaba el contenido de los pocillos desechándolo enérgicamente en la pila y se llevaba a cabo el lavado de los mismos con 300 microlitros de solución de lavado con el fin de retirar la parte de muestra no fijada y los restos de diluyente. El paso de lavado se repetía tres veces, retirando el exceso de solución de lavado en cada paso invirtiendo la placa y golpeando suavemente la misma sobre papel de filtro.

A continuación, se añadían a cada pocillo 100 microlitros de la solución de conjugado, reactivo que contiene anti-anticuerpos dirigidos frente a las inmunoglobulinas de rumiantes domésticos marcados con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), que se unen a los anticuerpos frente a *C. burnetii* procedentes de la muestra de suero problema en caso de que estén presentes en el pocillo, formando así los complejos antígeno-anticuerpo-conjugado. Justo antes de su empleo, el conjugado se preparaba a la concentración de uso (1X) a partir del conjugado concentrado que proporciona el kit (10X), realizando la dilución con el diluyente 3 también incluido en el kit. Una vez añadido el conjugado las placas se incubaban a temperatura ambiente durante 30 minutos ( $\pm$  tres minutos).



Tras el periodo de incubación se repetía el proceso de lavado descrito anteriormente.

A continuación, se añadían 100 microlitros de la solución de sustrato lista para su uso proporcionada por el kit (preparado que contiene el sustrato de la enzima del conjugado) a cada pocillo y la placa se incubaba durante 15 minutos ( $\pm$  tres minutos). Dicha incubación se realizaba en completa oscuridad dada la fotosensibilidad del sustrato. En aquellos pocillos correspondientes con muestras de suero que presentasen anticuerpos frente a *C. burnetii* y por tanto en los que se habría formado los complejos antígeno-anticuerpo-conjugado, el sustrato reacciona con la enzima del conjugado, lo que da lugar al desarrollo de una reacción colorimétrica.

Tras los 15 minutos de incubación se añadían 100 microlitros de la solución de parada de la reacción enzimática proporcionada por el kit y lista para su uso ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  a una concentración 0,5 molar).

Inmediatamente tras añadir la solución de parada se realizaba la lectura de las placas mediante el empleo de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nanómetros. La lectura se transfería a un ordenador en un archivo de formato Excel.

Para determinar si el ensayo se había validado correctamente en cada placa ELISA analizada debían cumplirse dos condiciones: i) que la densidad óptica (DO) media de los dos controles positivos fuese superior a 0,350 y ii) que el cociente entre la densidad óptica media de los dos controles positivos y los dos controles negativos fuese mayor de tres.

Este test ELISA expresa el resultado de cada muestra como el porcentaje del valor de densidad óptica obtenido en los controles positivos ajustando a las lecturas de fondo. Así, para interpretar los resultados obtenidos, se aplicaba la siguiente fórmula a cada muestra:

$$\%DO = \frac{DO \text{ de la muestra} - DO \text{ del control negativo}}{DO \text{ del control positivo} - DO \text{ del control negativo}} \times 100$$

La interpretación de los resultados según las instrucciones del fabricante indicaba que:

- Las muestras con un %DO igual o inferior al 40% se consideran negativas.
- Las muestras con %DO superior a 40% y menor o igual al 50% se consideran dudosas.
- Las muestras con %DO superior a 50% y menor o igual a 80% se consideran positivas.

- Las muestras con %DO superior a 80% se consideran positivas fuertes.

En ninguno de los estudios se tuvo en cuenta la diferenciación entre resultados positivos y positivos fuertes, considerándose ambos tipos como resultados positivos. Con el fin de aplicar el criterio de interpretación más sensible posible, los animales cuyas muestras de suero presentaban un %DO dudoso según la interpretación del kit se consideraron como animales reactivos en los tres estudios y el análisis de datos se realizó de acuerdo a esta interpretación. Además, en los estudios 2 y 3 se evaluó el impacto que podría tener el empleo del criterio conservador de interpretación de resultados (según el cual aquellas muestras dudosas de acuerdo a la interpretación del kit se considerarían negativas) en los resultados finales.

#### **4.4. ANÁLISIS DE DATOS**

##### **4.4.1. Estimación de los niveles de seroprevalencia de fiebre Q**

###### **4.4.1.1. Estudio 1. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado ovino de Castilla y León**

A partir de los resultados serológicos obtenidos en cada uno de los cuatro años de estudio en rebaños ovinos de Castilla y León se calcularon las seroprevalencias de fiebre Q individuales, de rebaño y de municipio en cada año, así como sus intervalos de confianza al 95% según el método de Wilson (Wilson, 1927) mediante el programa WINPEPI (Abramson, 2011) en su versión 11.30. Así los niveles de seroprevalencia se expresaron como el porcentaje de unidades epidemiológicas (animales, explotaciones o municipios, según el caso) positivas en test ELISA respecto al total de unidades muestreadas. Un rebaño se consideró positivo cuando presentaba al menos un ovino seropositivo del total de individuos muestreados en la explotación. Del mismo modo, un municipio se consideró positivo cuando presentaba al menos un rebaño positivo del total de rebaños muestreados en el municipio. Asimismo, las seroprevalencias de rebaño también se calcularon en función de las distintas variables epidemiológicas de las que se recogió información.

###### **4.4.1.2. Estudio 2. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado bovino de la Comunidad de Madrid**

En este estudio las seroprevalencias de fiebre Q en explotaciones de bovino de la Comunidad de Madrid se estimaron del mismo modo a lo descrito para el estudio 1, en

este caso individual y de explotación, tanto general como en función de las distintas variables epidemiológicas estudiadas a ambos niveles.

#### **4.4.1.3. Estudio 3. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid**

También en este estudio los niveles de seroprevalencia de fiebre Q en explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid se estimaron de igual modo a lo descrito en los dos estudios anteriores. En este caso, la seroprevalencia se determinó también nivel individual y de rebaño. En el caso de los resultados individuales, estos se calcularon tanto para ambas especies de pequeños rumiantes en conjunto como para cada especie. En aquellos rebaños mixtos de ovejas y cabras la prevalencia de rebaño se determinó teniendo en cuenta la suma total de animales seropositivos de ambas especies.

#### **4.4.2. Detección de agrupamientos (*clusters*) en el espacio**

##### **4.4.2.1. Estudio 1. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado ovino de Castilla y León**

Los niveles de seroprevalencia obtenidos cada año de estudio fueron empleados para evaluar la posible distribución de los resultados de acuerdo a un determinado patrón espacial. Los análisis espaciales se realizaron a nivel de municipio, dado que éste era la menor unidad espacial disponible dada la imposibilidad de acceder a la localización individual de las explotaciones, utilizando los centroides de los mismos cuando los análisis precisaban coordenadas.

En primer lugar, se evaluó la posible asociación espacial global de los datos mediante el test de Cuzick y Edwards (CE) (Cuzick y Edwards, 1990), empleando el programa ClusterSeer 2.5 (Terraseer, Ann Arbor, USA). Mediante este test, el número de pares de observaciones a un nivel “n” de vecindad clasificadas como casos (municipios positivos) fueron comparados con las esperadas mediante la generación de 999 simulaciones de Monte Carlo, según la hipótesis nula de que todos los casos se distribuyen aleatoriamente en el espacio. La posible asociación espacial fue evaluada hasta el décimo nivel de vecindad.

Po otra parte, con el fin de detectar áreas de mayor riesgo de fiebre Q, se evaluó la posible asociación espacial local resultados. Para ello se aplicó el modelo de Bernoulli del *spatial*

*scan statistic* (Kulldorff y Nagarwalla, 1995) mediante el empleo del programa SaTScan 9.4.2. (Kulldorff, 2009). Mediante este modelo, el número de rebaños ovinos positivos por municipio (casos observados) presente en ventanas sucesivas centradas alternativamente en cada observación y con tamaños variables se compara con el número de casos esperados, según la hipótesis nula de que los casos están distribuidos aleatoriamente en el espacio. El tamaño máximo de las ventanas se estableció en aquel que contenía el 50% de la población en riesgo.

La distribución espacial de los niveles de seroprevalencia observados, así como los resultados obtenidos mediante el modelo de Bernoulli fueron representados en distintos mapas generados mediante el programa ArcMap 10.1.

#### **4.4.2.2. Estudio 2. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado bovino de la Comunidad de Madrid**

En este estudio se evaluó la posible asociación espacial tanto global como local de los resultados de ganado bovino de la Comunidad de Madrid, en este caso a nivel de explotación, siguiendo la misma metodología descrita para el estudio 1.

#### **4.4.2.3. Estudio 3. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en pequeños rumiantes en la Comunidad de Madrid**

En este estudio también se llevó a cabo el análisis espacial a nivel de explotación de acuerdo a la metodología empleada en los dos estudios anteriores. En este caso, se emplearon diferentes aproximaciones en función de la especie. Por un lado, los análisis se realizaron sobre todas las explotaciones del estudio juntas, independientemente de la especie animal, con objeto de conocer la distribución espacial global de la enfermedad. Por otro lado, se llevaron a cabo los análisis utilizando únicamente las explotaciones que presentaban ovejas, es decir, tanto las explotaciones exclusivamente de ovino como las mixtas, con el fin de conocer el patrón de distribución espacial de los resultados en explotaciones en los que esta especie estaba presente. Este mismo enfoque no se llevó a cabo con las explotaciones de caprino debido al limitado número de explotaciones únicamente de cabras incluidas en el estudio ( $n = 18$ ).

#### 4.4.3. Análisis de factores de riesgo

##### 4.4.3.1. Estudio 1. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado ovino de Castilla y León

En primer lugar, se evaluó la posible asociación entre las características potencialmente relacionadas con los resultados serológicos a nivel de explotación (aptitud productiva, tipo de producción y momento de muestreo). Para ello se empleó el test chi-cuadrado seguido de un test Z de comparaciones múltiples ajustado por el método de Bonferroni en el caso de las variables con más de dos categorías. En el caso de la variable momento de muestreo, inicialmente esta se categorizó en trimestres cada año (enero - marzo, abril - junio, julio - septiembre y octubre - diciembre), sin embargo, dado que el número de muestreos en cada trimestre dentro de cada año estaba muy poco balanceado, se exploró la fusión de varias de estas categorías y finalmente se establecieron dos únicas categorías, primer y segundo trimestre del año, de acuerdo a las cuales se llevó a cabo el análisis de dicho factor de riesgo.

Por otro lado, también se comparó el número de ovinos positivos en cada explotación en función de las citadas variables de rebaño mediante el empleo del test de Mann-Whitney en el caso de la aptitud productiva, tipo de producción y época de muestreo y mediante el test de Kruskal-Wallis realizando un ajuste *post hoc* mediante el método de Bonferroni.

Además, también se evaluó la posible existencia de diferencias entre el número de pequeños rumiantes por municipio a lo largo de los cuatro años de estudio mediante el test de Friedman.

Posteriormente, para evaluar la asociación entre las características de rebaño y la probabilidad de encontrar un ovino seropositivo en una determinada granja controlando por la posible dependencia espacial de los resultados, se diseñó un modelo mixto binomial Bayesiano para cada uno de los cuatro años de estudio (2009-2012). Según este modelo, se asumió que el número de ovinos seropositivos muestreados en una determinada explotación  $i$  dentro de un determinado municipio  $j$  ( $Pos_{i,j}$ ) se distribuía de acuerdo a una distribución binomial, de modo que:

$$Pos_{i,j} \sim Bn(p_{i,j}, N_{i,j})$$

Donde  $p_{i,j}$  indica la probabilidad que los animales de una determinada granja  $i$  perteneciente a un municipio  $j$  tienen de ser seropositivos, y  $N_{i,j}$  indica el número de animales testados en dicha granja.

La probabilidad específica de obtener resultados positivos en una determinada granja  $p_{i,j}$  es una función de  $k$  covariables a nivel de rebaño y un factor aleatorio de rebaño  $U_i$ . El posible efecto espacial, derivado del efecto de factores de riesgo conocidos y desconocidos se incluyó en el modelo mediante un efecto de municipio  $S_j$  tal como se representa a continuación:

$$\text{Log}\left(\frac{p_{i,j}}{1-p_{i,j}}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_{1ij} + \dots + \beta_k X_{kij} + U_i + S_j$$

Donde  $\beta_0$  representa la constante origen y  $\beta_1, \dots, \beta_k$  son los coeficientes asociados con las  $X_k$  variables a nivel de rebaño observadas en una granja  $i$  de un municipio  $j$ , y  $S_j$  representa el efecto espacial para un determinado municipio  $j$ .

Las variables a nivel de rebaño que fueron incluyéndose alternativamente en el modelo fueron el censo (categorizado en cuartiles), el tipo de producción (carne vs. leche), la época de muestreo (no disponible para los muestreos realizados durante el año 2010) y el tipo de manejo (extensivo vs. intensivo/mixto). El análisis de esta última variable se llevó a cabo fusionando las categorías de producción intensiva y mixta para compararlas frente a las de producción exclusivamente de extensivo, debido a que el número de explotaciones de tipo intensivo era sensiblemente inferior al de las otras dos categorías (135, frente a una media de 700 de extensivo y 1126 de tipo mixto).

La fuerza de la asociación entre una determinada variable  $X_k$  y el resultado del modelo fue estimada utilizando probabilidades Bayesianas *a posteriori* (PBAP) (proporción de simulaciones de Monte Carlo en las cuales el valor estimado para  $\beta_k$  fue mayor que cero) (Álvarez *et al.*, 2015).

El efecto espacial  $S_j$  recibió en un primer análisis una estructura espacial autocorrelacionada, de modo que se asumió que seguía una distribución normal:

$$S_j \sim N(\phi_i, \tau_s)$$

Donde  $\phi_i$  representa una media ponderada del efecto aleatorio  $S_{1,\dots,k}$  estimado en los  $k$  municipios vecinos (límites) al municipio  $i$  y  $\tau_s$  representa la precisión (inverso de la varianza) de la distribución de efectos  $S_j$ . No obstante, cuando solo se tuvieron en cuenta variables de explotación y efectos aleatorios espaciales a nivel de municipio  $S_j$  correlacionados siguiendo un modelo condicional autorregresivo (modelo intrínseco) (Besag *et al.*, 1991), se observó un problema con las estimaciones posteriores de estos últimos: los valores  $S_j$  en ciertos casos se vieron muy afectadas por el número de municipios vecinos de un determinado municipio, por una parte, y por el número de explotaciones muestreadas en los mismos, por otra. Cuando el número de municipios vecinos y el número de explotaciones muestreadas (en el municipio en cuestión y sus vecinos) era pequeño ( $n \leq 2$ ) las estimaciones posteriores de  $S_j$  fueron muy superiores a las registradas en el resto de las unidades en estudio, debido a la ausencia de información para una estimación más precisa de las mismas. Dado que  $S_j$  expresan un riesgo asociado con variables con una estructura espacial (ya que el valor en el municipio  $i$  se ve influido por el de todos sus vecinos) no incluidas en el modelo, para resolver este problema en una segunda fase se exploró la utilidad de añadir variables medidas a nivel de municipio potencialmente relacionadas con la distribución del patógeno tales como el número y densidad de pequeños rumiantes (animales y rebaños) presentes en el mismo.

De esta forma el término  $S_i$  fue reemplazado por un efecto de municipio  $\phi_j$  modelado a su vez según una distribución normal con media  $\mu_j$  y varianza  $\sigma$ , siendo  $\mu_j$  una función de las variables de municipio  $Y_j$  y el efecto aleatorio espacial autocorrelacionado  $S_j$  tal que:

$$\phi_j \sim N(\mu_j, \sigma)$$

$$\mu_j = \alpha Y_j + S_j$$

De modo que  $\alpha$  representa el coeficiente asociado con la variable  $Y_j$ . Como variables a nivel de municipio se exploraron alternativamente el número y la densidad de pequeños rumiantes y de rebaños de estos.

Para los coeficientes  $\beta_0 \dots \beta_k$  y  $\alpha$  se usaron distribuciones normales no informativas con media 0 y varianza 1000. Al efecto aleatorio a nivel de explotación  $U_i$  se le asignó una distribución normal con media 0 y precisión  $\tau_u$ . Los parámetros  $\tau_u$  y  $\tau_s$  fueron modelados de acuerdo a una distribución Gamma (0,01; 0,01), mientras que para la desviación estándar del efecto a nivel municipio  $\phi_j$  se eligió una distribución uniforme (0; 100).

Con objeto de acomodar la variabilidad observada en los datos, se exploró la utilización de distribuciones beta-binomial y binomial negativa en sustitución de la binomial.

Los modelos fueron ajustados con WinBUGS 1.4.3 a través del paquete R2WinBUGS (Sturtz *et al.*, 2005) del programa R 3.2.0 (R development core team, 2015). Los modelos fueron evaluados mediante 7000 iteraciones de Monte Carlo vía tres cadenas de Markov con valores iniciales dispersos, muestreando una de cada diez iteraciones para eliminar la autocorrelación. Del total de iteraciones se descartaron las primeras 2500 (*burn-in*). La convergencia y la mezcla de las cadenas fueron evaluadas visualmente y de forma más formal mediante el empleo del estadístico de Gelman-Rubin  $\hat{R}$  (Brooks y Gelman, 1998; Gelman y Donald, 1992). El modelo final se seleccionó en función del DIC (*Deviance Information Criteria*) (Spiegelhalter *et al.*, 2002), y el ajuste del modelo se evaluó utilizando el método de comprobación predictiva (*predictive checking*), basado en la comparación de un conjunto de datos replicados generados a partir de las distribuciones posteriores de los coeficientes estimados en el modelo, con los datos observados siguiendo un método descrito previamente (Gelman y Hill, 2007). En caso de valores de DIC equivalentes (< 5 unidades de diferencia) se priorizaron aquellos modelos que incluían variables potencialmente asociadas con la variable respuesta (indicado por valores de PBAP > 80%). La posible existencia de autocorrelación en la variabilidad residual de los modelos finales se evaluó mediante el test de Moran (Moran, 1950).

#### **4.4.3.2. Estudio 2. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en ganado bovino de la Comunidad de Madrid**

Para determinar los posibles factores de riesgo asociados a la detección de casos positivos a fiebre Q en el test ELISA se utilizaron modelos a nivel individual y de rebaño.

En primer lugar, se evaluaron las posibles asociaciones entre las características de rebaño e individuales que podían estar potencialmente relacionadas con los resultados serológicos en modelos univariados. Para ello se empleó el test chi-cuadrado en el caso de las variables categóricas y el análisis de la varianza (ANOVA) para las variables continuas una vez evaluada su normalidad. El tamaño de rebaño, la edad y el número de movimientos fueron analizados como variables continuas, aunque el efecto de la edad también fue evaluado categorizando la variable en cuartiles. Dados los resultados obtenidos en el análisis espacial (sección 5. 1. 2.), el estatus del rebaño más cercano



(positivo/negativo), así como su aptitud productiva, también fueron incluidos en el análisis univariable a nivel de rebaño.

Para la identificación de factores de riesgo asociados con resultados serológicos positivos a nivel individual únicamente se tuvieron en cuenta los resultados de rebaños positivos ( $n = 330$ ).

Las variables en las cuales se detectó una posible asociación ( $p \leq 0,25$ ) en los modelos univariados fueron incluidas como potenciales predictores (efectos fijos) en los correspondientes modelos multivariados de regresión logística a nivel individual o de rebaño, de la siguiente forma:

$$\text{Individual: } \log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_k x_k$$

$$\text{Rebaño: } \log\left(\frac{p_{ij}}{1-p_{ij}}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_{1,j} + \dots + \beta_k x_{k,j} + \alpha_i$$

Donde  $p_{i,j}$  indica la probabilidad que los animales de una determinada granja  $i$  perteneciente a un municipio  $j$  tienen de ser seropositivos.  $\beta_0$  representa la constante origen y  $\beta_1, \dots, \beta_k$  son los coeficientes asociados con las  $X_k$  variables a nivel individual en la primera ecuación y a nivel de rebaño observadas en una granja  $i$  de un municipio  $j$  en la segunda.

En el modelo a nivel de rebaño se exploró el efecto de la inclusión de la delegación como posible efecto aleatorio ( $\alpha_i$ ), mientras que el factor aleatorio rebaño se incluyó en el modelo a nivel individual en todos los casos. El modelo final se construyó mediante un proceso de eliminación de pasos hacia atrás (*backward stepwise elimination*) aplicando un p-valor de 0,05 para la inclusión en el modelo y 0,10 para su exclusión. Debido a que la evaluación de un gran número de interacciones puede dar lugar a la identificación de asociaciones falsas (Dohoo *et al.*, 2003), solo se tuvieron en cuenta las interacciones de segundo nivel cuya asociación con los resultados serológicos se hubiera identificado previamente en otros estudios o tuviera un sentido biológico, seleccionando aquellas en las que se identificaba un p-valor  $< 0,05$ .

La selección entre varios posibles modelos finales anidados y no anidados se realizó mediante pruebas de verosimilitud (*likelihood ratio test*) y la comparación del criterio de información de Akaike (*Akaike Information Criteria*, AIC), respectivamente. La bondad de ajuste del modelo final fue evaluada mediante el test de Hosmer y Lemeshow (Hosmer y

Lemeshow, 1989). Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante el programa R (R development core team, 2011) y la evaluación del modelo de efectos mixtos se realizó utilizando el paquete lme4 en R (Bates *et al.*, 2011).

#### **4.4.3.3. Estudio 3. Seroprevalencias, distribución y factores de riesgo asociados a la exposición a *C. burnetii* en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid**

En este estudio, con el fin de identificar aquellos factores de riesgo asociados con la obtención de resultados positivos a fiebre Q en el test ELISA se desarrollaron modelos epidemiológicos a nivel individual y de rebaño siguiendo la misma metodología descrita para el estudio 2.

##### **Análisis a nivel de explotación**

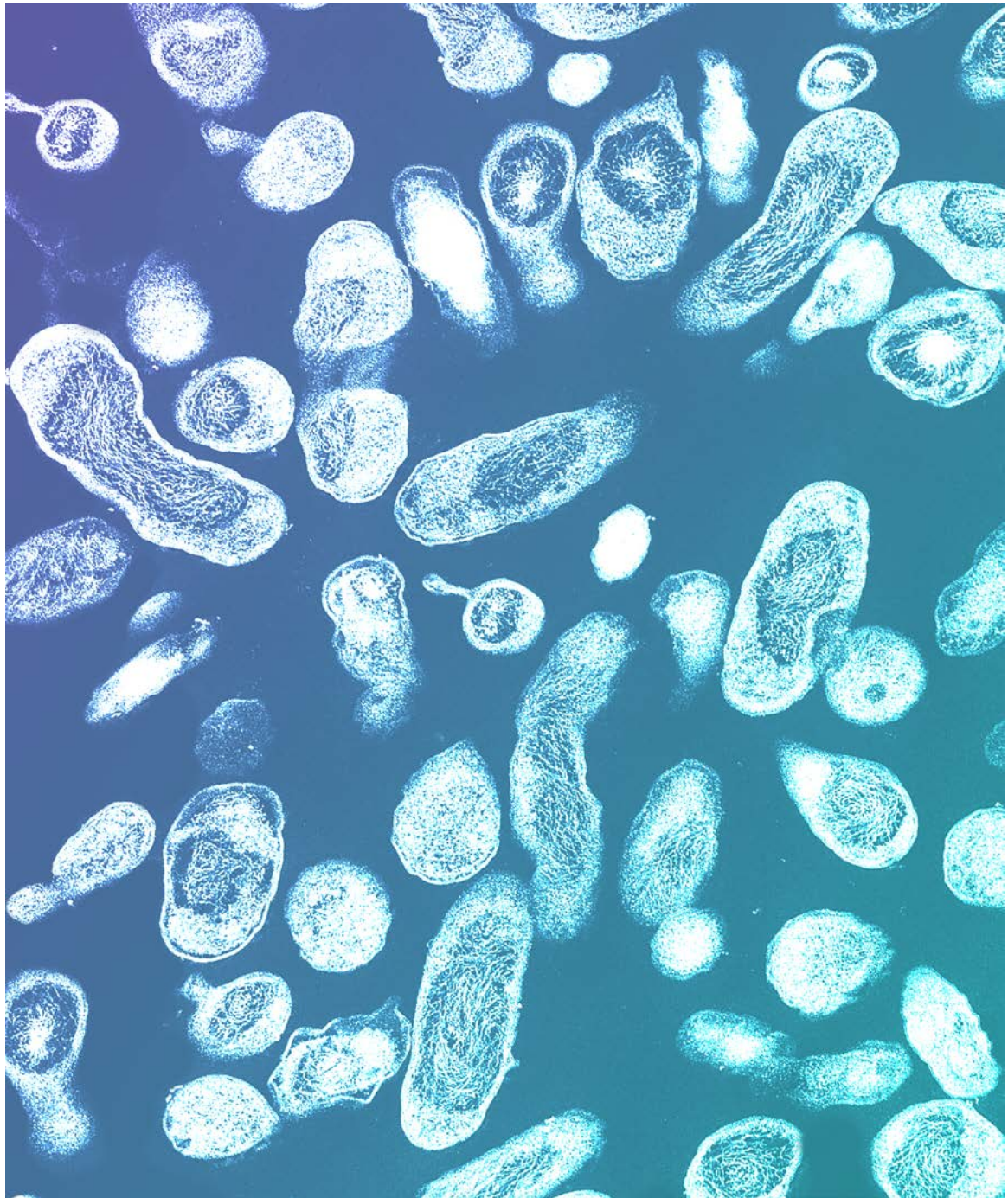
En el **análisis univariable** a nivel de explotación, la selección de las variables aptitud productiva del rebaño, especie y censo, potencialmente analizadas con la respuesta (positividad a nivel de explotación, definida como la presencia de al menos un animal positivo) se realizó mediante modelos de regresión logística. Tal como se describió para el estudio 2, se evaluaron las posibles asociaciones entre las características e individuales que podían estar potencialmente relacionadas con los resultados serológicos en modelos univariados. Para ello se empleó el test chi-cuadrado en el caso de las variables categóricas y el análisis de la varianza (ANOVA) para las variables continuas una vez evaluada su normalidad. La variable especie se evaluó de tres formas diferentes: por un lado, se clasificaron las explotaciones en rebaños ovinos, caprinos o mixtos. Alternativamente se exploraron dos clasificaciones alternativas dicotómicas, en la que las explotaciones quedaban definidas como “con presencia de ovejas” (sí/no) o “con presencia de cabras” (sí/no) con el fin de determinar la influencia de la presencia o ausencia de cada una de las especies en la seropositividad a nivel de rebaño. En cuanto al censo, fue evaluado como variable continua, en su forma original y tras aplicar una transformación logarítmica y como variable categórica clasificada en cuartiles. En dicho análisis univariable, las variables que mostraron un valor  $p < 0,25$  fueron seleccionadas para su inclusión en el **análisis multivariable** tras un análisis previo para eliminar variables altamente correlacionadas utilizando el test de chi-cuadrado o de correlación de Spearman en función de su naturaleza. Para valorar un posible efecto espacial se evaluó también la inclusión de la delegación como efecto aleatorio. Los intervalos de

confianza de los coeficientes de los modelos mixtos se determinaron utilizando 10 000 *bootstraps*.

El modelo final se eligió mediante la comparación de los valores de AIC y de su poder predictivo, determinado utilizando una curva ROC. La bondad de ajuste del modelo se analizó mediante el test de Hosmer-Lemeshow.

### **Análisis a nivel individual**

Este análisis se llevó a cabo del mismo modo al descrito para el análisis a nivel de explotación, evaluando las variables especie, aptitud productiva y edad de los animales, esta última tanto en su forma original y tras aplicar una transformación logarítmica y como variable categórica clasificada en cuartiles. Asimismo, se evaluó la inclusión del rebaño de origen como efecto aleatorio.



## **RESULTADOS**

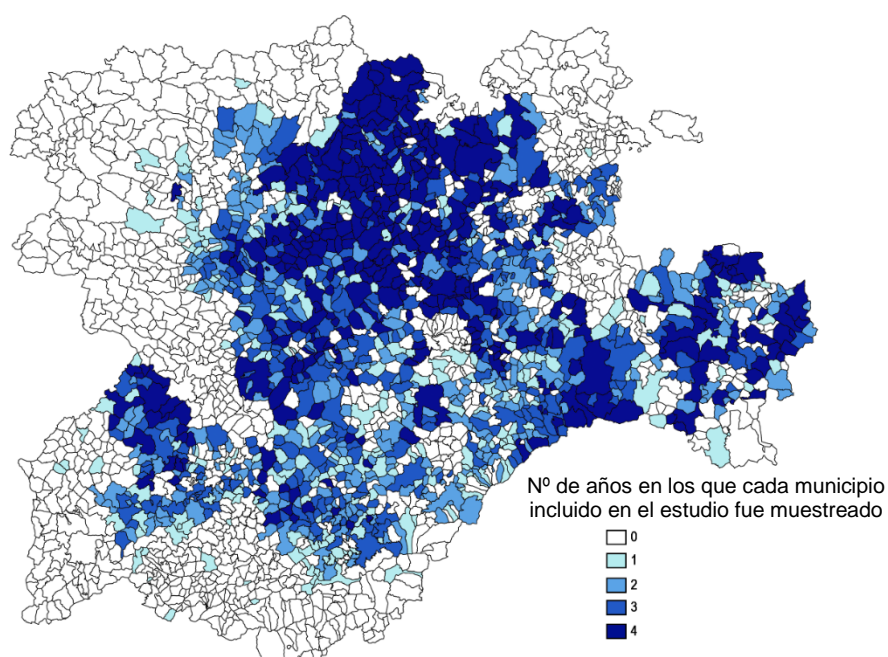


## 5. RESULTADOS

### 5.1. ESTUDIO 1. SEROPREVALENCIAS, DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN A *C. burnetii* DEL GANADO OVINO DE CASTILLA Y LEÓN

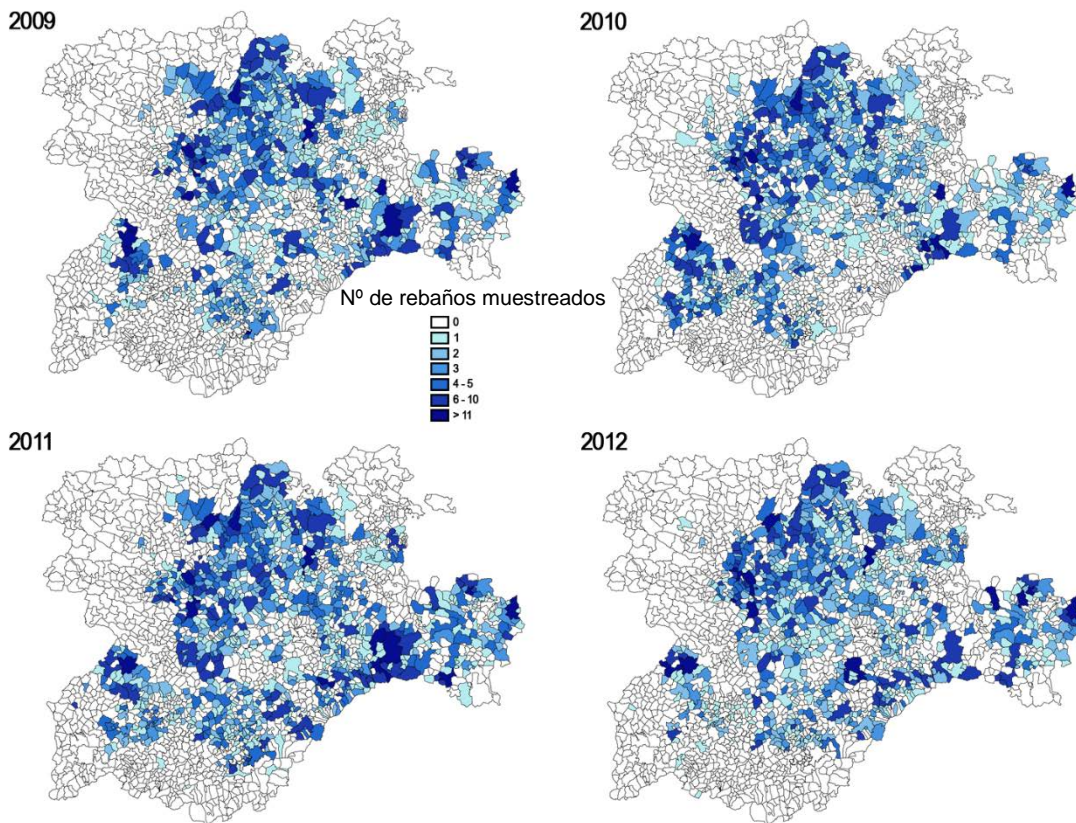
#### 5.1.1. Análisis descriptivo

El número total de rebaños que fueron seleccionados aleatoriamente e incluidos en el estudio fue de 1972 en 2009 (procedentes de 704 municipios), 2049 en 2010 (procedentes de 746 municipios), 2219 en 2011 (procedentes de 795 municipios) y 2039 en 2013 (procedentes de 744 municipios) (Tabla 15). Asimismo, el número total de municipios diferentes analizados en el estudio fue 1163, teniendo en cuenta que hubo municipios que se muestrearon en más de un año (Figura 12). El número de explotaciones muestreadas por municipio fue muy variable, oscilando entre una y 25 explotaciones, aunque la media para los cuatro años de estudio fue de 2,7 explotaciones por municipio y la mediana fue de dos explotaciones (Figura 13).



**Figura 12.** Distribución de los municipios de Castilla y León incluidos en el estudio durante los cuatro años del mismo (2009-2012) y representación del número de años en los que cada municipio fue muestreado.

El número de explotaciones de ovino censadas en los municipios muestreados osciló entre una y 68, con una media de 9,5 y una mediana de siete explotaciones. Respecto a las explotaciones de caprino, estos valores fueron claramente inferiores, con una media de una explotación de caprino y una mediana de cero explotaciones.



**Figura 13.** Número de rebaños ovinos muestreados por municipio de Castilla y León incluidos en el estudio durante los cuatro años del mismo.

El número total de rebaños diferentes incluidos en algún momento durante el estudio fue 4520, de los cuales, 2168 se muestrearán en una única ocasión, 1284 se muestrearán en dos años diferentes, 729 en tres años y 339 en los cuatro años del estudio.

Respecto a los ovinos incluidos en el estudio, se recogieron un total de 26 387, 26 684, 28 128 y 26 486 muestras de suero en los años 2009, 2010, 2011 y 2012, respectivamente (un total de 107 685 muestras analizadas en los cuatro años de estudio). La media y mediana de animales muestreados por explotación fue de 13 y 14 individuos [rango intercuartílico (RIQ) = 13 - 14], respectivamente, si bien el número de animales muestreados por explotación osciló entre diez y 29 en los rebaños con un censo igual o superior a diez cabezas. En explotaciones con menos de diez animales, se muestreó todo el censo. En cuanto al número de pequeños rumiantes (ovejas y cabras) censados en los cuatro años de estudio por cada municipio de Castilla y León, a pesar de haber tenido lugar un descenso general en el número de cabezas desde 2009 hasta 2012 en la región (Figura 2), no se observaron diferencias estadísticamente significativas (test de Friedman,

$p > 0,05$ ) en cuanto al número de pequeños rumiantes por municipio en los cuatro años de estudio.

El censo de los rebaños muestreados osciló entre una y 4250 ovejas (de mediana de 256, RIQ = 92-460). Del total de rebaños muestreados de los que se dispuso información respecto a la aptitud productiva (el 99,4% del total), 2571 (57%) eran de aptitud cárnica y 1921 de aptitud láctea (43%). En lo que respecta al tipo de manejo, del total de 4189 rebaños en los que se dispuso de información relativa a dicho aspecto productivo (el 95% de los mismos), 2367 (56,5%), 1498 (35,8%) y 324 (7,7%) eran de tipo mixto, extensivo e intensivo, respectivamente. En cuanto a la época de muestreo y teniendo en cuenta que este dato no estuvo disponible para los rebaños muestreados en 2010, un total de 483 (7,7%) explotaciones fueron muestreadas entre los meses de enero a marzo, 2252 (35,7%) de abril a junio, 2655 (42,1%) de julio a septiembre y 914 (14,5%) de octubre a diciembre, respectivamente.

En las Tablas 15 y 17 se resumen los resultados serológicos obtenidos en los cuatro años de estudio. La seroprevalencia osciló entre un 11% y un 21% individual y entre un 57% y un 76% en rebaño, dependiendo del año. La mediana del número de ovinos seropositivos por explotación fue de un individuo de 2009 a 2011 y dos en 2012 teniendo en cuenta todas las explotaciones muestreadas, y de dos individuos de 2009 a 2011 y tres en 2012 contemplando únicamente los rebaños con algún ovino positivo. Por otro lado, el porcentaje de municipios con al menos un rebaño positivo osciló entre el 74% y el 84%, también dependiendo del año.

En lo que respecta a la seroprevalencia de rebaño en función de las distintas variables de las que se dispuso de información (Tabla 17), el porcentaje de rebaños positivos fue significativamente más elevado (test de chi-cuadrado,  $p < 0,001$ ) en rebaños de leche respecto a los de carne en los cuatro años del estudio (entre un 67% y un 84% en los rebaños de leche frente a 31% - 67% en los de carne, dependiendo del año). En esta misma línea, el número de animales reactores observados por explotación fue superior en el caso de los rebaños de leche respecto a los de carne en los cuatro años de estudio (Tabla 16), siendo estas diferencias estadísticamente significativas en los cuatro años de estudio (Test de Mann-Whitney,  $p < 0,01$  en los cuatro años).

Asimismo, también pudo observarse un mayor porcentaje de rebaños positivos en explotaciones con mayor censo: del 43% al 61% de rebaños positivos para aquellos con censo incluido en el primer cuartil, y del 63% al 85% en rebaños del cuarto cuartil, dependiendo del año (Tabla 17). Así, en los cuatro años de estudio se observó una



diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de rebaños positivos en el cuartil 1 y el resto de cuartiles (test Z de comparaciones múltiples,  $p < 0,05$ ), observándose también en el año 2012 una diferencia entre el cuartil 4 y el 2. Asimismo, en los cuatro años de estudio pudo observarse también la existencia de un número significativamente menor (test ANOVA ajustado por el método de Bonferroni,  $p < 0,001$ ) de animales positivos en explotaciones más pequeñas (cuartil 1) respecto a los otros tres cuartiles, así como una tendencia al aumento de animales positivos por explotación en los cuartiles superiores (Tabla 16), si bien entre estos no se observaron diferencias estadísticamente significativas (test ANOVA ajustado por el método de Bonferroni,  $p > 0,05$ ).

Respecto al sistema de explotación, la proporción de rebaños positivos entre aquellos de tipo intensivo/mixto fue superior a la de los rebaños de tipo extensivo en los cuatro años de estudio, oscilando en el primer caso entre el 60% y el 78%, y entre el 52% y el 74% en el segundo, dependiendo del año (Tabla 17). Sin embargo, la diferencia entre el porcentaje de rebaños positivos en función del sistema de explotación solo fue estadísticamente significativa en los años 2010 y 2011 (test de chi-cuadrado,  $p < 0,001$ ). También en este caso el número medio de ovinos positivos por explotación fue superior en los rebaños de tipo intensivo/mixto respecto a los de tipo extensivo (Tabla 16). Esta diferencia fue estadísticamente significativa en los cuatro años de estudio (test de Mann-Whitney,  $p < 0,01$ ).

La desigual distribución de los muestreos a lo largo del año tanto dentro de cada año de estudio como entre los distintos años dificultó el análisis de los resultados serológicos en función de la época de muestreo. Con el fin de facilitar el análisis, los resultados se clasificaron en dos grupos en función del semestre del año en el que se había realizado el muestreo. Las diferencias observadas en el porcentaje de rebaños positivos entre ambos semestres fueron estadísticamente significativas en dos de los tres años de estudio en los que se dispuso de información de muestreo, si bien el sentido fue diferente en función del año. Así, tanto en 2009 como en 2011 se observó un mayor porcentaje de rebaños positivos en el segundo semestre (66% y 79%, respectivamente, frente a un 62% y un 54%), si bien la diferencia entre el porcentaje de positivos en ambos periodos solo fue estadísticamente significativa en 2011 (test de chi-cuadrado,  $p_{2009} = 0,08$ .  $p_{2011} < 0,001$ ) (Tabla 17). Por contra, en 2012 fue en el primer semestre donde se observaron mayores porcentajes de rebaños positivos (84% frente a 72%, test de chi-cuadrado,  $p = 0,01$ ) (Tabla 17). El número de animales positivos en rebaños positivos siguió la misma tendencia, de modo que en 2009 y en 2011 se observó un mayor número medio de ovinos positivos entre aquellos muestreados en el segundo semestre del año (Tabla 16), (test de

Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ), mientras que en 2012 el número fue mayor en el primer semestre (test de Mann-Whitney,  $p = 0,005$ ). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que el número de rebaños muestreados en el primer semestre de 2012 fue sensiblemente menor que en el segundo (186 vs. 1853) (Tabla 17).

**Tabla 15.** Resultados serológicos a nivel de municipio, de rebaño e individual de los ovinos procedentes de explotaciones de Castilla y León muestreados durante los años 2009-2012. 95% IC: intervalo de confianza al 95%.

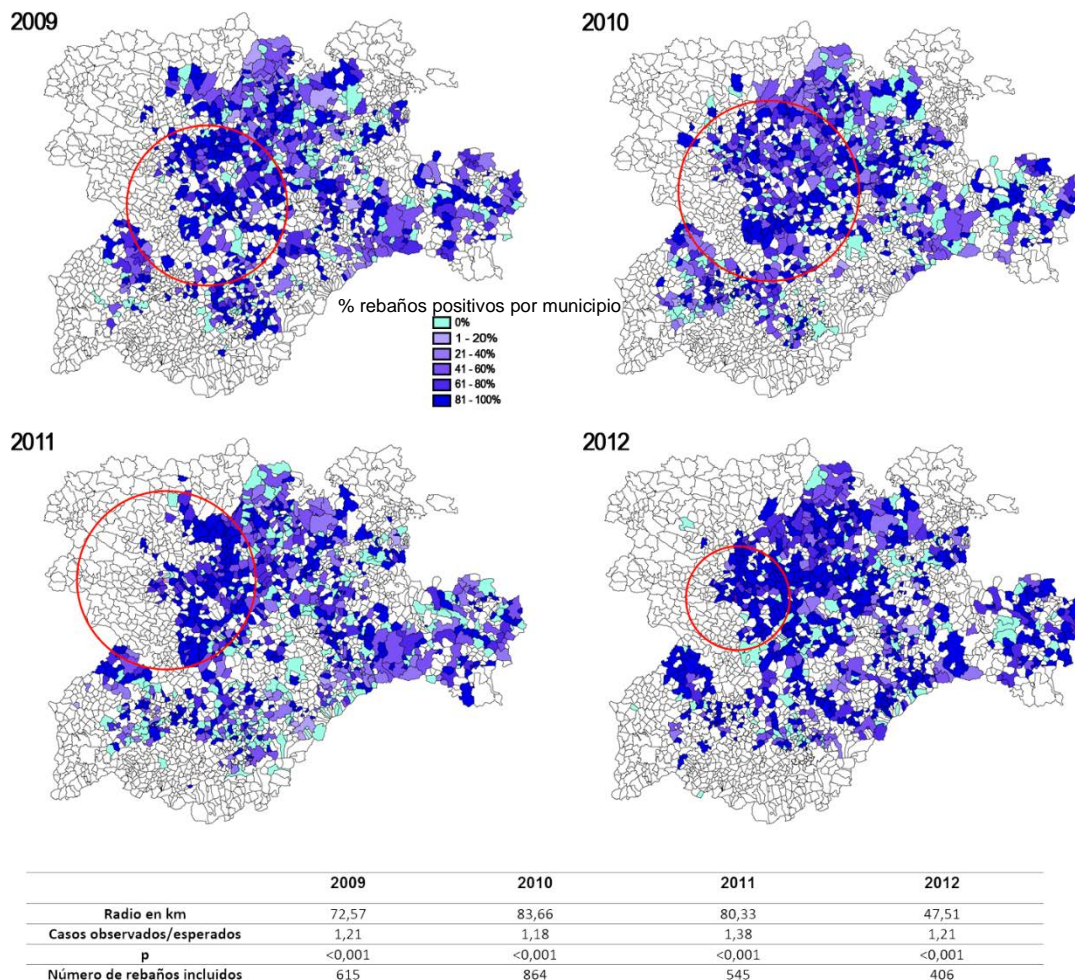
		2009	2010	2011	2012
<b>Municipio</b>	<b>Positivos</b>	570	556	586	627
	<b>Muestreados</b>	714	746	795	744
	<b>% positivos</b>	<b>80%</b>	<b>75%</b>	<b>74%</b>	<b>84%</b>
	<b>95% IC</b>	76,7-82,7	71,2-77,6	70,5-76,7	81,5-86,8
<b>Rebaño</b>	<b>Positivos</b>	1277	1164	1318	1555
	<b>Muestreados</b>	1972	2049	2219	2039
	<b>% positivos</b>	<b>65%</b>	<b>57%</b>	<b>59%</b>	<b>76%</b>
	<b>95% IC</b>	62,6-66	54,6-58,9	57,3-61,5	74,4-78,1
<b>Individual</b>	<b>Positivos</b>	3507	2824	3896	5574
	<b>Muestreados</b>	26387	26684	28128	26486
	<b>% positivos</b>	<b>13%</b>	<b>11%</b>	<b>14%</b>	<b>21%</b>
	<b>95% IC</b>	12,9-13,7	10,2-11	13,5-14,3	20,6-21,5

**Tabla 16.** Número medio de ovinos seropositivos por explotación muestreada en función de cada una de las variables a nivel de rebaño disponibles en rebaños de Castilla y León muestreados entre los años 2009 y 2012. Entre paréntesis se indica el intervalo de confianza al 95%.

		2009	2010	2011	2012
<b>Aptitud</b>	<b>Carne</b>	1,42 (1,30 - 1,53)	1,04 (0,94 - 1,13)	1,30 (1,19 - 1,40)	2,36 (2,20 - 2,51)
	<b>Leche</b>	2,18 (2,03 - 2,33)	1,75 (1,63 - 1,88)	2,40 (2,23 - 2,6)	3,16 (2,99 - 3,33)
<b>Censo</b>	<b>Cuartil 1</b>	1,15 (1,00 - 1,30)	0,87 (0,75 - 0,98)	1,18 (1,02 - 1,35)	1,91 (1,71 - 2,11)
	<b>Cuartil 2</b>	2,01 (1,79 - 2,24)	1,38 (1,22 - 1,54)	2,08 (1,88 - 2,29)	2,94 (2,70 - 3,17)
	<b>Cuartil 3</b>	1,94 (1,76 - 2,11)	1,66 (1,48 - 1,83)	1,76 (1,57 - 1,96)	2,88 (2,66 - 3,09)
	<b>Cuartil 4</b>	2,01 (1,82 - 2,20)	1,61 (1,44 - 1,78)	2 (1,81 - 2,19)	3,22 (2,98 - 3,46)
<b>Manejo</b>	<b>Extensivo</b>	1,53 (1,39 - 1,67)	1,16 (1,04 - 1,28)	1,31 (1,18 - 1,43)	2,54 (2,35 - 2,73)
	<b>Mixto/intensivo</b>	1,90 (1,77 - 2,02)	1,50 (1,40 - 1,61)	2,04 (1,91 - 2,18)	2,85 (2,70 - 2,99)
<b>Época del año</b>	<b>1<sup>er</sup> semestre</b>	1,70 (1,54 - 1,88)	Información	1,32 (1,23 - 1,40)	3,28 (2,86 - 3,70)
	<b>2<sup>o</sup> semestre</b>	1,83 (1,71 - 1,95)	no disponible	3,23 (2,97 - 3,49)	2,68 (2,56 - 2,80)

### 5.1.2. Análisis espacial

Los resultados del test de Cuzick y Edwards en los cuatro años de estudio pusieron de manifiesto la existencia de una agregación de carácter global de los municipios positivos (es decir, aquellos con al menos una explotación positiva). Esta asociación se observó hasta el cuarto nivel de vecindad en 2012, hasta el tercer nivel en 2010 y 2011 y hasta el segundo nivel en 2009. Asimismo, en lo que respecta a la agregación espacial de tipo local, el test de Bernoulli identificó un *cluster* estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) de alta prevalencia de fiebre Q en los cuatro años de estudio en la misma región (zona noroeste de la misma) (Figura 14). En estos, el ratio de municipios positivos observados respecto a los esperados osciló entre 1,18 y 1,21 y el radio de los mismos varió entre 75 y 83 km, dependiendo del año.



**Figura 14.** Localización y características de los *clusters* de alta incidencia de fiebre Q detectados en cada uno de los años de estudio en rebaños ovinos de Castilla y León. El centroide y la extensión de cada *cluster* está representado por el punto y el círculo rojo en cada mapa, respectivamente.

### 5.1.3. Análisis de regresión logística a nivel de rebaño

#### 5.1.3.1. Análisis univariable

Las variables incluidas en el modelo final de cada año de estudio variaron: en 2009 se incluyeron la aptitud productiva y el censo, en 2010, además de las dos anteriores también el manejo, en 2011 la aptitud productiva, el censo, la época de muestreo y el manejo y en 2012 únicamente el censo (Tabla 17).

Los animales pertenecientes a rebaños de aptitud láctea mostraron un mayor riesgo de presentar un resultado positivo en el test ELISA frente a *C. burnetii* en comparación con los de rebaños de aptitud cárnica, con valores de *odds ratio* que variaron entre 2,75 y 1,29, dependiendo del año (Tabla 17).

Del mismo modo, los ovinos procedentes de rebaños con mayor censo presentaron también mayor riesgo de seropositividad. Así, los animales cuya explotación de origen presentaba un censo incluido en el cuarto cuartil de su año presentaban un valor de *odds ratio* de entre 1,59 y 2,32 respecto a los rebaños de menor tamaño (incluidos en el cuartil 1, categoría de referencia) dependiendo del año (Tabla 17).

Respecto al manejo productivo, los ovinos procedentes de explotaciones con un manejo intensivo/mixto presentaron mayor riesgo de presentar un resultado serológico positivo que los procedentes de explotaciones de tipo puramente extensivo, con valores de *odds ratio* entre 1,35 y 2,49 (tabla 17).

Finalmente, en cuanto a la época del año en la que se realizó el muestreo, en 2009 y 2011 se observó un mayor riesgo de obtener un resultado positivo en animales muestreados en el segundo semestre del año (Tabla 17). En el caso de 2012 y debido a la importante diferencia en las proporciones de explotaciones muestreadas en uno y otro semestre, no se consiguió que el modelo convergiera.

**Tabla 17.** Estimaciones de las distribuciones posteriores [mediana e intervalos posteriores de probabilidad al 95% (IPP)] de las *odds ratio* (OR) en el análisis univariable para los ovinos positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en función de las características de rebaño en explotaciones de Castilla y León en los años 2009-2012. NA = no aplicable.

Variable de rebaño	Categoría	2009			2010			2011			2012		
		positivos/ muestrados (% positivos)	OR (95% IPP)	positivos/ muestrados (% positivos)	OR (95% IPP)	positivos/ muestrados (% positivos)	OR (95% IPP)	positivos/ muestrados (% positivos)	OR (95% IPP)	positivos/ muestrados (% positivos)	OR (95% IPP)		
Aptitud	Carne	606+/2044 (31%)	1	510+/1071 (48%)	1	657+/1293 (51%)	1	754+/1082 (70%)	1	1	1		
	Leche	671+/928 (72%)	1,77 (1,30-2,46)	654+/978 (67%)	2,02 (1,53-2,73)	661+/926 (71%)	2,75 (1,90-3,99)	801+/957 (84%)	1,29 (0,80-2,07)	1,29 (0,80-2,07)	1,29 (0,80-2,07)		
Censo (en cuartiles)	1	248+/495 (50%)	1	Censo 3-195 220+/512 (43%)	1	Censo 1-57 257+/560 (46%)	1	Censo 1-66 316+/514 (61%)	1	1	1		
	2	Censo 169-331 323+/492 (66%)	2,16 (1,45-3,43)	Censo 196-357 295+/514 (57%)	1,81 (1,28-2,74)	Censo 58-141 362+/550 (66%)	2,03 (1,27-3,27)	Censo 67-171 391+/509 (77%)	1,55 (0,82-2,92)	1,55 (0,82-2,92)			
	3	Censo 332-507 350+/494 (71%)	1,76 (1,18-2,72)	Censo 358-556 325+/511 (64%)	2,55 (1,73-3,90)	Censo 142-345 330+/555 (99%)	1,63 (1,00-2,61)	Censo 172-380 419+/512 (82%)	1,32 (0,71-2,38)	1,32 (0,71-2,38)			
	4	Censo 508-3191 356+/491 (73%)	1,98 (1,33-3,13)	Censo 557-3452 324+/512 (63%)	2,32 (1,58-3,49)	Censo 346-4250 369+/554 (67%)	1,59 (0,98-2,53)	Censo 381-3400 429+/504 (85%)	1,89 (1,00-4,10)	1,89 (1,00-4,10)			
Manejo	Extensivo	423+/670 (63%)	1	359+/696 (52%)	1	441+/833 (53%)	1	455+/612 (74%)	1	1	1		
	Intensivo/ mixto	798+/1218 (66%)	1,35 (0,96-1,97)	745+/1242 (60%)	1,48 (1,09-2,02)	836+/1304 (64%)	2,49 (1,67-4,04)	1000+/1283 (78%)	1,39 (0,84-2,13)	1,39 (0,84-2,13)			
Época del año	1er semestre	478+/766 (62%)	1	Datos no disponibles		916+/1709 (54%)	1	156+/186 (84%)	1	Ausencia de ajuste	Ausencia de ajuste		
	2º semestre	799+/1206 (66%)	1,15 (0,82-1,58)	Datos no disponibles		402+/510 (79%)	4,88 (3,02-10,76)	1339+/1853 (72%)	4,88 (3,02-10,76)	1339+/1853 (72%)			

### 5.1.3.2. Análisis multivariable

En la Tabla 18 se indican aquellas variables que fueron incluidas en el modelo final para cada año de estudio dado que ofrecían un mejor ajuste de modelo de acuerdo al valor DIC y a la evidencia de asociación con el resultado serológico, determinado por los intervalos posteriores de probabilidad. Asimismo, en las Figuras 15.A – 16.C se representan gráficamente los resultados de *odds ratio* e intervalos de probabilidad de dichas variables seleccionadas en cada año de estudio. A nivel de explotación, las variables que se incluyeron fueron la aptitud productiva y el tamaño de rebaño en los años 2009 a 2011, y en este último año, además, la época de muestreo y el manejo productivo. Esta última variable fue la única que se asoció con los resultados en el año 2012, donde si bien la asociación era débil, la inclusión de dicha variable mejoraba el ajuste del modelo en términos del valor DIC.

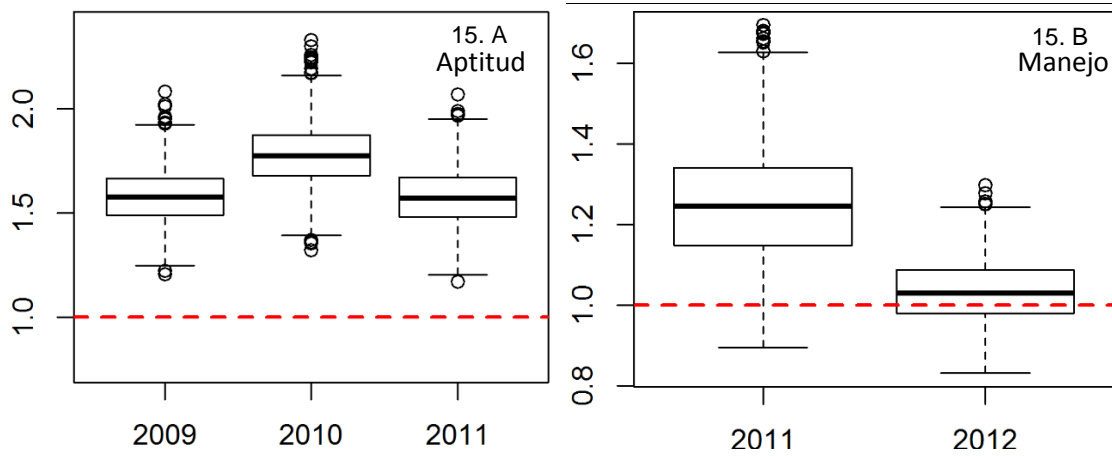
Tanto en 2009 como en 2010 la variable más fuertemente asociada a los resultados serológicos fue la aptitud productiva, siendo mayor el riesgo de obtener un resultado positivo en el test ELISA frente a fiebre Q en animales de aptitud láctea frente a los de aptitud cárnica. Por otro lado, en cuanto al tamaño de rebaño, en ambos años se observó un aumento progresivo del riesgo en los cuartiles 2, 3 y 4 respecto al cuartil 1, lo que puso de manifiesto que el riesgo de obtener un resultado positivo en un animal fue mayor al aumentar el tamaño de rebaño. En el caso del año 2011, sin embargo, la variable más fuertemente asociada a los resultados serológicos, por encima de la aptitud productiva y el censo, fue la época de muestreo de los animales. Así, los individuos muestreados en el segundo semestre del año presentaban un mayor riesgo de resultar seropositivos en el test ELISA. También en 2011 fue el único año en el que modelo retuvo la variable del manejo productivo (puramente extensivo frente a intensivo/mixto), observándose una cierta asociación respecto a los resultados serológicos (IPP 95% 0,99 – 1,53) de modo que el riesgo se incrementaba en animales procedentes de explotaciones con cierto grado de intensificación en su producción.

En cuanto a las variables a nivel de municipio, la que resultó en un mejor ajuste en los cuatro años de estudio fue la densidad de pequeños rumiantes (ovejas y cabras) y por ello fue la única retenida en el modelo final, a pesar de que la estimación posterior de la asociación entre los resultados serológicos y esta variable con frecuencia estaba alrededor del valor 0 (ausencia de asociación), particularmente en el 2010. A pesar de ello se incluyó en el modelo debido al DIC equivalente obtenido al excluirla, y para facilitar la interpretación de los resultados en comparación con otros años. En general un aumento de la densidad de pequeños rumiantes en el municipio resultó en un incremento en el efecto del municipio de origen en favor de mayor riesgo de positividad.

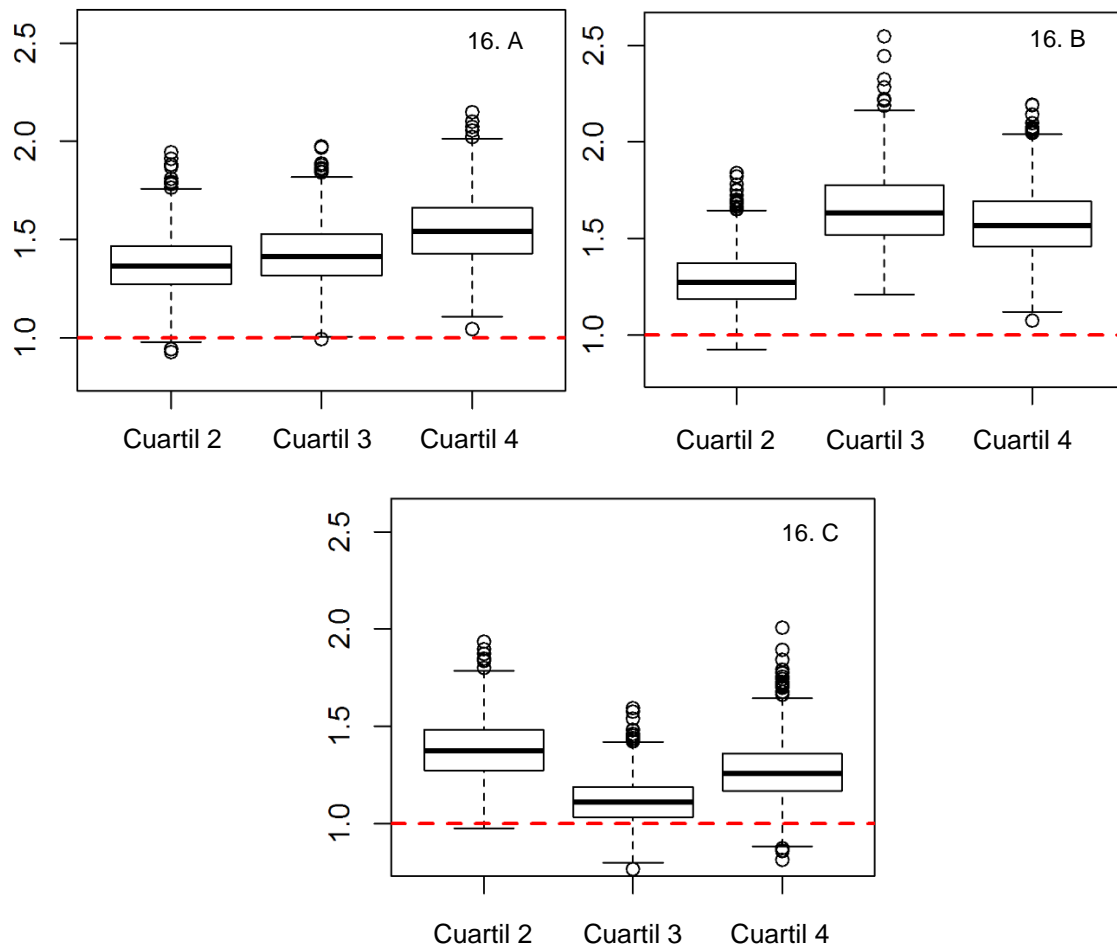
## RESULTADOS

**Tabla 18.** Estimaciones de las distribuciones posteriores [mediana e intervalos posteriores de probabilidad al 95% (IPP)] de las *odds ratio* (OR) en el análisis multivariable para los ovinos positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en función de las características de rebaño y de municipio en explotaciones de Castilla y León en los años 2009-2012. NA = no aplicable.

Variable	Categoría	2009	2010	2011	2012	
		OR (95% IC)	OR (95% IC)	OR (95% IC)	OR (95% IC)	
Nivel explotación	Aptitud	Carne	1	1	1	NA
		Leche	<b>1,57</b> (1,34 – 1,84)	<b>1,77</b> (1,51 – 2,08)	<b>1,57</b> (1,32 – 1,87)	NA
	Censo (en cuartiles)	1	1	1	1	NA
		2	<b>1,36</b> (1,12 – 1,69)	<b>1,27</b> (1,03 – 1,57)	<b>1,37</b> (1,11 – 1,71)	NA
		3	<b>1,41</b> (1,15 – 1,74)	<b>1,63</b> (1,33 – 2,04)	1,11 (0,89 – 1,36)	NA
		4	<b>1,54</b> (1,25 – 1,91)	<b>1,57</b> (1,26 – 1,97)	1,26 (0,97 – 1,60)	NA
	Manejo	Extensivo	NA	NA	1	1
		Intensivo/ mixto	NA	NA	1,25 (0,99 – 1,53)	1,03 (0,88 – 1,21)
	Época del año	1er semestre	NA	NA	1	NA
		2º semestre	NA	NA	<b>2,84</b> (2,38 – 3,37)	NA
	Nivel municipio	Densidad de animales	1	1	1	1
			0,035 (-0,04 – 0,11)	-0,01 (-0,08 – 0,07)	0,06 (-0,01 – 0,14)	0,17 (0,09 – 0,25)



**Figuras 15.A y 15.B.** Representación gráfica de los resultados de *odds ratio* e intervalos posteriores de probabilidad asociados a la aptitud productiva [cárnica (categoría de referencia) vs. láctea] (figura 15.A) y del manejo [intensivo o mixto (categoría de referencia) vs. extensivo] (figura 15.B) estimados mediante un modelo multivariable sobre datos de ovinos de Castilla y León positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en los años en los que dichas variables se asociaron con la variable respuesta. La línea roja discontinua representa la ausencia de asociación (OR = 1).

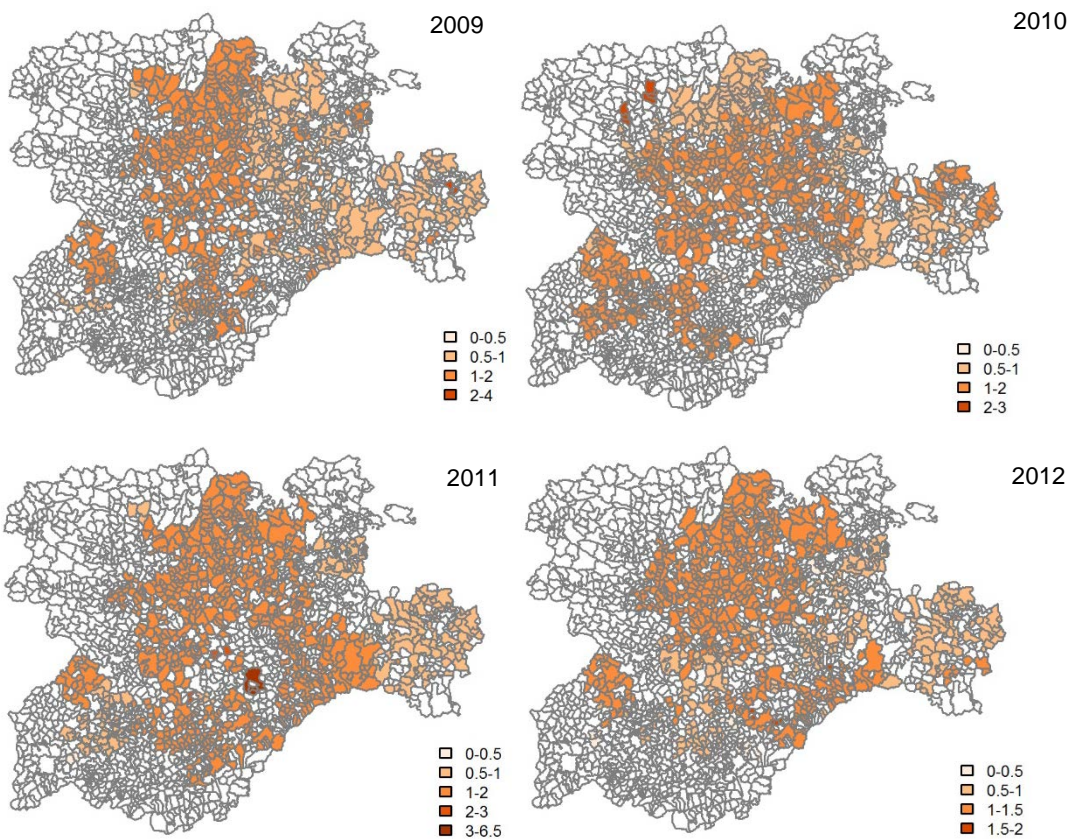


**Figuras 16. A, 16. B y 16.C.** Representación gráfica de los resultados de *odds ratio* e intervalos posteriores de probabilidad asociados al tamaño de rebaño clasificado en cuartiles en los años 2009 (figura 16.A), 2010 (figura 16.B), y 2011 (figura 16.C) estimados mediante un modelo multivariable sobre datos de ovinos de



Castilla y León positivos al test ELISA frente a *C. burnetii*. La línea roja discontinua representa la ausencia de asociación (OR = 1).

El otro componente del efecto de municipio, el factor aleatorio con estructura espacial  $S_j$ , contribuyó también a explicar el riesgo espacial, distribuyéndose de manera heterogénea en la región de estudio (Figura 17). En líneas generales los valores de  $S_j$  fueron superiores en la mitad oeste de la región respecto a la zona este de la misma, si bien la distribución varió hasta cierto punto de un año a otro.



**Figura 17.** Distribución de los valores medianos del factor aleatorio con estructura espacial  $S_j$  estimado mediante un modelo multivariable en las regiones de estudio durante los cuatro años de estudio en rebaños ovinos de Castilla y León (2009-2012).

La convergencia alcanzada en los modelos finales seleccionados en los cuatro años fue adecuada de acuerdo al número de simulaciones independientes ( $> 100$ ) y el valor de  $\hat{R}$  estimado para todos los parámetros ( $< 1,1$ ). No obstante, se observó una tendencia a sobreestimar y subestimar el riesgo en aquellas explotaciones sin casos positivos y con números inusualmente elevados de positivos, respectivamente. A pesar de ello las pruebas de comparación predictiva del modelo revelaron un ajuste general adecuado del mismo a los datos.

Finalmente, en cuanto a los valores residuales del modelo, 2009 fue el único año en el que se observó un patrón de autocorrelación espacial estadísticamente significativa (test de Moran,  $p < 0,05$ ), mientras que en el resto de los años no se observó dicho patrón ( $p > 0,05$ ).

## 5.2. ESTUDIO 2. SEROPREVALENCIAS, DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN A *C. burnetii* EN GANADO BOVINO DE LA COMUNIDAD DE MADRID

### 5.2.1. Análisis descriptivo

De las 110 explotaciones incluidas en el estudio, 72 (65,4%), 20 (18,2%) y 18 (16,4%) fueron rebaños de aptitud cárnica, láctea y de lidia, respectivamente (Tabla 19). El tamaño de rebaño osciló entre 10 y 1219 animales, con una media de 54.

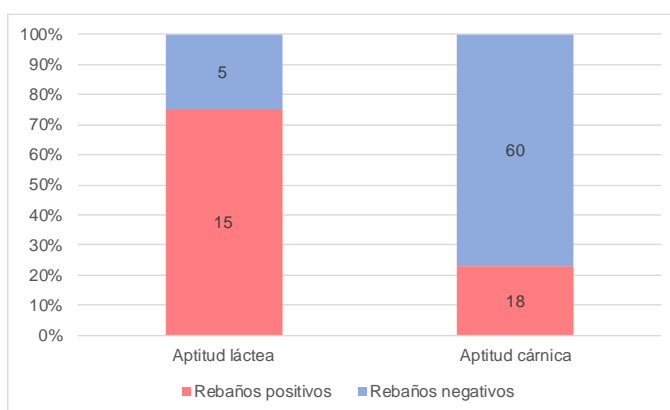
A nivel individual pudo obtenerse información de 1090 animales del total de los 1100 bovinos muestreados, de los cuales el 92% eran hembras. La mayoría de los animales del estudio pertenecían a razas mixtas, ( $n = 445$ ), si bien otras razas presentes fueron la Holstein ( $n = 188$ ), la raza de lidia ( $n = 175$ ), la Avileña ( $n = 68$ ) y la Limusin ( $n = 63$ ).

En cuanto a la edad, hubo seis animales por debajo de los 12 meses de edad se muestrearon por error, por lo que fueron excluidos del estudio. Una vez excluidos estos, la edad media de edad entre los animales estudiados fue de 6,4 años (con rangos de edades de entre 12 meses a 22 años y una mediana de 5,4 años), siendo esta significativamente diferente dependiendo del tipo de producción. Así, los animales de aptitud cárnica presentaban una media de edad superior a los de lidia y estos a los de aptitud láctea [4,7 años leche, 5,8 años lidia, y 7 años carne (test ANOVA,  $p < 0,05$ )]. Finalmente, en lo que respecta al origen de los animales, el 41% de los mismos habían nacido en la misma granja en la que se muestrearon.

En cuanto a los resultados serológicos, un total de 58 y 16 muestras de las 1094 recogidas fueron clasificadas con positivas y dudosas respectivamente según la interpretación del fabricante. Así, considerando a los animales dudosos como reactores en el test ELISA, la seroprevalencia a nivel individual obtenida en el estudio fue del 7% (95% IC = 5,4 - 8,4%).

En lo que respecta a los **resultados a nivel de rebaño**, se identificaron animales positivos o dudosos en 33 explotaciones, por lo que la prevalencia a nivel de rebaño observada aplicando una interpretación sensible fue del 30% (95% IC 22,2 - 39,1%). Aplicando una

interpretación conservadora en la que únicamente se consideran positivos los rebaños con animales con resultados serológicos positivos (no dudosos), la seroprevalencia disminuyó hasta el 26% (29/110, 95% IC = 18,4 - 35,3). En cualquier caso, independientemente de si los animales dudosos eran considerados como positivos o negativos, la seroprevalencia de rebaño fue significativamente mayor (test chi-cuadrado,  $p < 0,001$ ) en rebaños de leche (75% de rebaños positivos según la interpretación severa) que en rebaños de carne (24% de rebaños positivos) y que en rebaños de lidia (en los que no se detectó ningún animal positivo) (Tabla 19, Figura 18).

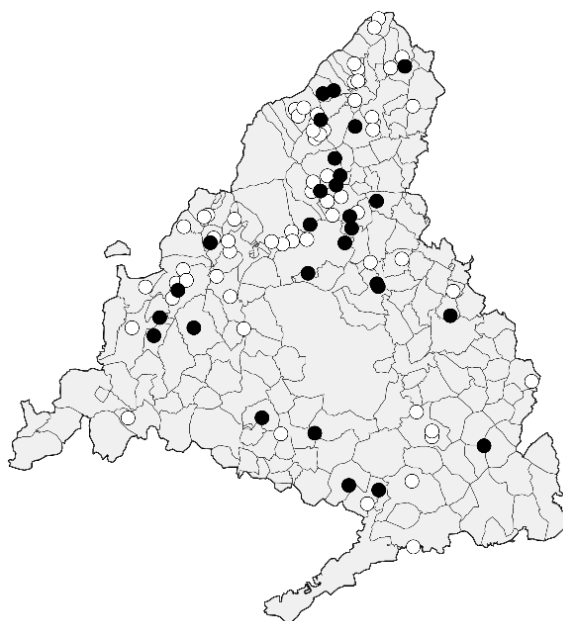


**Figura 18.** Representación del número y porcentaje de rebaños bovinos de la Comunidad de Madrid seropositivos y seronegativos a fiebre Q en 2009, en función de la aptitud. Los rebaños de lidia ( $n = 18$ ) mostraron todos un resultado negativo.

En esta misma línea, el número de animales reactivos detectados en rebaños positivos tendió a ser más alto en el caso de los rebaños de leche (media de tres animales utilizando un criterio estricto, 95% IC = 2 - 3,5) en comparación con los rebaños de carne (media 2, 95% IC = 1,3 - 2,5), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (test ANOVA,  $p = 0,086$ ).

### 5.2.2. Análisis espacial

En la Figura 19 se representa la distribución espacial en la Comunidad de Madrid de las granjas de bovino seropositivas y seronegativas a *C. burnetii* incluidas en el estudio. Mediante el test de Cuzick y Edwards se detectó la existencia de agrupación espacial global de las explotaciones positivas en el primer nivel de vecindad ( $p = 0,03$ ), mientras que en los siguientes niveles de vecindad no se observó este fenómeno, detectándose una probabilidad combinada de asociación no significativa ( $p = 0,28$ ) para dicho resto de niveles.



**Figura 19.** Distribución espacial de 110 explotaciones de bovino de la Comunidad de Madrid analizadas mediante un test ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en octubre y noviembre de 2009. Los puntos negros representan explotaciones seropositivas (con al menos un animal positivo o dudoso en el ELISA) y los puntos blancos explotaciones seronegativas.

**Tabla 19.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% (IC) de las *odds ratio* (OR) para los rebaños positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en rebaños bovinos (n = 110) de la Comunidad de Madrid en 2009, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. NA = no aplica.

Variable a nivel de rebaño	Categoría	Muestras positivas/ total muestreadas (%)		OR	95% IC	p
Tipo productivo	Carne	18+78 (25%)	1			
	Leche	15+20 (75%)	9	2,87–28,26	<0,01	
	Lidia	0+18 (0%)	0	NA	0,991	
Tamaño de rebaño	continua	33+110 (30%)	1,55	1,02–2,36	0,04	
Tamaño de rebaño (categorizado)	<25	6+23 (26,1%)	1			
	26–50	6+28 (21,4%)	0,77	0,21–2,83	0,697	
	51–100	7+25 (28%)	1,1	0,31–3,95	0,882	
	>100	14+34 (41,2%)	1,98	0,63–6,29	0,245	
Resultado del rebaño más cercano (n = 105)	Negativo	15+62 (24,2%)	1			
	Positivo	17+43 (39,5%)	2,05	0,88–4,76	0,096	
Tipo productivo del rebaño más cercano (n = 105)	Carne	21+74 (28,4%)	1			
	Leche	9+17 (52,9%)	2,84	0,97–8,35	0,058	
	Lidia	2+14 (14,3%)	0,42	0,09–2,04	0,283	

En cuanto a la asociación espacial de los datos a nivel local, el modelo de Bernoulli no detectó la presencia de ningún *cluster* o agrupamiento de alta o baja incidencia de fiebre Q en el área de estudio.

### 5.2.3. Análisis de factores de riesgo a nivel de rebaño

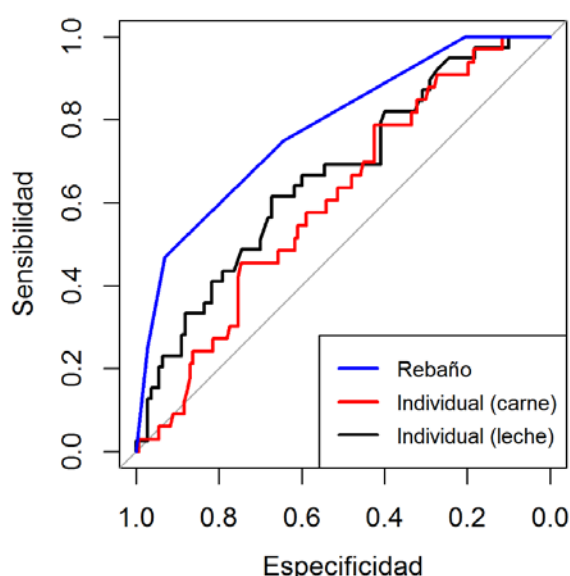
El tipo de producción (carne/leche/lidia) y el tamaño de rebaño se identificaron como variables significativamente asociadas con los resultados serológicos en el análisis univariable de los datos ( $p < 0,05$ ) (Tabla 19). Así, el riesgo de que un rebaño fuese seropositivo frente a *C. burnetii* de acuerdo con los resultados del test ELISA fue nueve veces más alto (IC 95% = 3,03 - 31) en rebaños de aptitud láctea respecto a rebaños de aptitud cárnica (como se ha citado anteriormente, todos los rebaños de lidia resultaron negativos). De forma similar, la probabilidad de que un rebaño fuese seropositivo se incrementó con el tamaño de este ( $p = 0,04$ ) (Tabla 19). Estas dos variables, junto con el tipo productivo del rebaño más cercano ( $p < 0,1$ ) fueron valoradas como posibles factores asociados con el resultado serológico en el análisis multivariable a nivel de rebaño (Tabla 21). El único indicador estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en el modelo multivariable fue la aptitud productiva (Tabla 21). Por otra parte, la inclusión de la variable del estatus respecto a fiebre Q del rebaño más cercano disminuía el valor AIC del modelo (incluyendo dicha variable el valor obtenido fue de 106,9 mientras que sin incluir la misma el valor fue de 109,5); por ello, dicha variable fue retenida en el modelo multivariable final, dado su sentido biológico de acuerdo con los resultados obtenidos en el test de Cuzick y Edwards. El modelo se ajustó tanto aplicando la interpretación sensible como conservadora de los datos serológicos, si bien no se obtuvieron resultados distintos dependiendo de la misma. El modelo final, que incluyó el tipo de producción y el resultado del rebaño más cercano, presentó un ajuste de los datos adecuado (test de Hosmer y Lemeshow,  $p > 0,05$ ) y un valor de AUC (*Area Under the Curve*) = 0,78 (Figura 20).

### 5.2.1. Análisis de factores de riesgo a nivel individual

Para el estudio de los factores de riesgo a nivel individual se llevaron a cabo modelos separados para rebaños de aptitud láctea y cárnica, dada la asociación significativa en cuanto al tipo de producción que se había observado mediante el modelo a nivel de rebaño.

En el caso de los rebaños de aptitud cárnica, la edad, el origen de los animales (comprados o nacidos en la explotación) y el número de movimientos (en el caso de animales comprados) mostraron estar potencialmente asociados ( $p < 0,25$ ) en el análisis

bivariable (Tabla 20). Sin embargo, el modelo multivariable de regresión logística retuvo únicamente la edad (en su forma cuantitativa continua) en el modelo final (Tabla 21) cuando se empleó el criterio sensible para la interpretación de los datos. La inclusión de un factor aleatorio a nivel de rebaño no mejoró el ajuste del modelo (varianza de los efectos aleatorios a nivel de rebaño = 0,0257). Por ello y con objeto de seleccionar el modelo más parsimonioso, el factor aleatorio no fue retenido en el modelo final. El valor de AUC para el modelo de animales de leche fue de 0,67 y para el modelo de animales de carne 0,61 (Figura 20).



**Figura 20.** Curvas ROC de los modelos de regresión logística a nivel de rebaño, individual para los animales de aptitud láctea e individual para los animales de aptitud cárnica en bovinos de la Comunidad de Madrid en 2009.

**Tabla 20.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza (IC) al 95% de las *odds ratio* (OR) de los resultados positivos al ELISA para *C. burnetii* en bovinos de rebaños (n = 328) de Madrid en 2009, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. Q = cuartil.

	Variable a nivel individual	Categoría	N	Muestras positivas (%)	OR	95% IC	p
Bovinos de carne (= 179)	Edad (n = 179)	Continua	179	33 (18,3%)	1,09	0,99–1,19	0,061
	Edad (categórica)	1Q (<4,9)	45	4 (8,9%)	1		
		2Q (4,9–8,8)	44	10 (20,4%)	2,64	0,75–9,3	0,132
		3Q (8,8–11,7)	45	10 (22,2%)	2,93	0,84–10,16	0,09
		4Q (>11,7)	45	10 (22,2%)	2,93	0,84–10,16	0,09
	Raza (n = 179)	Conjunto mestizo	126	24 (19%)	1		

## RESULTADOS

Bovinos de leche (n = 149)	Origen (n = 178)	Otras razas	53	9 (17%)	0,87	0,37–2,02	0,745
		Nacidos en la explotación	93	20 (21,3%)	1		
	Número de movimientos (n = 85)	Comprados	85	12 (14,1%)	0,6	0,27–1,32	0,197
		1	15	1 (6,7%)	1		
		2	50	6 (12%)	1,91	0,21–17,24	0,565
	Edad (n = 149)	3	20	5 (25%)	4,67	0,48–45,04	0,183
		Continua	149	39 (26,2%)	1,32	1,1–1,58	0,003
		1Q (<3)	37	5 (31,5%)	1		
		2Q (3–4,4)	37	8 (21,6%)	1,77	0,52–6,01	0,363
		3Q (4,4–6,1)	37	10 (27%)	2,37	0,72–7,79	0,155
Edad (categórica) (n = 149)	4Q (>6,1)	38	16 (42,1%)	4,65	1,49–14,58	0,008	
	Origen (n = 146)	Nacidos en la explotación	67	15 (22,4%)	1		
	Comprados	79	23 (29,1%)	1,42	0,67–3,02	0,357	
	Número de movimientos (n = 79)	1	52	17 (34%)	1		
		2	22	5 (22,7%)	0,61	0,19–1,92	0,94
3		5	1 (20%)	0,51	0,05–4,97	0,566	

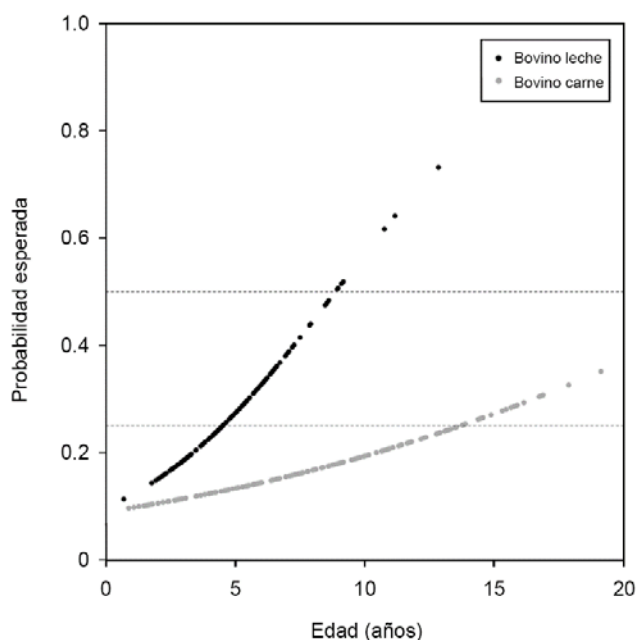
**Tabla 21.** Estimaciones puntuales y errores estándar (ES) de los coeficientes de regresión ( $\beta$ ), estimaciones puntuales e intervalos de confianza (IC) al 95% de las *odds ratio* ajustadas (OR) y valor p de la asociación entre los resultados positivos en el ELISA frente a *C. burnetii* y los factores epidemiológicos a nivel individual y de rebaño, estimados usando un modelo multivariable de regresión logística con datos procedentes de bovino de la Comunidad de Madrid en 2009, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos.

Modelo	Variable	$\beta$	ES $\beta$	OR	95% IC	p
Rebaño	Constante ( <i>intercept</i> )	-1,39	0,37			
	Rebaños de leche	2,23	0,59	9,33	2,93–29,76	<0,001
	Rebaños de lidia	-17,3	1674,42	0	0– $\infty$	0,992
	Resultado del rebaño más cercano	0,54	0,4949	1,71	0,65–4,52	0,276
Rebaños de carne	Constante ( <i>intercept</i> )	-2,25	0,478			
	edad	0,084	0,046	1,09	0,99–1,19	0,061
Rebaños de leche	Constante ( <i>intercept</i> )	-2,43	0,519			
	Edad	0,28	0,0922	1,32	1,1–1,58	0,003

En lo que respecta al modelo para los animales de aptitud láctea y también de acuerdo a la interpretación sensible de los datos, la edad fue la única variable asociada con el resultado serológico (Tablas 20 y 21), y por tanto el modelo final solo incluyó la edad como

efecto principal. En este caso, la inclusión de un efecto aleatorio a nivel de rebaño tampoco mejoró el ajuste del modelo (varianza estimada de los efectos aleatorios a nivel de rebaño =  $1,7 \times 10^{-13}$ ). Por tanto, la edad fue la única variable retenida en el modelo final a nivel individual tanto para el caso de animales procedentes de rebaños de leche como de carne, aunque el efecto de la edad fue diferente según el caso (Figura 21), más acusado en los rebaños de leche (OR de 1,33 frente a 1,09 en los de carne). Ambos modelos a nivel individual (para animales de explotaciones de leche y para animales de explotaciones de carne) mostraron un buen ajuste de los datos (test de Hosmer y Lemeshow,  $p > 0,05$ ).

Ambos modelos finales a nivel individual se evaluaron también empleando la interpretación conservadora de los resultados serológicos. En el caso del modelo para animales de aptitud cárnica se observó que sí existía una influencia del tipo de interpretación aplicada en los resultados serológicos, ya que empleando la interpretación conservadora de los datos la variable edad no mostró asociación estadísticamente significativa con los resultados serológicos ( $p = 0,28$ ). En el caso del modelo para animales de aptitud láctea, sin embargo, el empleo de una u otra interpretación de los resultados serológicos no afectó al resultado final, de modo que la edad se mantuvo como una variable significativamente asociada al estatus individual de fiebre Q empleando la interpretación conservadora ( $p = 0,002$ ).



**Figura 21.** Probabilidad esperada de obtener un resultado positivo en el test ELISA para *C. burnetii* en función de la edad en bovinos de aptitud láctea y cárnica en la Comunidad de Madrid. Las líneas de puntos horizontales indican el 25% y el 50% de la probabilidad esperada de encontrar un resultado positivo.

### 5.3. ESTUDIO 3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE SEROPREVALENCIA, DISTRIBUCIÓN Y FACTORES DE RIESGO



## ASOCIADOS A LA EXPOSICIÓN A *C. burnetii* EN PEQUEÑOS RUMIANTES DE LA COMUNIDAD DE MADRID

### 5.3.1. Análisis descriptivo

A **nivel de rebaño**, de las 144 explotaciones incluidas en el estudio de las que se dispuso información (de un total de 145 muestreadas) 93 (64,6%) eran de aptitud cárnica, 45 (31,3%) de aptitud láctea y 6 de aptitud mixta (4,1%) (Tabla 22). En los rebaños de ganado ovino exclusivamente predominó la aptitud productiva de tipo cárnico (76,7%, 69/90), mientras que en las explotaciones exclusivamente de caprino la aptitud más frecuente fue la producción láctea (62,5%, 10/16), siendo esta diferencia de proporciones estadísticamente significativa ( $p = 0,001$ ). En los rebaños constituidos por ambas especies de rumiantes domésticos se observó un número de explotaciones de ambas aptitudes productivas equivalente (19 y 18 rebaños, respectivamente) (Tabla 22).

**Tabla 22.** Número de rebaños de pequeños rumiantes incluidos en el estudio clasificados en función de la aptitud productiva y la especie animal presente en los mismos.

Aptitud \ Especie	Especie			Total
	Ovino	Caprino	Ovino+caprino	
<b>Cárnica</b>	69	5	19	<b>93</b>
<b>Láctea</b>	17	10	18	<b>45</b>
<b>Mixta</b>	4	1	1	<b>6</b>
<b>Dato no disponible</b>	0	0	1	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>16</b>	<b>39</b>	<b>145</b>

El **tamaño de rebaño** osciló entre dos y 842 animales, con una media de 113 y una mediana de 35. En función del tipo de especie doméstica presente en la explotación, el censo medio en rebaños de cabras fue de 87 animales (mediana 19), de 116 en rebaños de ovejas (mediana 43) y de 117 en rebaños mixtos (mediana 24), sin que se detectaran diferencias significativas entre ellos (test ANOVA,  $p = 0,8$ ). En relación a la aptitud productiva, los censos de los rebaños de aptitud cárnica y láctea fueron muy similares, con un censo medio en rebaños de carne de 106 animales (mediana 34) y de 111 en rebaños de aptitud láctea (mediana 26). En el caso de los rebaños de aptitud mixta el censo medio fue superior (216 animales, mediana 99), si bien en esta categoría únicamente estaban incluidas seis explotaciones. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas a este respecto (test ANOVA,  $p = 0,2$ ).

En la Tabla 23 se resumen las características a **nivel individual** de los animales incluidos en el estudio de los que se dispuso información respecto al total de 1340 individuos

muestreados. En total, la información sobre la aptitud productiva estuvo disponible en 1331 animales, sobre la edad en 1298 y sobre la raza en 1326.

**Tabla 23.** Características a nivel individual de los animales incluidos en el estudio (n = 1340) de los que se dispuso información.

		Número de ovejas		Número de cabras	
Total animales (%)		(% del total)		(% del total)	
		1320 (100%)	1035 (78%)	285 (22%)	
<b>Aptitud Productiva</b> (n = 1331)	<b>Carne</b>	868 (65%)	760 (74%)	97 (34%)	
	<b>Leche</b>	409 (31%)	242 (23%)	167 (59%)	
	<b>Mixta</b>	54 (4%)	33 (3%)	21 (7%)	
<b>Edad (años)</b> (n = 1298)		mediana: 4 (p <sub>25</sub> =2, p <sub>75</sub> =6)		mediana: 4 (p <sub>25</sub> =3, p <sub>75</sub> =6)	
<b>Razas</b> (n = 1326)		Cruzada carne 666 (64,3%)		Guadarrama leche: 106 (37%)	
		Cruzada leche 131 (12,7%)		Cruce carne: 72 (25%)	
		Colmenareña 48 (4,6%)		Murciano granadina 41 (14,4%)	
		Merina 44 (4,3%)		Cruzada leche: 27 (9,5%)	
		Manchega 30 (2,9%)		Cruzada mixta: 20 (7%)	
		Assaf 79 (7,6%)		Guadarrama carne: 12 (4,2%)	
		Cruzada mixta 10 (1%)		Malagueña 4 (1,4%)	
		Churra x Rubia del Molar 10 (1%)			
		Awassi 9 (0,9%)			
		Rubia del Molar 6 (0,6%)			

En cuanto a la **aptitud productiva**, y al igual que lo observado a nivel de rebaño, la aptitud cárnica fue significativamente más frecuente en el ganado ovino (un 74% de los individuos), mientras que en el ganado caprino lo fue la aptitud láctea (un 59% de los individuos) (test Z de comparaciones múltiples ajustado por el método de Bonferroni, p < 0,05). En ambas especies la aptitud mixta de doble propósito carne/leche fue claramente minoritaria, con un 7% en el ganado ovino y un 3% en el caprino.

El **rango de edades** de los animales fue muy variable, desde uno hasta 12 años, siendo la media y mediana general de cuatro años.

En cuanto a las **razas** de los animales, en el estudio se incluyeron animales de total de diez razas de ovino y siete de caprino (Tabla 23). En el caso del ganado ovino, los individuos más frecuentes fueron los de raza cruzada de aptitud cárnica (que representó

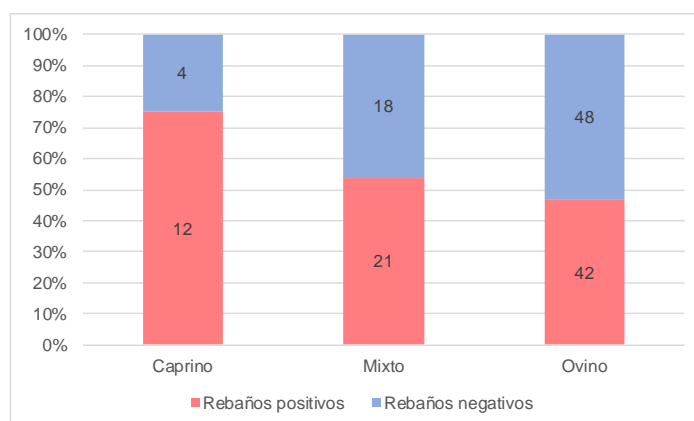
el 64% del total de ovinos), seguida de la raza cruzada de leche (un total del 13% del total). En el caso del ganado caprino, la raza más frecuente fue la de Guadarrama de leche (un 37%), seguida de los animales cruzados de aptitud cárnica (un 25% del total).

### 5.3.1.1. Resultados serológicos

En la Tabla 24 se resumen los principales resultados serológicos individuales y de rebaño del presente estudio. Un total de 181 y 29 muestras del total de 1340 analizadas fueron clasificadas como positivas y dudosas respectivamente en el test ELISA según la interpretación del fabricante. Así, considerando los animales dudosos como reactores (interpretación sensible), la seroprevalencia aparente a nivel individual fue del 16% (95% IC = 13,8% - 17,7%). Dicha sensibilidad individual bajó al 13,5% (95% IC = 11,7% - 15,5%) empleando la interpretación conservadora, es decir, considerando como animales reactores únicamente aquellos con resultado positivo en el test ELISA.

A **nivel de rebaño**, el número total de explotaciones positivas (con al menos un animal seropositivo de entre el total de muestreados) fue de 68, lo que supuso una prevalencia aparente de rebaño del 47% (95% IC = 38,6% - 55,4%). También se identificaron siete explotaciones dudosas (cuatro de ovino y tres mixtas, cada una de ellas con un único animal con un resultado serológico dudoso), de modo que al aplicar una interpretación sensible de los resultados la prevalencia a nivel de rebaño aumentaría hasta el 52% (95% IC = 43,3% - 60,1%) (75 rebaños con animales reactores/145 rebaños muestreados) (Tabla 24, Figura 26).

En función de la **especie** (Tabla 24), en el caso de explotaciones únicamente de caprino se identificó un total de 12 explotaciones positivas de 16 muestreadas (75%, 95% IC = 47,6% - 92,7%). En las explotaciones únicamente de ovino se identificaron un total de 38 explotaciones positivas y cuatro dudosas del total de 90 muestreadas, lo que supuso un 47% (95% IC = 36,1% - 57,5%) de positividad a nivel de rebaño empleando la interpretación sensible de los datos y un 42% (95% IC = 31,8% - 53,1%) empleando la interpretación conservadora. Finalmente, en cuanto a las explotaciones mixtas de ovejas y cabras, (n = 39) el número de explotaciones positivas y dudosas identificado fue de 18 y de tres, respectivamente, de tal modo que la prevalencia de rebaño con una interpretación sensible fue del 54% (95% IC = 37,2% - 69,9%) y del 46% con una interpretación conservadora (95% IC = 30,1% - 62,8%) (Figura 22).

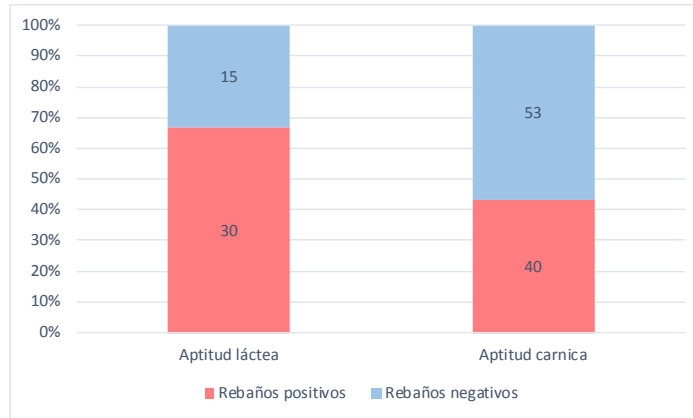


**Figura 22.** Representación del número y porcentaje de rebaños de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid seropositivos y seronegativos a fiebre Q en 2011, en función de las especies presentes en los mismos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la proporción de rebaños positivos en explotaciones de ovejas, de cabras y de tipo mixto al aplicar la interpretación sensible (test Z de comparaciones múltiples ajustado por el método de Bonferroni,  $p > 0,05$ ). Sin embargo, al aplicar la interpretación conservadora de los datos, la diferencia entre la proporción de positivos en rebaños de cabras frente a los de ovejas sí fue estadísticamente significativa (test Z de comparaciones múltiples ajustado por el método de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

Por otro lado, respecto al número de reactores (positivos y dudosos) por explotación, la mediana en las explotaciones únicamente de cabras fue de tres individuos (RIQ = 0,3 – 5,5) mientras que en las explotaciones únicamente de ovejas y en las mixtas la mediana fue de cero (RIQ = 0 – 1,3) y un individuo (RIQ = 0 – 2). Esta diferencia fue estadísticamente significativa entre los rebaños de cabras y los rebaños de ovejas (test Kruskal Wallis corregido por el método de Bonferroni,  $p = 0,006$ ).

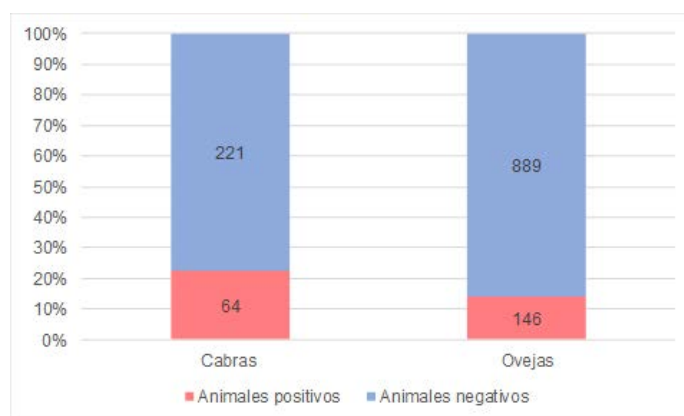
La proporción de rebaños positivos en rebaños de aptitud láctea fue superior a los de aptitud cárnica, siendo las diferencias estadísticamente significativas independientemente de la interpretación aplicada [66,7 vs. 43% y 62,2 vs. 37,6% con interpretación sensible y conservadora respectivamente (test chi-cuadrado,  $p < 0,01$ )]. De las seis explotaciones de tipo mixto, cinco de ellas fueron positivas con ambas interpretaciones. El número medio de animales reactores en los rebaños de leche fue de 2,51 (mediana 2, RIQ = 0 - 5), significativamente mayor al de los rebaños de carne (media de 0,86, mediana 0, RIQ = 0 - 1) (test de Mann-Whitney,  $p < 0,001$ ) (Figura 23).



**Figura 23.** Representación del número y porcentaje de rebaños de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid seropositivos y seronegativos a fiebre Q en 2011, en función de la aptitud productiva de los mismos.

El porcentaje de rebaños positivos fue similar en cada uno de los cuartiles de censo del rebaño, oscilando entre 45 y 60% sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Test Z de comparaciones múltiples ajustado por el método de Bonferroni,  $p > 0,05$ ).

En cuanto a los resultados a nivel individual, en función de la **especie** (Tabla 24), en el caso del caprino se observó un total de 53 muestras de suero positivas y 11 dudosas del total de 285 animales muestreados, lo que supuso un nivel de seroprevalencia frente a *C. burnetii* a nivel individual del 22% (95% IC = 17,7% - 27,6%), si se consideraban como reactores los caprinos dudosos [y de un 19% (95% IC = 14,3% - 23,6%) mediante la interpretación conservadora]. En cuando al ganado ovino la prevalencia individual fue inferior respecto al caprino, con un total de 128 animales con resultado positivo en el ELISA y 18 con resultado dudoso del total de 1035 ovejas muestreadas, lo que supuso una seroprevalencia del 14% (95% IC = 12,0% -16,4%), aplicando una interpretación sensible de los resultados [y de un 12% (95% IC = 10,4% 14,5%) en el caso de emplear la interpretación conservadora] (Figura 24). Así, las diferencias en los niveles de seroprevalencia en ambas especies fueron estadísticamente significativas aplicando tanto la interpretación sensible ( $p = 0,001$ ) como la interpretación conservadora ( $p = 0,007$ ) de los resultados.



**Figura 24.** Representación del número y porcentaje de ovejas y cabras de la Comunidad de Madrid seropositivas y seronegativas a fiebre Q en 2011, en función de la especie.

**Tabla 24.** Resultados serológicos a nivel individual y de rebaño de los pequeños rumiantes procedentes de explotaciones de la Comunidad de Madrid muestreados durante en el año 2011 empleando la interpretación sensible del test ELISA. 95% IC: intervalo de confianza al 95%. NA = no aplicable.

		Total	Ovino	Caprino	Mixto
Individual	Positivos	210	146	64	
	Muestreados	1340	1035	285	
	% positivos	16	14	22	NA
	95% IC	13,8 - 17,7	12,0 - 16,4	17,7 - 27,6	
Rebaño	Positivos	75	42	12	21
	Muestreados	145	90	16	39
	% positivos	52	47	75	54
	95% IC	43,3 - 60,1	36,1 - 57,5	47,6 - 92,7	37,2 - 69,9

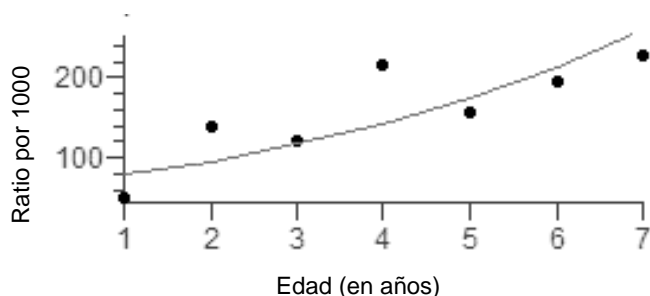
Se observó una tendencia ascendente (*linear by linear association*,  $p < 0,001$ ) en la proporción de positivos al incrementarse la **edad** de los animales (Tabla 25, Figura 25), observándose diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad (test ANOVA,  $p = 0,001$ ). Así, al clasificar la edad de los animales dos categorías, igual o inferior a un año y superior a un año, se observó que la proporción de animales positivos entre aquellos mayores de un año era estadísticamente superior (17% de animales seropositivos, 203+/1198) que aquellos animales con una edad comprendida dentro del primer año de vida (5% de animales positivos, 7+/143) (test ANOVA ajustado por el método de Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

En cuanto a la **aptitud productiva**, los porcentajes de animales positivos fueron similares en el caso de la aptitud cárnica (15,3%, 134 positivos/868 muestreados, IC 95% = 13,1 – 18,0) y láctea (15,1% 62 positivos/409 muestreados, IC 95% 11,8 -19,1), y superiores en

los de aptitud mixta (22,3%, 11 positivos/54 muestreados, IC 95% = 10,6 – 33,5), si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (test chi-cuadrado,  $p = 0,3$ ).

**Tabla 25.** Evolución de la proporción de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid seropositivos en el test ELISA frente a *C. burnetii* en función de la edad de los mismos en la totalidad de individuos incluidos en el estudio (ovejas y cabras), empleando la interpretación sensible de los datos (en la que los animales dudosos en el test ELISA fueron considerados como reactores).

Edad en años	Animales positivos/total muestreados	% animales positivos (95% IC)
≤1	7+/143	4,9% (95% IC = 1,99% – 9,83%)
2	27+/196	13,8% (95% IC = 9,28% - 19,41%)
3	28+/232	12,1% (95% IC = 8,17% - 16,97%)
4	41+/191	21,5% (95% IC = 15,87% - 27,97%)
5	24+/154	15,6% (95% IC = 10,25% - 22,30%)
6	31+/159	19,5% (95% IC = 13,65% - 26,52%)
≥7	52+/223	23,3% (95% IC = 17,53% - 28,95%)



**Figura 25.** Representación de la tendencia ascendente en el número de animales positivos respecto al total de muestreados en el test ELISA en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid en 2011 de acuerdo al incremento de la edad de los mismos. Resultados transformados logarítmicamente.

En lo que se refiere a la **raza** y debido a la distribución irregular observada (Tabla 23), se decidió agrupar aquellas razas minoritarias en un solo grupo y compararlas con las mayoritarias, observándose porcentajes similares en todos los casos.

Así, en el caso de las cabras la raza de Guadarrama de aptitud láctea presentó una seroprevalencia del 10,4% (11 positivos/106 muestreados), los animales cruzados de aptitud cárnica un 11,1% (8 positivos/72 muestreados) y el resto de razas agrupadas conjuntamente un 7,7% (8 positivos/104 muestreados).

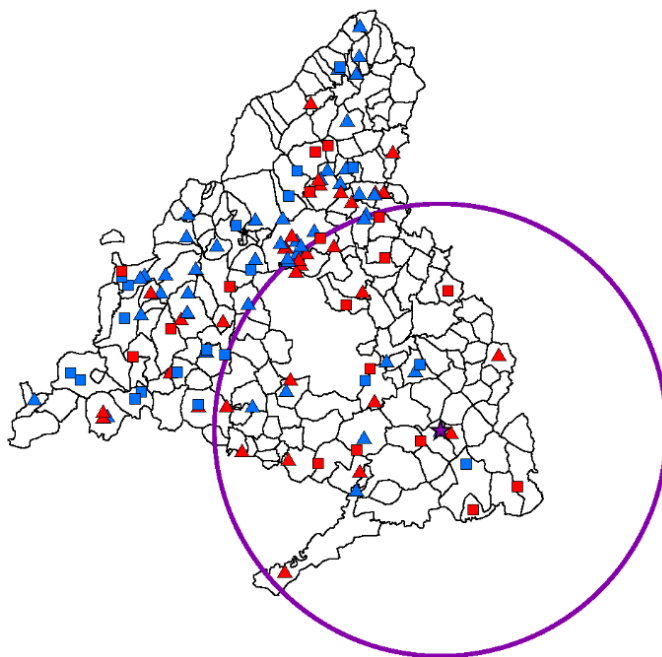
En el caso de las ovejas los animales cruzados de aptitud cárnica presentaron una seroprevalencia del 17,6% (117 positivos/666 muestreados), los cruzados de aptitud

láctea un 19,8% (26 positivos/131 muestreados), y el resto de razas agrupadas conjuntamente un 16,5% (39 positivos/236 muestreados).

### 5.3.2. Análisis espacial

En la Figura 26 se representa la distribución espacial en la Comunidad de Madrid de las granjas de pequeños rumiantes seropositivas y seronegativas a *C. burnetii* incluidas en el estudio de las que se dispuso de información geográfica (136 explotaciones del total de 145 muestreadas).

La posible existencia de agrupación espacial global de las explotaciones positivas se evaluó de manera conjunta con todas las explotaciones de las que se disponía la información geográfica y separadamente en función de la especie. En ninguno de los casos se observó una asociación espacial global estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) en los diez primeros niveles de vecindad mediante el test de Cuzick y Edwards, independientemente de la interpretación aplicada.



**Figura 26.** Distribución espacial de las 136 explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid de las que se dispuso de información sobre la localización geográfica (total rebaños = 145), analizadas mediante un test ELISA frente a la presencia de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* a lo largo de 2011. Los círculos representan explotaciones de caprino, los triángulos las explotaciones de ovino y los cuadrados las explotaciones mixtas de ovino y caprino. El color rojo representa las explotaciones seropositivas (con al menos un animal positivo o dudoso en el ELISA) y el color azul las seronegativas. El círculo morado indica un *cluster* de alta incidencia de explotaciones de ovino estadísticamente significativo detectado mediante el programa *scan statistic* (ratio casos observados/esperados = 1,65) identificado en las explotaciones de ovino ( $n = 83$ ) y mixtas ( $n = 38$ ).



Tampoco se detectó la presencia de ningún *cluster* de alta incidencia de fiebre Q estadísticamente significativo ( $p < 0,01$ ) al analizar todas las explotaciones de manera conjunta o al estudiar de forma separada las explotaciones de caprino y las de ovino mediante el modelo de Bernoulli del *scan statistic*. Sin embargo, al evaluar la distribución de rebaños positivos en aquellos que presentaban ovejas (los rebaños de ovino y los mixtos) empleando la interpretación conservadora de los resultados se detectó un *cluster* significativo ( $p = 0,025$ ) de alta incidencia de fiebre Q. El *cluster*, en el que el ratio de casos observados/esperados fue de 1,65, se localizó en la zona sur de la Comunidad de Madrid, con un radio de 55 km (Figura 26).

### 5.3.3. Análisis de regresión logística a nivel de rebaño

#### 5.3.3.1. Análisis univariable

La aptitud productiva (carne/leche/mixta) y la presencia de ovejas en el rebaño fueron identificadas como variables potencialmente asociadas con los resultados serológicos ( $p < 0,05$ ) (Tabla 26). De este modo, el riesgo de que un rebaño tuviese un resultado positivo en la serología frente a *C. burnetii* fue 6,6 veces más alto en los rebaños de aptitud mixta (IC 95% = 1,0 – 129,6) y 2,6 veces más alto en los rebaños de aptitud láctea (IC 95% = 1,3 – 5,7) en relación con los de aptitud cárnica (Tabla 26). Por otra parte, se observó que la probabilidad de que un rebaño fuese seropositivo era superior en aquellos que no tenían ovejas en su censo respecto a los que sí (IC 95% = 1,03 – 11,7) (Tabla 26).

**Tabla 26.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% (IC) de las *odds ratio* (OR) para los rebaños positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en rebaños de pequeños rumiantes ( $n = 145$ ) de la Comunidad de Madrid en 2011, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. NA = no aplica.

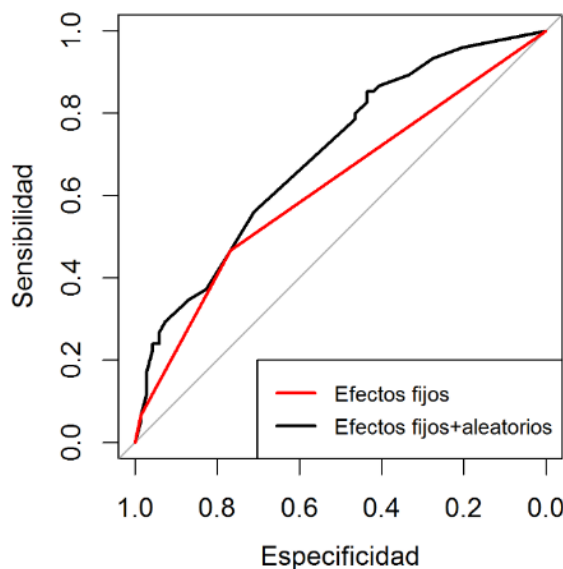
Variable a nivel de rebaño	Categoría	Muestras positivas/ muestradas (%)	OR	95% IC	p
<b>Especie</b>	Solo ovejas	42/90 (47%)	1	NA	0,098
	Solo cabras	12/16 (75%)	3,43	1,10 – 13,0	
	Mixto	21/39 (54%)	1,33	0,63 – 2,85	
<b>Cabras (presencia/ausencia)</b>	Cabras No	42/90 (47%)	1	NA	0,12
	Cabras Sí	33/55 (60%)	1,71	0,87 – 3,41	
<b>Ovejas (presencia/ausencia)</b>	Ovejas Sí	63/129 (49%)	1	NA	0,043
	Ovejas No	12/16 (75%)	3,14	1,03 – 11,7	
<b>Aptitud</b>	Carne	40/93 (43%)	1	NA	0,008
	Leche	30/45 (67%)	2,65	1,27 – 5,68	
	Mixta	5/6 (83%)	6,63	1,02 – 129,6	
<b>Censo</b>	Continuo	NA	1,00	0,99 – 1,01	0,39
<b>Censo</b>	Log	NA	0,84	0,67 – 1,05	0,13

<b>Censo</b>	Cuartil 1 (1-14 animales)	19/35 (54%)	1	NA	0,62
	Cuartil 2 (15-34 animales)	22/37 (59%)	1,23	0,48 – 3,17	
	Cuartil 3 (35-175 animales)	17/37 (46%)	0,72	0,28 – 1,81	
	Cuartil 4 (176-842 animales)	17/36 (47%)	0,75	0,29 – 1,91	

Como cabía esperar, todas las variables relacionadas con las especies presentes en la explotación y la aptitud estaban muy correlacionadas ( $p < 0,05$  en todas las posibles combinaciones), por lo que en el análisis multivariable se introdujeron de manera alternativa las variables especie, presencia/ausencia de ovejas y aptitud productiva, además del censo transformado logarítmicamente, valorando las posibles interacciones entre aquellas y este.

### 5.3.3.2. Análisis multivariable

El mejor modelo, seleccionado en función del AIC y su capacidad predictiva, incluyó únicamente la variable aptitud productiva como factor fijo y la delegación de origen de la explotación como factor aleatorio. La inclusión de este efecto aleatorio permitió incrementar el poder predictivo del modelo ( $AUC = 0,70$  vs.  $AUC = 0,62$  en el modelo equivalente incluyendo únicamente efectos fijos) (Figura 27).



**Figura 27.** Curvas ROC del modelo de regresión logística a nivel de rebaño para las explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid que incluyó la aptitud como efecto fijo y la delegación como factor aleatorio (modelo lineal generalizado mixto).

En las explotaciones de aptitud láctea y mixta se observó un riesgo superior de tener un resultado positivo comparado con las de carne ( $OR_{leche} = 2,9$ ; IC 95% = 1,1 – 12,0;  $OR_{mixta} = 6,12$ , IC 95% = 0,9 –  $\infty$ ), si bien el bajo número de observaciones pertenecientes a la categoría de explotaciones mixtas dio lugar a una gran incertidumbre alrededor del riesgo asociadas a las mismas, de modo que el intervalo de confianza generado mediante *bootstrapping* no fue cuantificable. El ajuste del modelo final a los datos fue satisfactorio (Hosmer-Lemeshow,  $p = 0,6$ ).

Al realizar el análisis aplicando la interpretación conservadora en la lectura de los resultados del ELISA [de modo que las explotaciones se consideran positivas solamente cuando al menos uno de los animales muestreados presenta un resultado positivo en el test serológico de acuerdo a las indicaciones del fabricante del kit (%OD > 50)], los resultados del modelo final fueron equivalentes, con las estimaciones puntuales de los coeficientes experimentando cambios por debajo del 90%, e intervalos de confianza solapados.

### 5.3.4. Análisis de regresión logística a nivel individual

#### 5.3.4.1. Análisis univariable

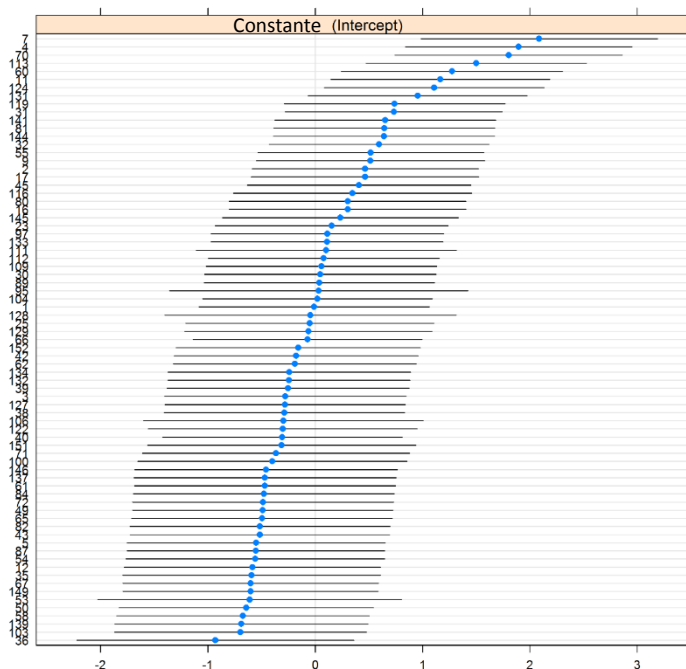
En el análisis univariable a nivel individual, incorporando el rebaño como factor aleatorio, se identificó una asociación potencialmente significativa ( $p < 0,25$ ) entre el resultado serológico y las variables especie (mayor riesgo en animales de especie caprina) y la edad en su forma continua o categorizada (mayor riesgo de seropositividad en animales de mayor edad) (Tabla 27).

**Tabla 27.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% (IC) de las *odds ratio* (OR) para los pequeños rumiantes positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en rebaños de pequeños rumiantes ( $n = 145$ ) de la Comunidad de Madrid en 2011, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. NA = no aplica.

Variable a nivel individual	Categoría	Muestras positivas/ total muestreadas (%)	OR	95% IC	p
<b>Especie</b>	Ovina	146+/1035 (14%)	1	NA	0,001
	Caprina	64+/285 (22%)	2,26	1,36 – 3,87	
<b>Aptitud</b>	Carne	134+/868 (15,3%)	1	NA	0,57
	Leche	62+/409 (15,1%)	1,01	0,67 – 1,51	
	Mixta	11+/54 (22,3%)	1,81	0,59 – 5,36	
<b>Edad</b>	Continuo	NA	1,22	1,12 – 1,34	< 0,001
	1-2 años	34+/339 (10%)	1	NA	0,003
<b>Edad (categórico)</b>	3-4 años	69+/423 (16,3%)	1,86	1,10 – 3,20	
	5-6 años	55+/313 (17,6%)	2,18	1,23 – 3,93	
	>6 años	51+/223 (22,9%)	2,86	1,59 – 5,26	

### 5.3.4.2. Análisis multivariable

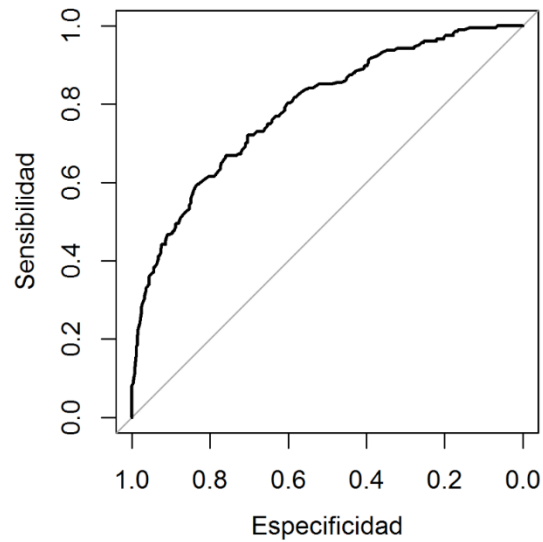
Los modelos multivariables se construyeron por tanto introduciendo de manera alternativa la edad en su forma continua y categórica junto con la especie, valorando también la posible existencia de interacciones entre ambas. El modelo final solo incluyó la edad en su forma categórica, seleccionada debido a su menor AIC respecto a la forma continua (827,7 frente a 855). Así, los animales de más de dos años tuvieron un riesgo mayor de tener un resultado positivo en el ELISA, riesgo que aumentó conforme iba aumentando la edad (OR  $_{3-4 \text{ años}} = 1,8$ , IC 95% = 0,8 - 4,9; OR  $_{5-6 \text{ años}} = 2,1$ , IC 95% = 1,0-6,8; OR  $_{>6 \text{ años}} = 2,8$ , IC 95% = 1,3 - 9,2). A pesar del relativamente bajo número de observaciones disponibles por explotación, se observó un efecto importante de la explotación de origen (figura 28).



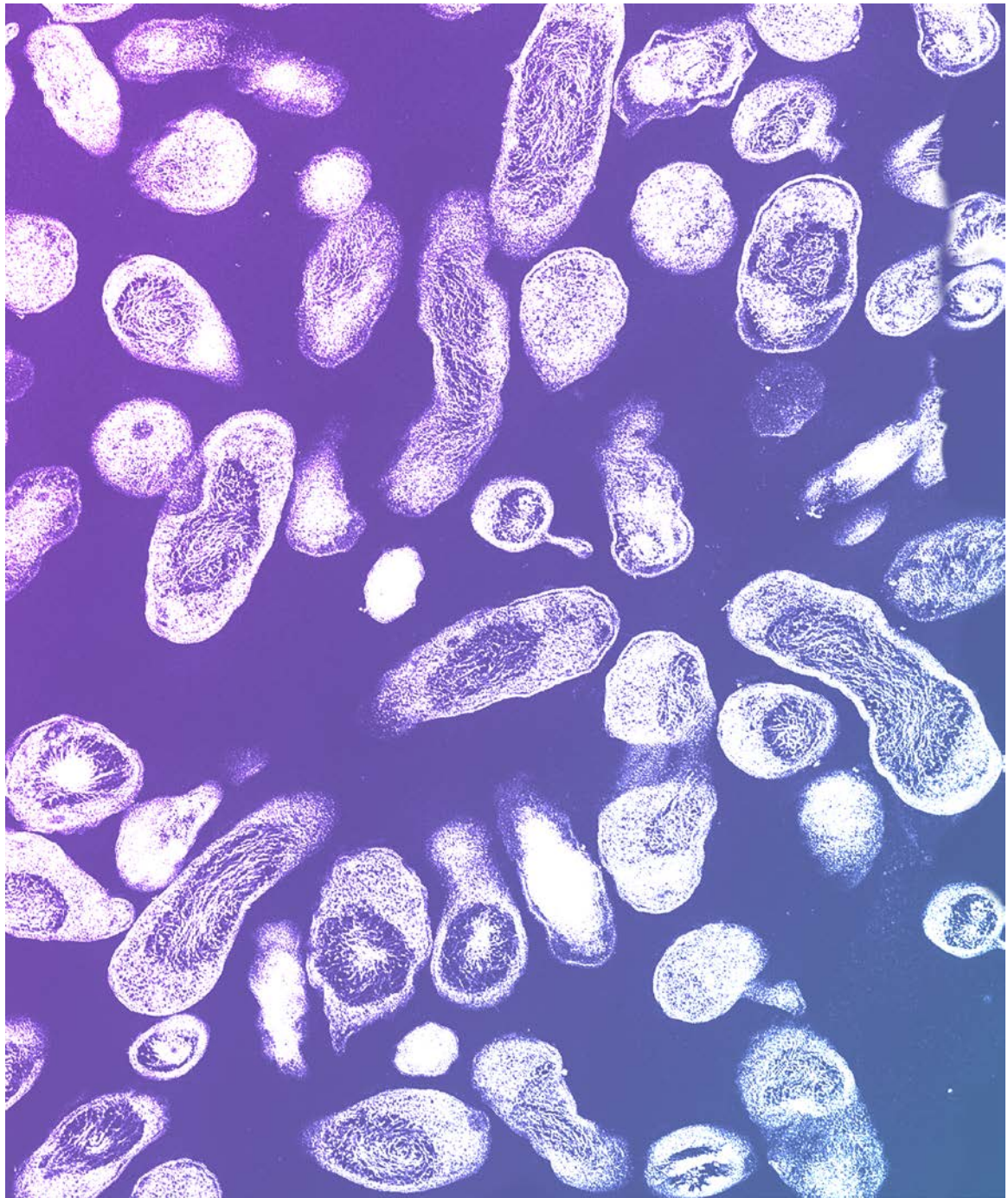
**Figura 28.** Efectos aleatorios estimados a través del modelo final que incluía la edad categorizada asociados a cada una de las 75 explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid con al menos un animal positivo analizadas en la región de Madrid.

Dicho modelo alcanzó un adecuado poder predictivo (AUC = 0,8, figura 29), si bien el ajuste del modelo final a los datos no fue adecuado (test de Hosmer-Lemeshow,  $p = 0,001$ ). Un análisis detallado reveló que el origen de esta falta de ajuste se originaba en las observaciones en las que el riesgo predicho era mínimo ( $< 0,12$ ,  $n = 80$  observaciones) y máximo ( $> 0,51$ ,  $n = 72$  observaciones), ya que en ambas categorías el número observado de animales positivos era sensiblemente diferente al esperado (calculado a

partir de la probabilidad media de positividad estimada en cada categoría: 2 frente a 8,4 para la categoría de riesgo inferior y 59 frente a 44,8 para la superior). A pesar de ello, y dada la ausencia de información de otras posibles covariables, se consideró que el modelo final aportaba evidencias de la asociación entre la edad y el riesgo de positividad y permitía una cuantificación relativa de la misma.



**Figura 29.** Curva ROC del modelo de regresión logística a nivel individual en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid que incluyó únicamente la edad como efecto fijo.



## DISCUSIÓN



## 6. DISCUSIÓN

A pesar de que la fiebre Q es una enfermedad descrita hace más de 80 años (Derrick, 1937) siguen existiendo numerosas incógnitas respecto a diferentes aspectos de la epidemiología de esta zoonosis desatendida (Delsing *et al.*, 2011). Esto se debe en gran medida a que se ha considerado tradicionalmente una enfermedad con un impacto menor tanto en la producción animal como en el ámbito de la salud pública, debido en gran parte a su frecuente presentación en forma de infecciones inaparentes tanto en animales como en personas, así como la sintomatología a menudo inespecífica y el frecuente carácter auto-limitante de la infección (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Maurin y Raoult, 1999).

Sin embargo, la fiebre Q ha demostrado que también puede tener un impacto significativo tanto en producción animal como en salud pública (EFSA, 2010). Así, *C. burnetii* es capaz de dar lugar a importantes pérdidas económicas asociadas a la aparición de fallos reproductivos en rumiantes domésticos (van den Brom *et al.*, 2012a), no en vano se considera una de las principales causas de aborto infeccioso en pequeños rumiantes (Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; van den Brom *et al.*, 2015c). Asimismo, *C. burnetii* ha mostrado su capacidad de producir un impacto de primer orden en salud pública. Respecto a este último aspecto destaca el aumento observado en los últimos años tanto en el número de brotes humanos descritos en distintos países, especialmente en Europa, como el alcance de los mismos, que han llegado a afectar a miles de personas (Morroy *et al.*, 2016; Schneeberger *et al.*, 2014). Así, el número de casos humanos descritos en Europa en 2008 experimentó un crecimiento del 165% respecto al año anterior, con más de 1500 casos descritos, asociados no solo al brote de Holanda sino también a otros en países como Alemania y Bulgaria (EFSA, 2010). Por otro lado, también cabe citar la producción de cuadros clínicos de carácter crónico altamente invalidantes en una proporción de las personas infectadas (Schneeberger *et al.*, 2014), su capacidad de dar lugar a complicaciones que pueden desembocar en la muerte del paciente (OIE, 2016) y la descripción en los últimos años de diversas manifestaciones clínicas no referidas anteriormente, entre las que se incluyen alteraciones de tipo psiquiátrico y del sistema musculoesquelético (Morroy *et al.*, 2016).

El vínculo epidemiológico entre el reservorio animal, representado principalmente por los rumiantes domésticos, y la enfermedad en el hombre, se conoce desde hace décadas (OIE, 2016; Baboudieri, 1959; Marrie, 1990b). Así, la mayoría de los brotes humanos en los que se ha llegado a identificar el origen estaban directa o indirectamente asociados a la presencia de rumiantes domésticos infectados, siendo este uno de los principales



factores de riesgo para la aparición de brotes humanos (Maurin y Raoult, 1999; Van den Brom *et al.*, 2015c). Por ello, el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en estas especies es un pilar fundamental para determinar el riesgo de aparición de brote humanos, el correcto diseño, desarrollo y aplicación de medidas de vigilancia y prevención, y, llegado el caso, el control eficaz de los mismos, si se producen (EFSA, 2010; Ladbury *et al.*, 2015).

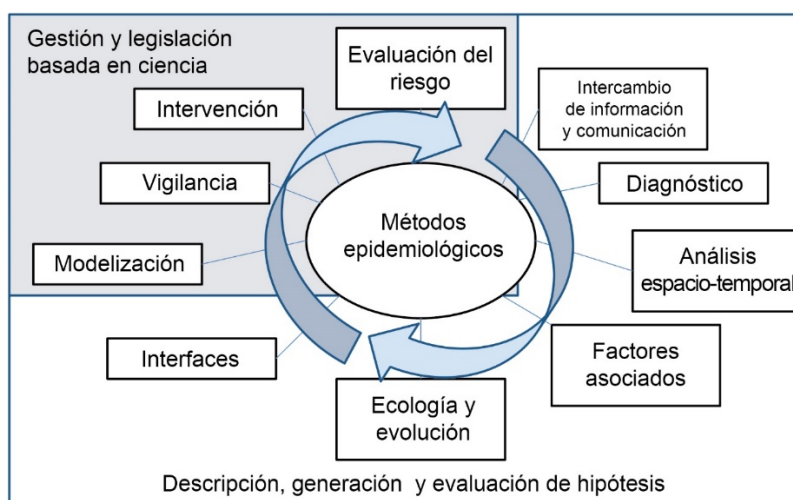
Sin embargo, actualmente muchos aspectos de la epidemiología de la enfermedad en el reservorio animal siguen sin estar plenamente caracterizados. Así, aunque la fiebre Q es una enfermedad de declaración obligatoria (OIE, 2017), el hecho de que no esté sometida a planes de control y erradicación en la mayoría de países hace que su distribución en muchas zonas sea desconocida y en general esté todavía infra-diagnosticada, a pesar de haberse observado una amplia exposición al patógeno en las distintas especies de rumiantes domésticos de diferentes regiones del mundo (Tablas 1-6). Por otro lado, las elevadas prevalencias observadas en diversas regiones no siempre se corresponden con un incremento de los casos humanos o la aparición de brotes, lo que complica más aún la interpretación de los datos de prevalencia cuando estos existen. Por último, esta ausencia de planes de control en el reservorio animal lleva consigo también una falta de armonización en lo que respecta a la metodología y enfoques diagnósticos empleados en los estudios disponibles, lo que limita la comparación entre los mismos (Guatteo *et al.*, 2010).

Por todo lo anteriormente citado, en los últimos años se ha desarrollado un interés creciente en ampliar el conocimiento respecto a los distintos aspectos de la epidemiología de esta enfermedad en la interfaz hombre-animal por parte de la comunidad científica, las administraciones públicas y organismos internacionales como la EFSA (Sidi-Boumedine *et al.*, 2015b) o la OIE (OIE, 2016).

En el caso de España, uno de los países europeos con mayor tasa de comunicación de casos humanos (EFSA, 2016), la enfermedad ha sido descrita a lo largo de toda su geografía (Tabla 9), existiendo incluso áreas tradicionalmente endémicas, como el País Vasco (Maurin y Raoult, 1999) o las Islas Canarias (Bolaños *et al.*, 2003a). Sin embargo, la información sobre la exposición a *C. burnetii* en los rumiantes domésticos en gran parte del territorio español es limitada, siendo prácticamente inexistente en la zona de la meseta central, a pesar de ser esta una de las regiones con mayor producción ganadera del país. Es por ello que el presente trabajo se ha centrado en la caracterización de las seroprevalencias presentes en esta región, la distribución espacial de la exposición al

patógeno y la identificación de los factores de riesgo más importantes asociados a la misma en las tres especies ganaderas de rumiantes relevantes en la producción ganadera española: el ganado bovino, ovino y caprino. El objetivo global que esta tesis ha perseguido fue conocer la situación actual de la fiebre Q en estas especies reservorios de *C. burnetii*, así como describir la epidemiología de la enfermedad en las regiones de la Comunidad de Madrid y Castilla y León, vecinas y ambas con una producción ganadera relevante, pero diferentes en distintos aspectos tanto en lo referente a la producción (sistemas de manejo, densidades animales, etc.) como a sus características geográficas y medioambientales, importantes en el caso de la fiebre Q.

Para llevar a cabo el trabajo de investigación sobre la epidemiología de la fiebre Q en rumiantes domésticos en las dos citadas regiones españolas se han utilizado distintas herramientas desarrolladas en el campo de la epidemiología cuantitativa. Esta disciplina está basada en la recogida y análisis de datos cuantitativos sobre determinadas variables para cuantificar la influencia que factores de diversa naturaleza ejercen sobre una enfermedad determinada (Pérez, 2015). En casos en los que la información de partida es escasa, como el que nos ocupa, los pasos iniciales en el estudio epidemiológico suelen centrarse en i) la estimación de los niveles de circulación del patógeno en estudio, ii) la evaluación de su distribución geográfica, con el objetivo de identificar patrones de distribución espacial mediante herramientas de geoprocésamiento en GIS (*Geographic Information System*) (Figura 30) (Pérez *et al.*, 2011; Ward y Carpenter, 2000a, b), y iii) el estudio de factores de riesgo asociados a la exposición a la infección en las especies en estudio, tanto intrínsecos como extrínsecos (características individuales y variables de tipo productivo, sistemas de manejo, o de densidad animal).



**Figura 30.** Secuencia propuesta para el cálculo sistemático de las dinámicas epidemiológicas de las enfermedades infecciosas. Adaptado de Pérez, 2015.

La relevancia de la información obtenida fruto de este tipo de estudios de investigación, radica no solo en el importante valor informativo que presenta por sí misma, sino especialmente porque puede servir como base para el diseño de modelos epidemiológicos que permitan entender y predecir la dinámica de la enfermedad en las poblaciones animales. Esta información es la base para llevar a cabo un correcto análisis del riesgo y, con base en este, el diseño de planes de vigilancia óptimos y eficientes que permitan obtener información útil con un adecuado balance del coste-beneficio (Howe *et al.*, 2013). El objetivo final de estos planes de vigilancia es desarrollar modelos para predecir el riesgo de transmisión en las poblaciones animales, así como de aparición de brotes en las mismas y, en función de ello, aplicación de medidas preventivas, así como de control, llegado el caso. Además, en las enfermedades de naturaleza zoonótica como es el caso de la fiebre Q y de acuerdo al concepto de “una sola salud” (Schwabe, 1984), el desarrollo de este tipo de estudio en los reservorios animales y su aplicación por parte de las administraciones públicas (Álvarez *et al.*, 2014) está particularmente justificado con objeto de contribuir a predecir el riesgo de aparición de brotes humanos y poder desarrollar medidas de prevención y control llegado el caso, ya que el riesgo de exposición en las poblaciones humanas está íntimamente relacionado con la presencia y circulación de la enfermedad en el reservorio animal.

En el caso de la fiebre Q, donde las elevadas prevalencias en animales no están necesariamente relacionadas con la aparición de brotes en humanos (Georgiev *et al.*, 2013), es fundamental determinar la situación de base en los principales reservorios para el hombre, así como la epidemiología de la enfermedad en cada región en función de las características productivas, de manejo y medioambientales.

En los tres estudios aquí descritos el estatus frente a fiebre Q de los animales analizados se determinó mediante el empleo de un test ELISA sobre muestras de suero. Aunque las técnicas serológicas solo permiten conocer si el animal ha experimentado un contacto previo con *C. burnetii* y por tanto no son válidas para determinar si presenta una infección activa ni si es un potencial excretor de la bacteria, son consideradas una herramienta idónea como método de cribado para estimar el grado de exposición del patógeno a nivel poblacional (EFSA, 2010), siendo de hecho el ELISA la técnica serológica de elección recomendada por la OIE para el diagnóstico y monitorización en rumiantes (OIE, 2016). El kit utilizado en los estudios aquí descritos [ID Screen® Q fever Indirect Multi-species, de la casa comercial IDvet (Grabels, Francia)], ha sido empleado en diversos estudios de investigación realizados en diferentes regiones y hospedadores (Astorga *et al.*, 2014; El-Mahallawy *et al.*, 2016a; Esmailnejad y Abbaszadeh Hasiri, 2016; Galluzzo *et al.*, 2015;

García-Seco *et al.*, 2016; Meredith *et al.*, 2015; Nakeel *et al.*, 2016; Saiti *et al.*, 2014; Seo *et al.*, 2016; Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Este test está basado en el uso de placas tapizadas con antígenos de *C. burnetii* de fase I y fase II, lo que de acuerdo a distintos estudios aumenta la sensibilidad diagnóstica del ELISA, ya que permite detectar anticuerpos frente ambas fases antigénicas (Bottcher *et al.*, 2011; Hatchette *et al.*, 2003a; Kittelberger *et al.*, 2009; Krt, 2003). Además, el hecho de que este test emplee como antígeno una cepa de *C. burnetii* aislada a partir de un aborto ovino ofrece, según determinados autores (Berri *et al.*, 2003b; Horigan *et al.*, 2011; Kovacova *et al.*, 1998; Rousset *et al.*, 2007), una mayor sensibilidad diagnóstica que el uso de un antígeno procedente de la cepa *Nine Mile* aislada a partir de una garrapata y ampliamente utilizada para el diseño de test ELISA (Rodolakis, 2006), lo que hizo que este test se considerara idóneo para alcanzar los objetivos planteados en la tesis.

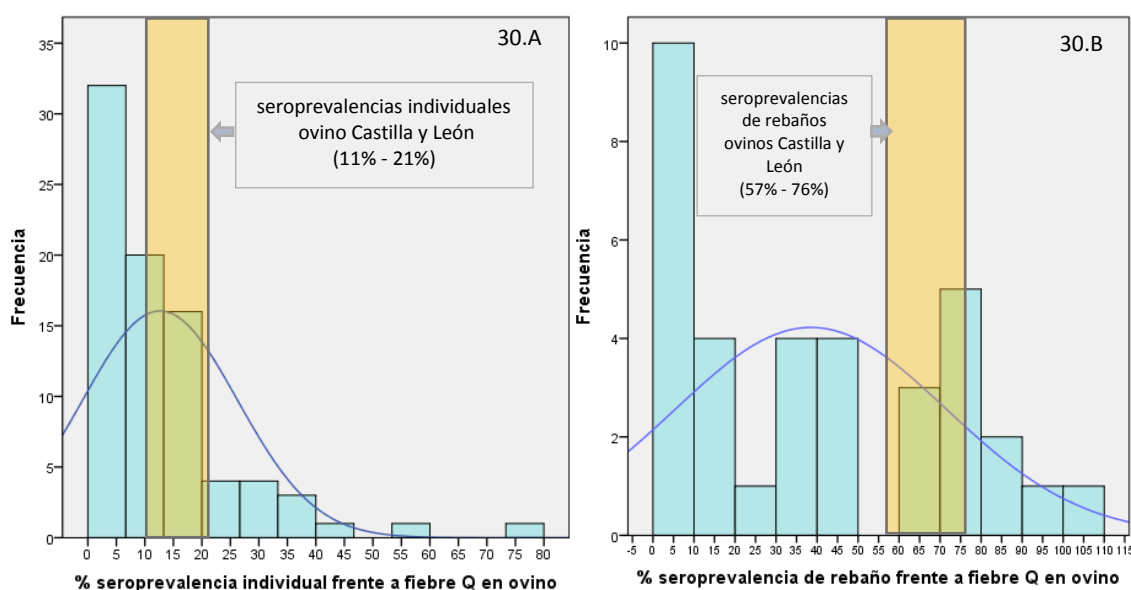
Por otro lado, el empleo de herramientas de geoprocésamiento en GIS como las utilizadas en esta tesis doctoral ha adquirido una popularidad creciente en los últimos años en el ámbito de la epidemiología veterinaria, dada su utilidad para la identificación de patrones espaciales y espacio-temporales de las diferentes enfermedades de interés veterinario y de salud pública (Abellan *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2011; Pfeiffer y Stevens, 2015; Ratmanov *et al.*, 2013; Ward y Carpenter, 2000a, b). En el caso de la fiebre Q diversos trabajos centrados en el estudio del brote holandés de 2007-2011 han incorporado el uso de estas técnicas, demostrando su utilidad para clarificar el origen de la infección en humanos y su dinámica, así como los factores de riesgo asociados gracias a un enfoque multidisciplinar empleando datos procedentes de distintas fuentes y sectores (Brooke *et al.*, 2017; Commandeur *et al.*, 2014; Hackert *et al.*, 2012; Huijskens *et al.*, 2016; Ladbury *et al.*, 2015; Schimmer *et al.*, 2010; Smit *et al.*, 2012). En España, sin embargo, apenas existen trabajos en los que se haya hecho uso de este tipo de herramientas para el estudio de la epidemiología de la fiebre Q (Nogareda *et al.*, 2013), y ninguno en las regiones analizadas en esta tesis doctoral. A continuación, se procederá a la discusión de los resultados de seroprevalencia y los patrones espaciales encontrados en cada uno de los estudios para finalizar con una discusión sobre los factores de riesgo que combina los hallazgos de los tres trabajos.

El estudio 1 de la presente memoria de tesis es el primer trabajo de investigación centrado en la determinación de los niveles de seroprevalencias de fiebre Q, su distribución espacial y los factores de riesgo asociados en ganado ovino de Castilla y León, especie implicada en la mayoría de los brotes humanos de origen conocido en la región (van den Brom *et al.*, 2015). Asimismo, Castilla y León es una región donde se ha demostrado la

circulación de *C. burnetii* en las poblaciones humanas en diversos estudios (González-Quijada *et al.*, 2014; Otero, 2016) y en la que se notifican casos humanos todos los años (Portal de Salud de Castilla y León, 2017), en ocasiones en forma de brotes clínicos (Nebreda *et al.*, 2001; Yáñez-Ortega, 1992).

El elevado número de animales y rebaños muestreados en este estudio (un total de 107 685 ovinos muestreados procedentes de 8279 explotaciones), una cobertura nunca alcanzada en un estudio de seroprevalencia de esta enfermedad (van den Brom *et al.*, 2013a) – incluyendo el estudio publicado más ambicioso en este sentido 15 186 animales (Tabla 3) – otorgó una gran precisión en las estimaciones derivadas de su análisis, lo que pone de manifiesto la representatividad de los mismos como reflejo de la situación real de la fiebre Q en la región.

Los niveles de seroprevalencia observados en los cuatro años en estudio (Tabla 16) estuvieron en consonancia con lo descrito en numerosos otros países, normalmente realizados en un contexto de ausencia de brotes importantes y con un número de casos humanos limitado (Figuras 31.A y 31.B).



**Figuras 31.A y 31.B.** Representación de los resultados de seroprevalencia de fiebre Q individual (Figura 31.A) y de rebaño (Figura 31.B) observados en el estudio 1 en ganado ovino de Castilla y León en los años 2009-2012 respecto a la frecuencia de los distintos niveles de seroprevalencia ovina observados mundialmente de acuerdo a los datos recogidos en las Tablas 3 y 13. La línea azul representa la curva normal de la distribución.

No obstante, resultados muy similares (19% y un 79% de prevalencia individual y de rebaño respectivamente) fueron descritos también en el ganado ovino de leche en

Holanda durante los años en los que tuvo lugar el brote en humanos asociado principalmente a cabras (momento en el que por tanto se estaba produciendo una circulación activa de *C. burnetii*), un incremento notable respecto a los valores descritos en 2007, cuando las prevalencias individuales y de rebaño fueron del 6% y del 39% (van den Brom *et al.*, 2013a). Cabe destacar que las prevalencias detectadas en el ganado caprino en Holanda en el mismo periodo, especie asociada al brote y en la que se habían producido importantes olas de abortos en distintas explotaciones, fueron menores (8% individual y 17% en rebaño en 2008, aumentando hasta un 21% individual y un 47% en rebaño en 2009-2010 en rebaños no vacunados) (Schimmer *et al.*, 2011; van den Brom *et al.*, 2013a). No obstante, la ausencia de datos en ganado caprino en Castilla y León impide valorar si esta relación entre los valores registrados en ambas especies estaba también presente, si bien en el caso de Castilla y León y a diferencia del caso de Holanda, ambas especies de pequeños rumiantes estarían en una situación similar de ausencia de brotes clínicos.

De igual forma, los resultados de nuestro estudio están también en los rangos descritos en otras regiones de España incluyendo el País Vasco, reconocida región endémica de fiebre Q, en la que distintos estudios han descrito valores de prevalencia individual del 9-13% y una prevalencia de rebaño de aproximadamente el 75%, pero también otras regiones como Extremadura y Andalucía (Tabla 13). Así, queda demostrada la amplia exposición al patógeno en el ganado ovino de Castilla y León, que estaría en niveles similares a los observados en regiones españolas donde han tenido lugares diversos brotes humanos y un gran número de casos clínicos esporádicos.

Las elevadas prevalencias observadas en el estudio, particularmente en el caso de 2012, no se vieron acompañadas de una incidencia notable de fallos reproductivos en el ganado ovino (ni en ninguna otra especie de rumiante doméstico). Esta ausencia de signos clínicos evidentes es compatible con estudios previos que demuestran que altas seroprevalencias de fiebre Q no necesariamente se acompañan de la aparición de un incremento sustancial de fallos reproductivos, especialmente en regiones donde la enfermedad circula de forma endémica (Astobiza *et al.*, 2009; Ruiz-Fons *et al.*, 2011). Tampoco se observó ningún cambio sustancial en el número de casos humanos notificados en los años de estudio (Portal de Salud de Castilla y León, 2017).

En estos elevados niveles de seroprevalencia, no puede descartarse la posible influencia de la climatología en los años previos, en una región cuyas características climatológicas y orográficas son de por sí favorables para la diseminación de la bacteria, al tratarse de

una comunidad autónoma que se caracteriza por una pluviosidad escasa, especialmente en verano, así como por un paisaje seco y árido en toda la región mesetaria, aspectos que favorecen la desecación y diseminación de *C. burnetii* por acción del viento en una zona con amplias áreas destinadas al pastoreo.

El incremento en las prevalencias observadas en 2012 respecto a los otros tres años en estudio podría ser reflejo de un incremento real en el grado de exposición al patógeno en la población ovina de Castilla y León o bien tratarse de un efecto asociado al diseño del muestreo. En este sentido, y como se describe en la sección 5. 1. 1. del apartado de resultados, hubo un determinado número de rebaños que fueron muestreados más de un año. Concretamente, del total de explotaciones incluidas en el estudio en 2012 un 49% también se habían muestreado en 2011, un 41% en 2010 y un 39,5% en 2009. De ellas, 76,6% fueron positivas, en comparación con 75,6% en las muestreadas por primera vez en 2012. Estos porcentajes tan próximos ponen de manifiesto el hecho de que los resultados obtenidos en 2012 no se asocian a un sesgo de selección. Por otra parte, el porcentaje de explotaciones muestreadas de manera repetida en los otros años estuvo en los mismos rangos (entre el 40 y el 50%), lo que parece indicar que los resultados observados en 2012 no serían derivados de un sesgo de selección.

Por otro lado, si se valoran las diferencias entre las distintas características productivas de los rebaños muestreados, se observa que la mayor positividad detectada en 2012 no parece deberse a un sesgo de selección hacia un mayor porcentaje de rebaños de producción láctea, de mayor censo o con un régimen intensivo (Tabla 17), aspectos estos identificados asociados a un mayor riesgo de exposición a *C. burnetii* en numerosos estudios, como se ha descrito en la sección 2. 2. 4. 2. y como se discutirá más adelante en este apartado.

El análisis de las fechas de muestreo reveló que 2012 fue el año en el que la diferencia entre la proporción de animales muestreados en el primer y segundo semestre del año fue más elevada de entre los tres años de los que se dispuso esta información (el 91% de los animales fueron muestreados en el segundo semestre en comparación con el 66% y el 79% en los años 2009 y 2011). El hecho de que gran parte de los muestreos se concentrase en una época concreta puede contribuir a la obtención de resultados positivos debido al **carácter estacional** descrito en la presentación de la enfermedad (Enright *et al.*, 1971) asociado a las épocas de parideras, momento de mayor excreción de la bacteria que contamina el ambiente, lo que contribuye al contagio tanto dentro del rebaño como a rebaños vecinos (Hogerwerf *et al.*, 2013). En el caso de Castilla y León,

no obstante, las parideras suelen tener lugar predominantemente entre abril y junio en sistemas menos intensificados, más una paridera adicional en septiembre y octubre en explotaciones con más intensificación de la producción (Delgado y Gutiérrez), lo que hace poco probable que el aumento observado en 2012 se deba a un mayor muestreo en la segunda mitad del año. Más aun, la notable presencia de sistemas más o menos intensificados (64% de las explotaciones muestreadas en 2012) en los que los partos se reparten de manera más homogénea durante el año, hacen menos probable aún que el sesgo temporal en el muestreo sea el causante de los resultados observados.

Existen pocos ejemplos en la literatura de estudios longitudinales durante un periodo de tiempo similar al contemplado en nuestro estudio (cuatro años), lo que dificulta la valoración de la variabilidad observada en nuestros resultados en este sentido. El estudio de Holanda (van den Brom *et al.*, 2015b), realizado entre 2009 y 2014 y en el que se pasó de prevalencias en PCR de leche de tanque del 21% al 0,3%, no es representativo de la situación descrita en el estudio de Castilla y León dado que se llevó a cabo en un contexto de estrictas medidas de control debidas al brote que en esos años tenía lugar en la población humana del país. Estas medidas incluyeron el sacrificio de todos los animales preñados en las granjas positivas de la zona del brote entre diciembre de 2009 y mayo de 2010 (Hogerwerf *et al.*, 2011) y la vacunación anual obligatoria de todos los caprinos y ovinos de más de tres meses desde 2009 (que ya era voluntaria en 2008) (van den Brom *et al.*, 2015b), razón esta última por la que los resultados de serología en leche no son interpretables para valorar la evolución del grado de exposición de los animales al no poder distinguirse los anticuerpos vacunales de los propios de un contacto con la bacteria circulante. Por otra parte, en el estudio llevado a cabo en Bélgica en cabras también entre 2009 y 2012 (Boarbi *et al.*, 2014), donde no había tenido lugar ningún brote pero donde se puso en marcha un sistema de vigilancia y medidas de control a raíz del caso de Holanda, se observaron importantes diferencias en la prevalencia de rebaño en función del año, si bien esta se determinó mediante serología en tanque de leche. En los años 2009-2011, antes de que se instaurara la vacunación obligatoria, se pasó de un 26% a un 14% en 2011, si bien el tamaño de muestra fue mucho más reducido que en nuestro estudio (58 - 106 explotaciones por año). El único año en el que se muestrearon explotaciones en distintas épocas del año tampoco se observaron diferencias entre el primer y segundo semestre, sugiriendo una vez más un limitado efecto de la estacionalidad en la exposición a *C. burnetii* en las actuales condiciones de producción. En dicho estudio las muestras de tanque se evaluaron también mediante PCR, lo que reveló que el porcentaje de rebaños positivos mediante esta técnica se mantenía en valores similares en todos los muestreos (8,5% - 12%). Este resultado puso de manifiesto



que la fluctuación en los niveles de anticuerpos no estaría necesariamente relacionada con un aumento de la excreción y por ello con un aumento del riesgo de contaminación ambiental y contagio (Boarbi *et al.*, 2014).

En los cuatro años de estudio se identificó un patrón de agregación espacial global de los resultados, que, dependiendo del año, llegó a observarse desde el segundo hasta al cuarto nivel de vecindad según el test de Cuzick y Edwards. Este hallazgo sugiere que, en la región de estudio, cuando un municipio es clasificado como positivo, se incrementa el riesgo de que sus municipios vecinos sean también positivos, hasta el nivel de vecindad identificado en cada caso. Este nivel de agregación podría estar explicado por la existencia de fenómenos de transmisión de *C. burnetii* entre municipios vecinos, algo que sería posible por vías indirectas [transmisión aerógena de la bacteria, que puede desplazarse durante varios km cuando las condiciones ambientales son favorables (Hawker *et al.*, 1998)] o directas (a través del contacto directo de animales debido a la existencia de pastos frecuentados por rebaños de diferentes municipios). El año 2012, en el que las seroprevalencias a todos los niveles estudiados fueron más altas, es también el año en el que este patrón de agregación espacial se identificó hasta un nivel superior. Esto podría estar relacionado con que el hecho de que, debido a un mayor grado de infección de *C. burnetii*, existiera también una mayor carga bacteriana, lo que aumentaría la capacidad de transmisión de la enfermedad a los rebaños y municipios vecinos.

El modelo de Bernoulli del *scan statistic* también reveló la existencia de un patrón estable de agregación a nivel local durante los cuatro años de estudio en Castilla y León, identificando en todos ellos un *cluster* de alta incidencia de municipios positivos a fiebre Q en la misma área dentro de la región en estudio (en la mitad oeste de la misma).

Esta distribución asimétrica del riesgo podría estar relacionada con las características ambientales de las zonas de mayor riesgo, dado que la epidemiología de la fiebre Q está ampliamente condicionada por aspectos tales como la humedad ambiental y la pluviometría (Nusinovici *et al.*, 2015a; Wardrop *et al.*, 2016), el tipo de suelo (Nusinovici *et al.*, 2015a; Shabbir *et al.*, 2016; van der Hoek *et al.*, 2011a) y la acción del viento (Nusinovici *et al.*, 2015b; Pandit *et al.*, 2016) (Maurin y Raoult, 1999; Nusinovici *et al.*, 2015a; van Leuken *et al.*, 2016). Así, las zonas donde se localizaron los *clusters* coincidieron con las zonas de la comunidad autónoma que presentan un mayor índice de aridez (AEMET e ITACyL, 2017) en relación a la precipitación y evapotranspiración, con precipitaciones anuales medias especialmente bajas (AEMET e ITACyL, 2017) y niveles de radiación solar especialmente altos (AEMET e ITACyL, 2017) dentro de la comunidad autónoma. Estas condiciones climáticas favorecerían la desecación de la materia

orgánica donde *C. burnetii* puede estar presente, haciéndola así más susceptible de ser desplazada por el viento y por tanto favoreciendo la transmisión de la enfermedad. Además, estas zonas son también áreas donde se registran mayores niveles de velocidad del viento (Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía, 2017) de la zona mesetaria de Castilla y León, lo que podría contribuir a la dispersión de *C. burnetii*. Sin embargo, en cuanto a las características del suelo, este presenta las tasas más altas de retención hídrica de la región (AEMET e ITACyL, 2017), asociadas a su carácter arcilloso, lo que no sería un aspecto favorable en cuanto a la dispersión de *C. burnetii*.

Otro de los aspectos que podría relacionarse de algún modo con la epidemiología de la enfermedad en ovino en la región es la presencia y distribución de ganado bovino, suponiendo que este pudiera actuar como reservorio para el ovino. De hecho, Castilla y León está a la cabeza nacional en la producción de esta especie de rumiante, con más de un millón de cabezas censadas anualmente en el periodo de estudio (MAPAMA, 2009). Sin embargo, las zonas de alta incidencia identificadas en el análisis de *clustering* son regiones de densidad baja de ganado bovino dentro de la región (de entre una y diez cabezas en la mayoría de las zonas, con algunas áreas de mayor densidad) (AEMET e ITACyL, 2017).

Finalmente, es destacable también el hecho de los *clusters* de alta incidencia identificados se localizasen en regiones de mayor densidad de topillo campesino durante la importante plaga de 2007 que tuvo lugar en la región (Rodríguez-Ferri, 2017), especie en la que se ha descrito un posible papel en la transmisión de diferentes zoonosis, incluida la fiebre Q (Meerburg y Reusken, 2011). Las observaciones aquí descritas podrían sugerir un posible papel de la transmisión de *C. burnetii* por parte de dicho animal, cuyo efecto podría haberse reflejado en el aumento de los niveles de seroprevalencia en ovino en los años posteriores, en los que se realizó el estudio 1. Esta hipótesis podría verse reforzada por el hecho de que en el año 2007 y en menor medida en los posteriores, se observó que el área de mayor prevalencia de tularemia en ganado ovino (asociada a la transmisión por la plaga de topillo) coincidía también parcialmente con la localización de los *clusters* identificados (Rodríguez-Ferri, 2017). Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que desde 2007 hasta 2016 se analizaron frente a fiebre Q (entre otras zoonosis) más de 3000 muestras de topillos tomadas en el marco de las labores de vigilancia de tularemia, con resultado negativo en todos los casos (Rodríguez-Ferri, 2017). Sin embargo, no puede descartarse el posible papel del topillo como vector mecánico de la enfermedad.

En todo caso, la importancia del factor espacial en la determinación del riesgo en el ganado ovino de Castilla y León quedó demostrado por el análisis multivariable, en el que

una parte del riesgo no explicado por las variables incorporadas en los modelos adoptó una estructura espacialmente estructurada. Así, de acuerdo a los resultados del modelo, el riesgo no presentaba una distribución homogénea en toda la región de estudio, sino que, como puede apreciarse en la Figura 17, en líneas generales el riesgo era superior en mitad oeste de la región respecto a la zona este de la misma, si bien la distribución varió de un año de estudio a otro.

En una enfermedad como la fiebre Q, en la que se ha descrito una cierta estacionalidad, idealmente hubiera sido de interés que la realización de los muestreos se hubiera concentrado en una misma época en los cuatro años de estudio para evitar la influencia de la estación en los resultados y que estos fueran más comparables, o bien haber llevado a cabo una distribución homogénea de los muestreos a lo largo de todo el año en cada uno de los años de estudio con el fin de poder identificar algún patrón estacional. Sin embargo, desafortunadamente esto no pudo ser posible dado que la selección de muestras se hizo a partir de los saneamientos del Plan de erradicación de Brucelosis de Pequeños Rumiantes.

Los estudios 2 y 3 fueron llevados a cabo en la Comunidad de Madrid en bovino (estudio 2), y ovino y caprino (estudio 3). A diferencia de lo que ocurría en la vecina comunidad de Castilla y León, en la Comunidad de Madrid sí existían algunos datos previos que habían puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en estas especies domésticas, si bien los datos más actuales se circunscribían a un único estudio realizado en un número de muestras limitado (Valcárcel *et al.*, 2011), y el resto se habían realizado hace más de 25 años (Palau, 1989; Téllez *et al.*, 1989). Sin embargo, cabe destacar que la fiebre Q presenta un carácter endémico en esta región en humanos (Pascual-Velasco, 1996), con brotes descritos [el más reciente en 2004 (Ríos-Martín *et al.*, 2006)] y donde existe una exposición al patógeno por parte de la población humana, tal y como ponen de manifiesto los casos clínicos descritos (Ruiz-Seco *et al.*, 2011). Además, los estudios 2 y 3 han sido los primeros en evaluar en la región, además de los niveles de seroprevalencias frente a fiebre Q en rumiantes, la distribución geográfica y los factores de riesgo asociados.

Las **seroprevalencias individuales obtenidas en los estudios 2 y 3** fueron del 7% en bovino, 14% en ovino y 22% en caprino. Las prevalencias de rebaño observadas fueron, por su parte, del 30% en bovino y 68% en explotaciones de pequeños rumiantes, siendo más elevadas en las de caprino (Tabla 24). Estos resultados están en consonancia con los observados en otros estudios realizados en distintas localizaciones de España (Tablas

12 y 13) y del mundo (Tablas 1 - 6). Si bien los estudios 2 y 3 se llevaron a cabo en años diferentes, estos fueron cercanos entre sí en el tiempo (2009 para el estudio 2 y 2011 para el estudio 3), por lo que los resultados serían representativos de la situación epidemiológica de la enfermedad en las tres especies en un periodo concreto en el que no tuvieron lugar cambios importantes ni en la producción de estas especies ni en los casos clínicos de enfermedad en el hombre.

La identificación del bovino como la especie de rumiante doméstico con menor prevalencia en la Comunidad de Madrid coincide con lo observado también en el estudio de Valcárcel y colaboradores (Valcárcel *et al.*, 2011). Sin embargo, en el citado trabajo y a diferencia de lo observado en el estudio 3, los niveles de prevalencias en ovino observados fueron más altos que en caprino. Similares resultados (menor prevalencia en bovino que en pequeños rumiantes) se obtuvieron también en la vecina región de Serranía de Cuenca (Rodríguez *et al.*, 2010b) y en Huesca (González-Sinde, 1991 revisado por Pascual-Velasco, 1996), en ambos casos comparándose las especies ovina y bovina.

Estos resultados contrastan con otros hallazgos que, en términos generales, describen niveles de seroprevalencia medios a nivel mundial más altos en el bovino que en pequeños rumiantes [sección 3. 2. 1, (Guatteo *et al.*, 2010)]. Sin embargo, este extremo varía ampliamente dependiendo de la región en relación con diferentes aspectos, principalmente productivos y de manejo, y también en función de las especies de rumiantes domésticos predominantes en cada zona. En el caso concreto de la Comunidad de Madrid fue precisamente la especie con menor censo, la caprina, en la que se observó un mayor grado de exposición de acuerdo a los resultados del estudio 3. Este fenómeno en el que la especie de rumiante minoritaria presenta una mayor prevalencia no se ha descrito en ninguna otra región de España. Las dos únicas regiones de las que se dispone de información sobre prevalencias de las tres especies son el País Vasco y Canarias, y en ambos casos, la especie en la que se identificó una mayor prevalencia [el ovino en el País Vasco (Ruiz-Fons *et al.*, 2010) y el caprino en Gran Canaria (Rodríguez *et al.*, 2010b)], era, asimismo, la que presentaba mayor relevancia en la producción ganadera de cada región. También, a su vez, dichas especies se consideraban en cada caso como principal reservorio y fuente de infección para personas en estas dos zonas de alta incidencia de casos humanos. En esta misma línea, también en Galicia, comunidad autónoma que se caracteriza por su importante censo dentro de la producción bovina nacional, el porcentaje de seropositividad observado en un estudio en bovino fue claramente superior [22% individual (Saegerman *et al.*, 2016)] a uno realizado en ovino [4% individual (Díaz *et al.*, 2014)] (no se disponen datos de caprino en esta comunidad).

Estos mayores niveles de prevalencias observados en pequeños rumiantes respecto al ganado bovino en la región de Madrid podrían estar debidos en parte a la mayor susceptibilidad a la infección por *C. burnetii* descrita en pequeños rumiantes (van den Brom *et al.*, 2015c) comparado con el bovino, en el que con frecuencia no se observan signos clínicos en animales infectados (García-Ispuerto *et al.*, 2014), lo que conduciría a una menor excreción y por tanto menor índice de transmisión.

Por otra parte, pero en relación con lo anterior, en el estudio 3 se observó un porcentaje medio de animales seropositivos respecto al total de muestreados por granja del 45% en explotaciones solo de caprino, del 24% en el caso de rebaños ovinos y de 26% en rebaños mixtos. Este hecho podría ser el reflejo de una mayor circulación de *C. burnetii* en las explotaciones de caprino, en consonancia con la teoría que considera a las cabras más susceptibles a la infección que las ovejas (Klaasen *et al.*, 2014; van den Brom *et al.*, 2015c). De hecho, son numerosos los estudios en los que al evaluar las seroprevalencias de pequeños rumiantes en una determinada región observan niveles más altos en caprino que en ovino (Anastacio *et al.*, 2013; Asadi *et al.*, 2013; Guatteo *et al.*, 2010; Klaasen *et al.*, 2014; Lambton *et al.*, 2016; Magouras *et al.*, 2015; Masala *et al.*, 2004; Muema *et al.*, 2017; Obaidat y Kersh, 2017; Rizzo *et al.*, 2016; Schelling *et al.*, 2003). Por otro lado, el hecho de que en una misma región puedan observarse diferentes prevalencias dependiendo de la especie también podría estar relacionado con las cepas de *C. burnetii* circulantes en la región, ya que se ha descrito la existencia de cepas que presentan tropismo por una determinada especie tanto en animales domésticos como salvajes (González-Barrio *et al.*, 2016a; González-Barrio *et al.*, 2016b). Sin embargo, esta hipótesis no puede ser contrastada ya que no existen hasta la fecha estudios de caracterización molecular llevados a cabo en esta comunidad autónoma. Dichos estudios presentarían gran interés, no solo para ampliar el conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad en el reservorio animal, sino también para determinar el origen de los casos humanos que tienen lugar en esta región endémica donde se ha observado una importante exposición al patógeno por parte de su población (Ríos-Martín *et al.*, 2006; Ruiz-Seco *et al.*, 2011).

**En el caso del bovino**, los datos obtenidos en el estudio 2 fueron más bajos que el único trabajo reciente realizado en la Comunidad de Madrid, llevado a cabo entre 2007 y 2009, en el que las seroprevalencias estimadas fueron del 10,7% individual y del 50% en rebaño (Valcárcel *et al.*, 2011). Esta diferencia entre ambos estudios, que si bien no fue muy acusada en los resultados individuales sí es considerable en los datos de rebaño, podría estar determinada por el diseño de muestreo del citado estudio. Dicho trabajo se llevó a

cabo en un número muy limitado de rebaños ( $n = 18$ ) y animales ( $n = 253$ ), de los que además se desconocían características como la aptitud productiva, régimen de explotación o censo, todo lo cual contribuiría a limitar la posible interpretación de sus resultados. El estudio 2 de la presente memoria, sin embargo, se llevó a cabo empleando un diseño de muestreo que permitía garantizar la estimación de la prevalencia individual asumiendo un error del  $\pm 2\%$  y un nivel de confianza del 95%.

Los otros dos estudios realizados en bovino en Madrid, ambos publicados en 1989 (Palau, 1989; Téllez *et al.*, 1989), pusieron de manifiesto la circulación de *C. burnetii* en las poblaciones ovinas de la región hace 25 años. Sin embargo, la comparación de sus resultados con los obtenidos en nuestro trabajo es difícil dado que, por una parte, se llevaron a cabo con técnicas serológicas (IFI y FC) diferentes, y especialmente, por el escaso tamaño muestral, de 106 animales en un caso y únicamente 17 animales en otro, procedentes además estos últimos de una única población de la comunidad autónoma en la que habían tenido lugar varios casos humanos esporádicos.

En comparación con los resultados observados en otros países, las prevalencias individuales descritas en la Comunidad de Madrid (7%) están en la línea de las observadas en otros países europeos y de otras regiones del mundo (Tabla 1).

En lo que se refiere a la comparación de los resultados en bovino del estudio 2 con el resto de España, estos son muy similares a los reportados por dos estudios realizados en la región endémica del País Vasco (Maurin y Raoult, 1999; Ruiz-Fons *et al.*, 2011), como se considera también a Madrid, en una escala menor (Pascual-Velasco, 1996): uno de ellos llevado a cabo en rebaños de leche en régimen intensivo (Astobiza *et al.*, 2012a) y otro en rebaños de carne en semi-extensivo (Ruiz-Fons *et al.*, 2010). También, un estudio realizado en Valladolid en los años 90 mostró resultados similares a los descritos en el estudio 2 (Palenzuela, 1991 revisado por Pascual-Velasco, 1996). Asimismo, hay también regiones en España en las que se han observado prevalencias mayores a las aquí descritas, como es el caso de Galicia, región de importante producción bovina a nivel nacional, con un 22% de seroprevalencia individual (Saegerman *et al.*, 2016) o Cádiz, con un 39% (Ruiz-Fons *et al.*, 2008), si bien este último estudio se llevó a cabo en un número limitado de animales.

En el caso de los niveles de seroprevalencias observados en el estudio 3 en **ganado ovino**, estos fueron claramente inferiores (14% individual y 47% y 54% en rebaños ovinos y mixtos, respectivamente) a los descritos en el citado estudio de Valcárcel colaboradores (Valcárcel *et al.*, 2011), en el que se detectó una prevalencia individual y de rebaño de

33,1% y 83,3% respectivamente. En el caso del **ganado caprino**, las prevalencias individuales de dicho estudio también fueron más elevadas (28,6 frente a 22%), aunque la diferencia en este caso no fue tan acusada. Sin embargo, las prevalencias de rebaño en el trabajo de Valcárcel fueron sensiblemente más altas (92,8% frente al 75% en explotaciones caprinas y 54% en mixtas en el estudio 3). Al igual que se comentó en el caso del bovino, la interpretación de estas diferencias es difícil debido al limitado tamaño muestral especialmente en el caso del ovino (335 ovejas y 210 cabras procedentes únicamente de 12 y 14 granjas respectivamente) y la ausencia de información con respecto a ciertas variables en el estudio de Valcárcel (Valcárcel *et al.*, 2011).

Los niveles de seroprevalencia en ovino observados en la región de Madrid están en consonancia con los observados en el País Vasco [12,7% (Fernández-Aguilar *et al.* 2016) y 11,8% (Ruiz-Fons *et al.*, 2010)], en Badajoz y Córdoba (13,9% individual) (Astorga *et al.*, 2014), y en Castilla y León en el estudio 1 de esta memoria de tesis doctoral (Tablas 13 y 15). Este último aspecto podría sugerir que la circulación de *C. burnetii* en pequeños rumiantes sería similar en ambas comunidades autónomas, aunque en Madrid la producción de ambas especies es mucho más limitada que en el caso de Castilla y León. En cualquier caso, los resultados observados en la Comunidad de Madrid son los más altos descritos en estudios realizados España a partir del año 2000, con la excepción de Gran Canaria (Rodríguez, 2010a), con un 31,7% individual, y Valencia, en un estudio llevado a cabo en explotaciones con problemas reproductivos con un 17,8% (Villa, 2002). De igual forma, los resultados a nivel individual y de rebaño están también en consonancia con los descritos en otros países europeos y de otras regiones (Tablas 3 y 4).

Respecto al ganado caprino, los niveles de seroprevalencia descritos en el estudio 3 (22% individual, 75% en rebaños solo de cabras y 54% en rebaños mixtos), son, a diferencia de lo descrito para bovino y ovino, más altos que los descritos en el País Vasco, donde las cabras se consideran un reservorio secundario de *C. burnetii* en esta región endémica (Ruiz-Fons *et al.*, 2010). Sin embargo, los valores observados en la Comunidad de Madrid están por debajo de prácticamente el resto de estudios publicados en España en esta especie, escasos, por otra parte, y la mayoría de ellos llevados a cabo en las Islas Canarias, donde como se ha citado la fiebre Q es endémica (Rodríguez *et al.*, 2010b) (Tabla 14). Sin embargo, los valores son similares a los descritos en otros países (Tabla 3).

A pesar de que el diseño muestral no estaba destinado al cálculo de la prevalencia intra-rebaño sino a la detección de rebaños positivos, resultó sorprendente el porcentaje de

caprinos positivos respecto al total de muestreados por granja en explotaciones positivas (~45%), especialmente altos para un escenario de ausencia de brotes clínicos, ya que, a pesar de la escasez de estudios que evalúen este aspecto a nivel mundial, normalmente las altas prevalencias intra-rebaño se asocian a la presencia de fallos reproductivos en ovejas y cabras (Angelakis y Raoult, 2010; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Guatteo *et al.*, 2010). Así, en rebaños ovino del País Vasco con problemas de abortos asociados a *C. burnetii* se han descrito prevalencias intra-rebaño del 35,7%, 43,8% (Astobiza *et al.*, 2010) y 54% (Astobiza *et al.*, 2009)]. Por otro lado, también se han descrito elevadas prevalencias intra-rebaño en explotaciones asociadas a brotes humanos [50% (Webster *et al.*, 2009)].

En la línea de lo anterior, es destacable el hecho de que los resultados de positividad en el ganado caprino sean muy similares (e incluso claramente superiores a nivel de rebaño) a los observados en Holanda durante 2009-2010 (Schimmer *et al.*, 2011), periodo en el que el brote en dicho país estaba ya activo, y en el que se describió una prevalencia individual, de rebaño e intra-rebaño del 21%, 47% y 47% (en comparación con un 22%, 75% y 45% encontrado en esta tesis doctoral). Sin embargo, el contexto epidemiológico de ambos estudios es claramente diferente, ya que en Holanda la enfermedad estaba en una fase epidémica y afectaba a una población caprina probablemente poco expuesta a la infección hasta el momento (Houwers y Richardus, 1987). Por el contrario, el estudio 3 muestra un escenario de alta serprevalencia de la enfermedad en caprino en una región tradicionalmente endémica, pero en ausencia de brotes clínicos de acuerdo a la (limitada) información disponible. Así se refleja en el estudio de Valcárcel (Valcárcel *et al.*, 2011) y en un estudio más antiguo, publicado en 1989, llevado a cabo en una sola localidad de la Comunidad de Madrid con alta incidencia de casos humanos, y donde los niveles de seroprevalencias observados fueron incluso más altos a los descritos en el estudio 3, si bien el número de muestras fue muy limitado y las técnicas serológicas empleadas fueron distintas, como ya se mencionó para el ganado bovino (Téllez *et al.*, 1989).

En cualquier caso, los resultados obtenidos en el estudio 3 junto con la conocida amplia exposición humana a *C. burnetii* en una región como Madrid, con una relativamente frecuente aparición de casos humanos (Hellín, 1990; Ruiz-Seco *et al.*, 2011), en la se ha observado una mayor incidencia en personas en áreas rurales (Ausina, 1988; Daza-Pérez, 1980; Téllez *et al.*, 1989) y donde el último brote se asoció a la exposición a animales en una granja-escuela (Ríos-Martín *et al.*, 2006), sugieren que el ganado caprino puede desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la infección y transmisión



al hombre. Por ello, la vigilancia de la fiebre Q en esta especie sería particularmente recomendable en esta comunidad autónoma.

El análisis de la distribución espacial de las explotaciones bovinas positivas también reveló, al igual que en el estudio 1, un patrón de agregación global de las granjas infectadas, en este caso hasta el primer nivel de vecindad, si bien dicho patrón era inexistente en el caso de las explotaciones de pequeños rumiantes. La importancia del estatus del rebaño más próximo en el riesgo de infección en una granja se confirmó en el análisis multivariable, en el que la inclusión de dicha información mejoraba el ajuste del mismo (Tabla 21). La ausencia de patrón espacial global en las granjas de pequeños rumiantes podría deberse al menos en parte a las prevalencias más elevadas observadas en estos respecto al bovino, ya que el alto porcentaje de explotaciones positivas distribuidas en toda la región de forma homogénea podría dificultar la identificación de ningún patrón espacial. No obstante, de acuerdo al análisis multivariable, la delegación en la que se encontraban las explotaciones sí contribuyó a explicar parte del riesgo observado en explotaciones positivas, lo que podría deberse a un diferente nivel en función de la delegación o a otros factores de riesgo asociados de alguna manera a esta. La primera hipótesis (una presencia de áreas de mayor riesgo, coincidente de alguna manera con la división en delegaciones) no pudo ser confirmada no obstante en el análisis de agrupamiento espacial local, ya que tan solo fue posible detectar un agrupamiento de casos al aplicar un criterio conservador en la interpretación de los resultados e incluyendo únicamente las explotaciones con presencia de ovejas (de ovino o mixtas) (Figura 26).

La ausencia de un patrón localizado en la distribución de las explotaciones positivas de rumiantes domésticos en la Comunidad de Madrid fue un denominador común de los estudios 2 y 3. Dicha ausencia es particularmente notable en el caso del bovino, ya que está en contradicción con los resultados obtenidos en el test de Cuzick y Edwards. Dado que la identificación de asociación espacial entre las explotaciones positivas tiene sentido biológico dada la naturaleza infecciosa de la fiebre Q y su capacidad de transmisión de una granja a otra, estos resultados podrían indicar que, no obstante, dicho riesgo es solo patente a niveles muy locales, siendo por tanto insuficiente para la generación de agrupamientos más relevantes desde el punto de vista poblacional que pudieran ser detectados en el *scan statistic*. De hecho, la inspección visual de la distribución geográfica de explotaciones positivas y negativas, representada en la Figura 19, concuerda con esta explicación, dado que los casos parecen estar distribuidos de forma más o menos homogénea por toda el área de muestreo, lo que apoyaría la ausencia de agrupación local de casos positivos.

Por el contrario, en los pequeños rumiantes, los resultados de los análisis de detección de agrupamiento a nivel local estarían en consonancia con el análisis a nivel global, de acuerdo con la teoría antes formulada de que el alto porcentaje de explotaciones positivas distribuidas en toda la región de forma homogénea dificultaría la identificación de ningún patrón espacial, al estar la enfermedad ampliamente extendida en la región en estas especies. Sin embargo, cabe destacar el hecho de que al emplear una interpretación conservadora de los resultados serológicos del ELISA se detectó un *cluster* significativo al evaluar los rebaños con presencia de ovejas (solo de ovino o mixtos,  $n = 129$ ). Las diferencias en los resultados en este caso estarían directamente asociadas con empleo de una u otra interpretación de los resultados del test diagnóstico, donde encontraríamos siete explotaciones con un solo animal con un resultado dudoso en el ELISA, que se traduciría en considerar la explotación como positiva con el enfoque sensible pero negativa con el enfoque conservador. Este hallazgo pone de manifiesto la importancia de realizar una interpretación cuidadosa de los datos a la hora de definir un caso como tal.

La identificación de un patrón de asociación espacial local más marcado en el caso de los resultados de Castilla y León respecto a los de Madrid pudo ser indicativo de una dinámica de mantenimiento y transmisión de la enfermedad diferente (más activa en el caso de Castilla y León). Sin embargo, también pudo tener que ver con la diferencia en la unidad de análisis empleada, el municipio en el caso de Castilla y León y el rebaño en el caso de la Comunidad de Madrid. El hecho de que la obtención de resultados que muestren patrones o asociaciones espaciales diferentes dependa tanto de la escala o tamaño de las unidades de análisis como del modo en que se agreguen los datos disponibles es un fenómeno ampliamente observado en este tipo de análisis, denominado MAUP (*Modifiable Areal Unit Problem*) (Gehlke y Biehl, 1934; Openshaw, 1983), y que puede por tanto condicionar los resultados obtenidos. Así, el empleo de del rebaño como unidad de análisis utilizado en el caso de los estudios en Madrid sería más adecuado desde un punto de vista biológico de trasmisión de la enfermedad. Sin embargo, la mayor escala de la unidad de análisis empleada en Castilla y León, el municipio, en la cual, para clasificar a un municipio como positivo era suficiente con que una de las granjas muestreadas en el mismo fuera positiva, podría en cierta medida ser una limitación del análisis dado que se estaría empleando un criterio muy estricto o sensible que podría explicar, al menos parcialmente, la detección de la asociación espacial en varios niveles de proximidad descrita para Castilla y León. De hecho, se ha descrito que es más frecuente la detección de asociaciones más pronunciadas cuando la escala de la unidad de análisis empleada es mayor.

El uso del municipio como unidad de análisis espacial en Castilla y León constituye sin duda uno de los puntos débiles de este estudio, que tuvo que ser asumido debido a la ausencia de información espacial más detallada a nivel de explotación. Sin embargo, y como se mencionó anteriormente, la importancia del efecto espacial en el riesgo de positividad en Castilla y León quedó también patente en el análisis multivariable.

En cualquier caso, desde un punto de vista metodológico, los resultados obtenidos en los tres estudios ponen de manifiesto la importancia del empleo de más de un test analítico a la hora de evaluar la posible existencia de un patrón espacial en la distribución de una determinada enfermedad en una región de estudio, así como la influencia de la definición de un caso positivo sobre los resultados. La interpretación conjunta de las distintas observaciones permite formular hipótesis y llegar a conclusiones que muestren el mayor sentido biológico posible y por tanto sean más representativas de la epidemiología de la enfermedad en estudio.

En cuanto al **análisis de factores de riesgo** llevado a cabo en los tres estudios, los resultados obtenidos están, en líneas generales, en consonancia con las observaciones descritas en otros trabajos de investigación y que han contribuido a definir los principales aspectos característicos de la epidemiología de la enfermedad en poblaciones de rumiantes domésticos en distintas regiones del mundo. Sin embargo, ello no resta interés ni valor a los resultados obtenidos, ya que los trabajos que constituyen la presente memoria aportan información que no había sido evaluada en otras regiones de España con anterioridad y por ello valiosa para contribuir a ampliar el conocimiento sobre la epidemiología de la fiebre Q en rumiantes domésticos en nuestro país.

En primer lugar, en cuando a **factores de riesgo a nivel de municipio**, su estudio solo se contempló en el caso del estudio 1, en rebaños ovinos de Castilla y León, donde se evaluó el efecto del número de explotaciones y animales de las especies ovina y caprina, así como la densidad de estos (individual y de explotación) por municipio. Así, la inclusión de la densidad de explotaciones en los modelos finales de cada año de estudio permitió un mejor ajuste de los mismos, lo que sugeriría un aumento del riesgo de positividad asociado al incremento de la densidad del municipio de origen. El mayor riesgo presente en zonas de alta densidad ganadera ha sido descrito previamente en otros trabajos, tanto en pequeños rumiantes (Lambton *et al.*, 2016; Meadows *et al.*, 2015a; Schimmer *et al.*, 2011; Schimmer *et al.*, 2014) como en bovino (Nusinovici *et al.*, 2014). En dichas zonas, la alta densidad animal favorecería el mayor grado de contaminación del ambiente por

parte de un número superior de animales excretores, y a su vez, la proximidad entre granjas facilitaría la transmisión aerógena de *C. burnetii* de una explotación a otra.

En lo que se refiere a los **factores de riesgo a nivel de explotación**, el tipo de **aptitud productiva** presentó una asociación inequívoca con los resultados en los tres estudios aquí presentados. Así, tanto en ovino de Castilla y León (estudio 1) como en bovino y pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid (estudios 2 y 3), los modelos empleados identificaron a la aptitud láctea como factor de riesgo asociado a la mayor probabilidad de detección de resultados positivos en la serología de fiebre Q dentro de un rebaño.

En el caso del estudio 1, el número medio de animales positivos del total de muestreados por explotación en granjas de aptitud láctea fue superior al doble de los detectados en explotaciones de carne en todos los años de estudio salvo en 2012. Esto se tradujo en una estimación posterior mediana del OR de detectar un ovino positivo en un rebaño de aptitud láctea del 2,28 respecto a un rebaño de aptitud cárnica en los años 2009-2011, mientras que en 2012 esta diferencia fue menos acusada (OR = 1,29).

En el caso del estudio 3, realizado en explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid, se estimó un OR indicador del riesgo de detectar un ovino positivo en un rebaño de aptitud láctea de 2,92 respecto a los rebaños de aptitud cárnica, resultado similar al del estudio 2. En este caso, las prevalencias de los rebaños de leche fueron del 67% frente al 43% en rebaños carne, valores dentro del rango descrito en estudio en Castilla y León, lo que podría indicar que la aptitud productiva es un factor que afecta de manera similar a los rebaños de ovino (y pequeños rumiantes en general en el caso del estudio 3) en las dos comunidades autónomas estudiadas. En el caso de las explotaciones de aptitud mixta (doble propósito), se observó que tanto el nivel de prevalencia observado (83%) como el OR respecto a las explotaciones de carne era superior al observado en las de leche, si bien solo se incluyeron en el estudio seis rebaños de este tipo, lo que dificulta la interpretación de resultados y obtención de conclusiones a partir de los mismos, como queda reflejado en los intervalos de confianza generados mediante *bootstrapping*. En cualquier caso, el hecho de que los rebaños mixtos incluyan animales de aptitud lechera implica que el manejo productivo pueda estar más próximo a una explotación de leche que de carne, lo que podría asociarse a las elevadas prevalencias descritas.

El mayor riesgo de positividad en explotaciones de leche, descrito con anterioridad en ovino (Kim *et al.*, 2005; McCaughey *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2014; Ryan *et al.*, 2010;

Vangeel *et al.*, 2012) y ovino y caprino (Meadows *et al.*, 2015a, b) se asocia normalmente a una mayor intensificación en el manejo de las explotaciones de leche, en las que suelen combinarse dos factores: censos elevados y la constante estabulación de los animales, lo que favorecería especialmente la concentración de *C. burnetii* en las instalaciones y, por tanto, la dispersión de la misma dentro del rebaño. Otro de los aspectos que caracterizan el manejo intensivo de los rebaños de leche es el relacionado con el manejo de los periodos de paridera. Dicho periodo es el de más alto riesgo de infección, ya que durante el aborto o el parto se liberan cantidades masivas de microorganismos al ambiente (van den Brom *et al.*, 2015c): en rebaños de leche de todas las especies de rumiantes domésticos se tiende a que tengan lugar partos durante todo el año con el fin de mantener la producción láctea, incluso en pequeños rumiantes, poliéstricos estacionales en condiciones naturales. De hecho, se ha identificado como factor de riesgo en explotaciones caprinas la existencia de épocas de parto sucesivas en el mismo año de acuerdo con un modelo de producción más intensificado (Bond *et al.*, 2016). En explotaciones de carne, sin embargo, el periodo de paridera suele tener un carácter más estacional, especialmente en pequeños rumiantes, donde se tiende a ajustar a los momentos del año con mayor demanda en los mercados de cada región (Hogerwerf *et al.*, 2013), pero también en bovino, lo que podría limitar los periodos de riesgo de diseminación del patógeno en el rebaño, disminuyendo por tanto la prevalencia intra-rebaño.

Si bien en otros países, como Canadá, se ha demostrado que el tipo de producción está asociado de manera significativa con los niveles de seropositividad en pequeños rumiantes, siendo estos más altos en granjas ovinas y caprinas de producción láctea (Meadows *et al.*, 2015a, b), en España nunca se había evaluado este factor de riesgo en estas especies, dado el reducido número de estudios publicados. Así, la mayoría de los estudios realizados en ovino se han llevado a cabo en el País Vasco, donde 90% de los rebaños están formados por ovejas de aptitud láctea de raza Latxa en régimen semi-extensivo.

En el caso del estudio 2, llevado a cabo en bovino de la Comunidad de Madrid, también pudo observarse un nivel de seroprevalencia de rebaño en explotaciones de leche mucho más elevado que en el de carne (un 75% en rebaños de aptitud láctea frente a un 25% en rebaños de carne). Así, el riesgo de encontrar al menos un animal seropositivo en granjas de leche fue nueve veces más alta que la posibilidad de detectar un animal reactor en explotaciones de carne (Tabla 19), una diferencia sustancialmente mayor que la descrita en los dos estudios en pequeños rumiantes de la presente memoria. Son diversos los

estudios sobre prevalencias en bovino de distintos países (estimadas mediante test serológicos individuales o a partir de análisis con ELISA o PCR de muestras de tanque de leche) que muestran resultados similares a los observados en el estudio 2 (75%) (Tablas 1 y 2). Si bien en España no se ha publicado ningún estudio evaluando este factor de riesgo en un solo trabajo, en dos estudios realizados en la provincia de Vizcaya sobre rebaños bovinos de leche con manejo intensivo y semi-intensivo y rebaños de carne de tipo extensivo, se observaron prevalencias de rebaño e individuales similares (Astobiza *et al.*, 2012a; Ruiz-Fons *et al.*, 2010), si bien la prevalencia intra-rebaño observada fue superior en el caso de explotaciones de leche respecto a las de carne (13,5% de los rebaños de leche estudiados presentaban una prevalencia intra-rebaño superior al 20% frente a un 7,1% en los de carne), lo cual pondría explicarse por una circulación más activa de la bacteria en rebaños de leche. Finalmente, cabe destacar que en el estudio 2 de la presente tesis se han evaluado por primera vez los niveles de fiebre Q en ganado de lidia, no habiéndose detectado animales reactivos en este tipo de rebaños, lo que sugiere que el manejo extensivo propio de este tipo de producción podría ayudar a disminuir el riesgo de infección por *C. burnetii*, aunque en este caso no se puede descartar un efecto asociado a la raza.

Otro de las variables a nivel de rebaño que se evaluó en los tres estudios fue el **censo de las explotaciones**. Así, en el caso del estudio 1 la variable tamaño de explotación se incluyó en el modelo final de los años 2009 a 2011 categorizada en cuartiles, donde en todos los años se observó que el OR de los rebaños incluidos en los cuartiles 2, 3 y 4 fue superior respecto al cuartil 1, valor que en el caso de los años 2009 y 2010 se incrementaba progresivamente con el cuartil. Aunque dicha variable no fue incluida en el modelo final de 2012, también en dicho año se observó una cierta tendencia en el aumento de la prevalencia de rebaño en cuartiles superiores (Tabla 17).

En el caso del estudio 2 llevado a cabo en bovino de la Comunidad de Madrid se obtuvieron resultados similares a este respecto, observándose que el porcentaje de rebaños positivos en el cuartil 1 era del 26% mientras que en el cuartil 4 ascendía a un 41%. Sin embargo, en este caso, a pesar de que en el análisis univariable se observaron diferencias estadísticamente significativas, esta variable no fue retenida en el modelo final. Esta asociación entre el incremento del tamaño de rebaño y el riesgo de exposición a fiebre Q ha sido ampliamente descrita en diversos estudios en España (Piñero *et al.*, 2014b) y otros países (sección 2. 2. 4. 2.). Esta relación entre el incremento del riesgo de acuerdo al tamaño de la explotación puede relacionarse con el hecho de que la población en riesgo es mayor en rebaños más grandes, dado que existe un mayor número de

hembras preñadas que pueden estar infectadas y, por tanto, pueden excretar *C. burnetii* durante el parto o el aborto, contaminando así el ambiente. Por otra parte, un mayor censo implica una población susceptible de contraer la infección mayor, lo cual, a su vez, dificulta la eliminación de la infección en el rebaño. También los rebaños más grandes suelen tener un mayor número de entradas de animales y con ello mayor probabilidad de entrada del patógeno.

En el caso del estudio 3, sin embargo, no se identificó asociación alguna entre el tamaño de las explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid y el riesgo de exposición a *C. burnetii*. De hecho, el porcentaje de rebaños positivos fue similar en los cuatro cuartiles (entre el 46% y el 54%). Este hallazgo podría asociarse al hecho de que en los rebaños del estudio 3, presentaron, en general, un tamaño de rebaño reducido (RIQ = 15 - 175) que podría haber determinado que no se observasen diferencias asociadas a este factor, claramente inferiores a los descritos en el estudio 1 en Castilla y León (RIQ = 92 - 460). Sin embargo, en un estudio realizado en rebaños de pequeños rumiantes en Italia con un censo muy reducido sí pudo identificarse el tamaño de rebaño como factor de riesgo (Rizzo *et al.*, 2016).

Otra de las variables a nivel de rebaño evaluadas en el estudio 1 en rebaños ovinos de Castilla y León como posible factor de riesgo fue el **manejo productivo** de las explotaciones (de tipo extensivo, intensivo o mixto). En dicho trabajo se observó que, en los cuatro años de estudio, el porcentaje de rebaños positivos entre los que presentaban cierto nivel de intensificación (intensivos o mixtos) era superior al mostrado por aquellos rebaños puramente extensivos (63% vs. 66% en 2009, 52% vs. 60% en 2010, 53% vs. 64% en 2011 y 74% vs. 78% en 2012). Así, esta variable fue retenida en el modelo final de los años 2011 y 2012 ya que mejoraba el ajuste de los mismos. Como se ha venido describiendo a lo largo de esta memoria, las distintas características de la producción intensiva, tales como la mayor densidad de animales en las explotaciones, asociadas a la estabulación y al mayor censo, así como el incremento de los partos y su presencia durante todo el año, hacen que el riesgo de exposición a *C. burnetii* sea superior en este tipo de explotaciones.

Por otro lado, en el caso del estudio 2 en bovino de la Comunidad de Madrid, tanto el estatus frente a fiebre Q como el tipo productivo de la explotación más cercana a cada una de las explotaciones estudiadas fueron identificados como posibles factores de riesgo en el análisis bivariado de los datos, si bien en el modelo multivariable no mostraron resultados estadísticamente significativos.

En el caso del estudio 1 en ovino de Castilla y León, el hecho de que en cada año de estudio variasen las variables incluidas en el modelo final que por tanto se encontrasen diferencias en las variables que definían el riesgo de exposición a *C. burnetii* pudo estar asociado en parte con las subpoblaciones muestreadas en cada uno de los años, dado que no más del 50% de las granjas fue incluida en dos años consecutivos.

Pasando a los **factores de riesgo identificados a nivel individual**, evaluados en los estudios 2 y 3 de la presente memoria, la **edad de los animales** (categorizada en cuartiles) fue identificada como factor de riesgo en rebaños bovinos y de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid. El incremento del número de animales reactivos en individuos de más edad es un fenómeno que ha sido ampliamente descrito en diversos estudios de distintas regiones y con diferentes sistemas de explotación, tanto en bovino como en pequeños rumiantes (sección 2. 2. 4. 1.). En España, este factor de riesgo ha sido identificado en el caso de bovino de leche (Astobiza *et al.*, 2012a; Piñero *et al.*, 2014b) ovino de leche (García-Pérez *et al.*, 2009), ovino de carne en régimen semi-extensivo (Díaz *et al.*, 2014) así como en pequeños rumiantes en régimen semi-extensivo (Ruiz-Fons *et al.*, 2010). Esta asociación vendría explicada por el hecho de que la probabilidad de exposición a *C. burnetii* en algún momento de la vida del animal se incrementa con el paso del tiempo. Además, se ha observado además una relación entre el mayor riesgo de seropositividad y el comienzo de la actividad reproductiva de los animales, por una parte, por el hecho de que es en ese periodo en el que los individuos pasan a estar en contacto con los grupos de individuos adultos de la explotación, lo que incrementa el riesgo de infección por contacto con animales infectados, y por otro lado porque en el momento del acontecimiento reproductivo se produce un incremento de los niveles de anticuerpos en individuos infectados (Astobiza *et al.*, 2012a; García-Pérez *et al.*, 2009; Tutusaus *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de que la edad es uno de los factores de riesgo más ampliamente identificados, existen algunos estudios en los que no se ha demostrado tal asociación, como en el realizado en vacuno de carne en régimen extensivo en España (Ruiz-Fons *et al.*, 2010) o en vacuno de leche en Irlanda (Ryan *et al.*, 2011b).

En el estudio 2, la asociación entre la edad y el resultado del test se detectó tanto en bovinos de leche como de carne y en ambos casos se encontró una proporción más alta de animales reactivos principalmente en individuos de más de cinco años. Sin embargo, la tendencia en la probabilidad esperada de obtener un resultado positivo obtenida en el análisis de regresión fue claramente diferente dependiendo del tipo de producción del rebaño de origen, con una probabilidad media predicha del 25% en ganado de leche de cinco años mientras que esta misma probabilidad se observó en ganado de carne de 14



años (Figura 21). Esto explicaría que, a pesar de que la muestra de ganado lechero del citado estudio en general era más joven que el ganado vacuno, y la edad se asoció con resultados positivos, existía una mayor proporción de animales reactivos dentro de los rebaños de leche. De hecho, al llevar a cabo el análisis empleando la interpretación conservadora del test ELISA, la relación entre la edad y el resultado positivo en el test pasaba a ser no significativa en ganado de carne, lo que sugeriría una asociación más débil en este tipo productivo. También en el estudio 3 se pudo observar esta relación entre la edad y resultado serológico en pequeños rumiantes, observándose una proporción más alta en animales de más de seis años, similar a lo observado en el estudio en bovino.

En el estudio 2 llevado a cabo en rebaños de bovino de la Comunidad de Madrid, también se evaluaron como posibles factores de riesgo a nivel individual el origen de los animales (nacidos en la propia explotación o comprados) y el número de movimientos entre granjas, dado que en distintos trabajos se ha puesto de manifiesto el aumento del riesgo asociado con la entrada de animales externos (Brennan y Christley, 2012; Obaidat y Kersh, 2017), así como el mayor número de movimientos entre granjas (Nusinovici *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2014). No obstante, en este estudio ninguno de estos dos factores mostró una asociación significativa con los resultados serológicos individuales.

En lo que respecta a las limitaciones del presente trabajo, uno de los aspectos que podría haber condicionado los resultados obtenidos en los tres estudios son los valores de especificidad y sensibilidad asumidos para el test ELISA empleado en los mismos. Dichos valores (que si bien fueron ligeramente distintos en cada trabajo esto supuso un impacto mínimo en el número final de animales a muestrear) se estimaron teniendo en cuenta los distintos resultados reflejados en distintos trabajos publicados en torno a la evaluación diagnóstica de diversos test ELISA. Así, si bien en general se asume que la eficiencia de los test ELISA para detección de anticuerpos frente a *C. burnetii* en rumiantes es alta, los distintos estudios disponibles han reportado una amplia variabilidad en cuanto a la eficiencia diagnóstica dependiendo del test (Tabla 7), aspecto por otra parte esperable y que puede venir determinado por diversos aspectos como el antígeno empleado, la especie de procedencia del suero, la definición de caso en cada estudio, etc.

Otra de las limitaciones del presente trabajo en lo que respecta al análisis espacial está en relación con el hecho ya citado del empleo de una unidad de análisis diferente en el estudio 1 en ovino de Castilla y León (donde se empleó el municipio como unidad de análisis), respecto a los estudios 2 y 3 llevados a cabo en bovino y pequeños rumiantes

de la Comunidad de Madrid (donde la unidad de análisis fue la explotación). Como se ha comentado anteriormente, el empleo de una diferente unidad de análisis condiciona la definición de caso y por ello puede haber afectado a los resultados obtenidos en el caso de los datos de Castilla y León y a su comparación con los obtenidos en la Comunidad de Madrid, debido en parte al problema denominado MAUP también citado anteriormente.

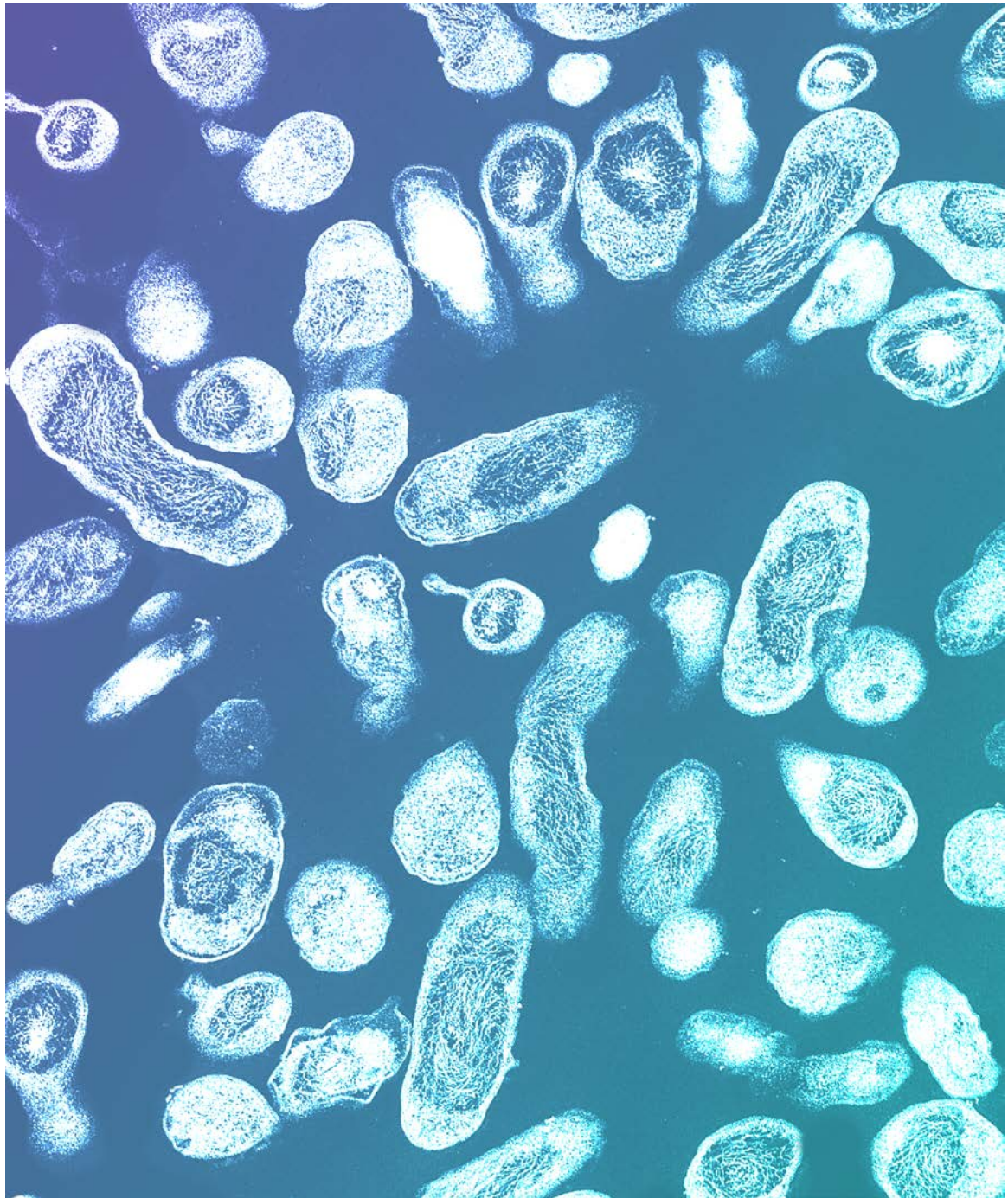
También en el caso del estudio en ovino en Castilla y León ha de contemplarse como posible limitación el hecho de que, a diferencia de los dos estudios realizados en Madrid (en los que la selección de explotaciones se realizó de manera aleatoria dentro del total de rebaños registrados en la comunidad autónoma), en Castilla y León, las regiones susceptibles de muestrearse se circunscribieron a aquellas UVLs consideradas de riesgo de frente a tularemia de acuerdo al Procedimiento de vigilancia de dicha enfermedad, en el marco del cual se realizó el muestreo para fiebre Q. Esto implicó que ciertas zonas de la región quedaran fuera del muestreo, lo que junto con el hecho de que las explotaciones a muestrear se seleccionaron por conveniencia y no de forma aleatoria, hacen que no pueda descartarse un posible sesgo en los resultados asociado a las características del muestreo.

Otra de las diferencias metodológicas entre los tres estudios aquí presentados y que podrían influir en los resultados obtenidos fue el empleo de diferentes aproximaciones analíticas a la hora de abordar el análisis multivariable dependiendo el estudio. En el análisis de los datos de ovino de Castilla y León se empleó un modelo Bayesiano, más apropiado para el análisis de estructuras jerárquicas más complejas, como en este caso era las explotaciones pertenecientes a sus correspondientes municipios (Carlin y Louis, 2009) mientras que los datos de bovino, ovino y caprino de la Comunidad de Madrid se analizaron mediante un análisis frecuentista.

En resumen, el trabajo realizado en la presente memoria de tesis doctoral aporta información relevante para el conocimiento de la epidemiología de la fiebre Q en rumiantes domésticos en la zona de la meseta central, en concreto en ovino en Castilla y León y en bovino, ovino y caprino en la Comunidad de Madrid. En dichas regiones la información disponible sobre fiebre Q en sus principales reservorios ha sido hasta ahora muy limitada a pesar de que en ambas la producción ganadera de estas especies presenta un papel relevante. Así, los resultados aquí presentados ponen de manifiesto que la epidemiología de esta enfermedad presenta importantes puntos en común en las distintas especies, regiones y años evaluados. Así, se ha evidenciado la amplia exposición a *C. burnetii* en las especies estudiadas en ambas regiones, siendo la primera

vez en la que se evalúa esta enfermedad en ganado de lidia. Además, también se han identificado factores de riesgo asociados a la exposición a la bacteria en las poblaciones de estudio, como es el caso de la aptitud láctea en los tres trabajos, el tamaño de rebaño y el manejo productivo más intensivo y la densidad de pequeños rumiantes del municipio de origen en ovino de Castilla y León, así como el incremento de la edad de los animales tanto en bovino como en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid. Asimismo, también se identificó que la distribución de casos en ovino de Castilla y León no era homogénea en todo el territorio, sino que estaba influida en los cuatro años de estudio por un componente espacial persistente incluso tras tener en cuenta el efecto de otras variables asociadas con el riesgo de positividad en el ELISA, habiéndose identificado un *cluster* de alta incidencia de casos en cada año del estudio. Estos resultados contribuyen a determinar qué tipo de explotaciones y qué regiones presentan mayor riesgo de exposición a *C. burnetii*, lo que resulta de utilidad a la hora de establecer planes de vigilancia. Asimismo, la ampliación del conocimiento de la epidemiología en estas regiones podría contribuir a poder dar una respuesta más rápida y adecuada ante la posible aparición de un brote, ya que el éxito del control de cualquier enfermedad infecciosa pasa por conocer adecuadamente su epidemiología.

En cualquier caso, es necesario seguir llevando a cabo estudios sobre fiebre Q en estas regiones, dado que aún existen numerosos aspectos sobre la misma sin esclarecer, como poder determinar las causas asociadas a la dependencia espacial de los resultados observados en Castilla y León. Así, sería de gran interés la evaluación de posibles factores de riesgo de tipo ambiental que pudieran tener una influencia en la epidemiología de la enfermedad. Asimismo, en el caso de Castilla y León, también aportaría información valiosa la evaluación de la presencia y distribución de la enfermedad en ganado bovino y caprino, también presentes en la comunidad autónoma pero no estudiados hasta la fecha. Por otra parte, sería conveniente la realización de estudios de detección directa de *C. burnetii* en explotaciones de estas regiones, con el fin de confirmar la circulación activa de la bacteria y determinar el verdadero riesgo de las tres especies de rumiantes domésticos como fuente de infección a *C. burnetii* en estas dos comunidades autónomas. Asimismo, dichos estudios serían de utilidad para identificar los genotipos circulantes, la posible preferencia de hospedador en los mismos, y su comparación con los genotipos identificados en otras regiones, en especies salvajes y en humanos.



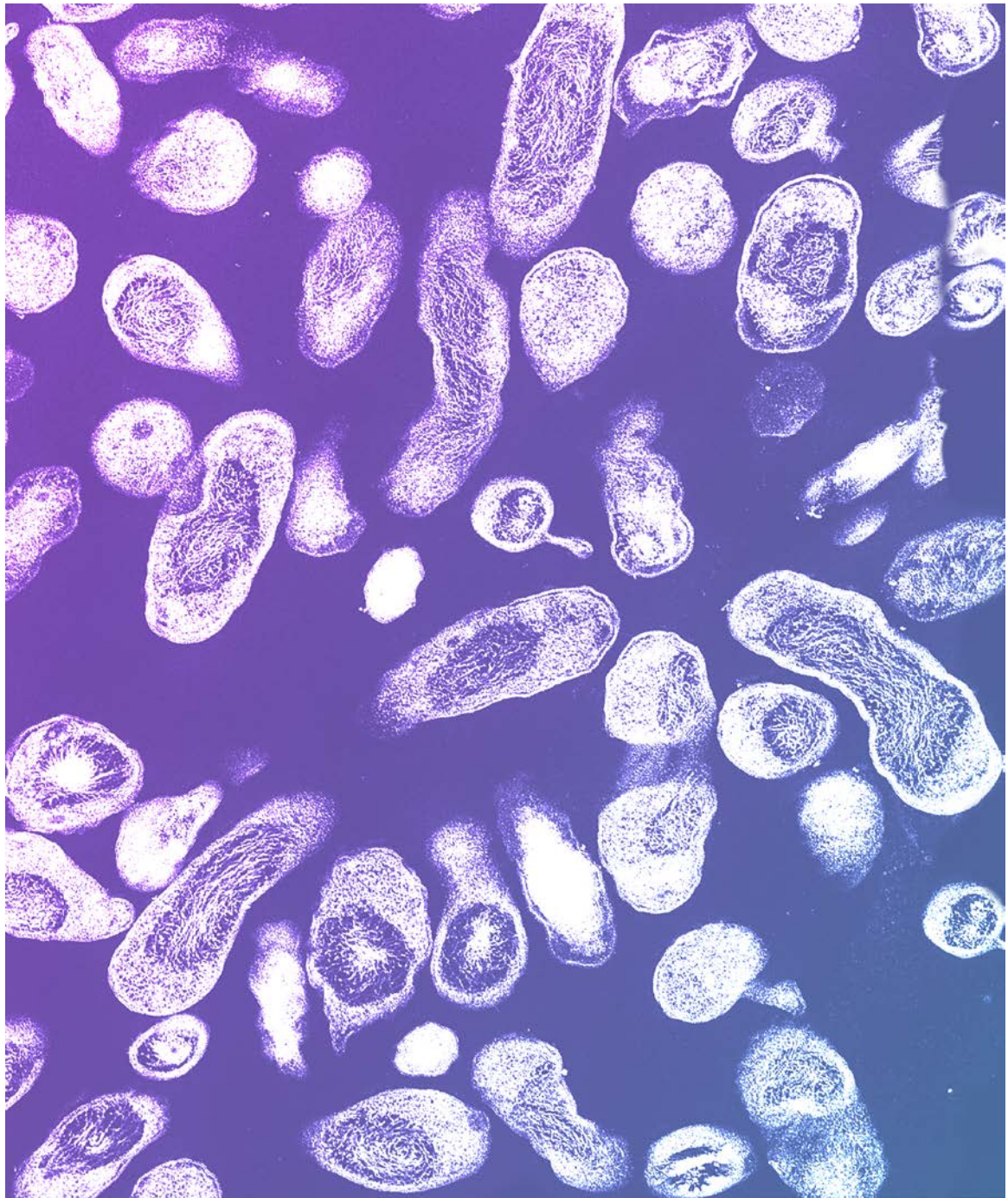
## **CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

1. Los niveles de seroprevalencia frente a *Coxiella burnetii* en el ganado ovino de Castilla y León durante 2009-2012, determinados mediante la detección de anticuerpos específicos, fueron elevados (superiores al 50% y 10% en rebaño e individual, respectivamente), lo que sugiere un amplio grado de exposición de esta especie ganadera a *C. burnetii*.
2. Los niveles de seroprevalencia frente a *C. burnetii* observados en rumiantes domésticos de la Comunidad de Madrid en 2009 y 2011 (30% y 7% en rebaño e individual respectivamente en explotaciones de bovino, 47% en rebaño en rebaños de pequeños rumiantes y 14% y 22% individual en ovino y caprino, respectivamente), son indicativos de un alto grado de exposición a la citada bacteria en las tres especies evaluadas, siendo este efecto más marcado en el caso de los pequeños rumiantes.
3. El análisis de los datos de seroprevalencia frente a *C. burnetii* reveló la existencia de un marcado y estable patrón espacial a nivel global y local en la distribución de los animales y explotaciones seropositivos en Castilla y León en 2009-2012.
4. En el caso de los rumiantes de la Comunidad de Madrid, dicho patrón de distribución espacial fue menos evidente, lo que sugeriría un riesgo de exposición a *C. burnetii* más homogéneo en toda la región de estudio.
5. El análisis de los resultados obtenidos en ganado ovino de Castilla y León permitió identificar un mayor riesgo de exposición a *C. burnetii* en animales pertenecientes a explotaciones de leche (2009-2011), intensivas/de manejo mixto (2011 y 2012) y de mayor tamaño (2009-2011).
6. En el caso de los rumiantes de la Comunidad de Madrid, se determinó que el riesgo de exposición a *C. burnetii* era superior en explotaciones de aptitud láctea, así como en animales de mayor edad tanto en bovino como en pequeños rumiantes. Además, en el caso de los rebaños bovinos, también se identificó un mayor riesgo en explotaciones de mayor tamaño.





## **BIBLIOGRAFÍA**





## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aarts, H.J., Boumedine, K.S., Nesme, X., Cloeckart, A., 2001. Molecular tools for the characterisation of antibiotic-resistant bacteria. *Veterinary research* 32, 363-380.
- Abad, A., Pardo, C., Imaz, M., 1999. [Q fever: a retrospective study over the last 10 years in the area of the Hospital de Basurto (Bilbao)]. *Revista clínica española* 199, 618-619.
- Abakar, M.F., Nare, N.B., Schelling, E., Hattendorf, J., Alfaroukh, I.O., Zinsstag, J., 2014. Seroprevalence of Rift Valley fever, Q fever, and brucellosis in ruminants on the southeastern shore of Lake Chad. *Vector borne and zoonotic diseases* 14, 757-762.
- Abdel-Moein, K.A., Hamza, D.A., 2017. The burden of *Coxiella burnetii* among aborted dairy animals in Egypt and its public health implications. *Acta tropica* 166, 92-95.
- Abellan, J.J., Richardson, S., Best, N., 2008. Use of space-time models to investigate the stability of patterns of disease. *Environ Health Perspect* 116, 1111-1119.
- Abinanti, F.R., Lennette, E.H., Winn, J.F., Welsh, H.H., 1953. Q fever studies. XVIII. Presence of *Coxiella burnetii* in the birth fluids of naturally infected sheep. *American journal of hygiene* 58, 385-388.
- Abramson, J.H., 2011. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov* 8, 1.
- Abril, V., Ortega, E., Segarra, P. *et al.*, 1995. El hígado en las infecciones por *Coxiella burnetii* y *Rickettsia conorii*. Estudio comparativo. In: III Simposium Ibérico sobre *Ixodoidea* y enfermedades transmitidas, Alcalá de Henares, 74.
- Adesiyun, A.A., Cazabon, E.P., 1996. Seroprevalences of brucellosis, Q-fever and toxoplasmosis in slaughter livestock in Trinidad. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 49, 28-30.
- Adesiyun, A.A., Jagun, A.G., Tekdek, L.B., 1984. *Coxiella burnetii* antibodies in some Nigerian dairy cows and their suckling calves. *Int J Zoonoses* 11, 155-160.
- AEMET (Agencia Estatal de Meteorología (e ITACYL (Instituto Tecnológico Agrario de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León), 2017. Atlas Agroclimático de Castilla y León. <http://atlas.itacyl.es/>
- Agerholm, J.S., 2013. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals--a critical review. *Acta veterinaria Scandinavica* 55, 13.
- Agerholm, J.S., Willadsen, C.M., Nielsen, T.K., Giese, S.B., Holm, E., Jensen, L., Agger, J.F., 1997. Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *Zentralbl Veterinarmed A* 44, 551-558.
- Agger, J.F., Christoffersen, A.B., Rattenborg, E., Nielsen, J., Agerholm, J.S., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish dairy herds. *Acta Vet.Scand.* 52, 5.
- Agger, J.F., Paul, S., 2014. Increasing prevalence of *Coxiella burnetii* seropositive Danish dairy cattle herds. *Acta veterinaria Scandinavica* 56, 46.
- Agger, J.F., Paul, S., Christoffersen, A.B., Agerholm, J.S., 2013. Risk factors for *Coxiella burnetii* antibodies in bulk tank milk from Danish dairy herds. *Acta veterinaria Scandinavica* 55, 80.
- Aguirre, C.M., Hernández, J.L., *et al.*, 1984. An outbreak of Q fever in the Basque country. *Can Med Assoc J* 131, 48-49.
- Aguirre, C.M., Sobradillo, V., Villate, J.L., 1983. Fiebre Q en el País Vasco. *Medicina clínica* 80, 49.
- Aitken, I.D., 1989. Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. *Eur J Epidemiol* 5, 420-424.
- Alarcón, A., Villanueva, J.L., Viciano, P., López-Cortés, L., Torronteras, R., Bernabeu, M., Cordero, E., Pachón, J., 2003. Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. *J.Infect.* 47, 110-116.
- Alayo-Arrugaeta, A., 1986. Estudio epidemiológico de la fiebre Q en Vizcaya. Universidad del País Vasco. Tesis Doctoral.
- Alonso, E., López-Etxaniz, I., Hurtado, A., Liendo, P., Urbaneja, F., Aspiritxaga, I., Olaizola, J.I., Piñero, A., Arrazola, I., Barandika, J.F., Hernaez, S., Muniozguen, N., García-Pérez, A.L., 2015. Q fever outbreak among workers at a waste-sorting plant. *PLoS One* 10, e0138817.
- Alsaleh, A., Fieni, F., Rodolakis, A., Bruyas, J.F., Roux, C., Larrat, M., Chatagnon, G., Pellerin, J.L., 2013. Can *Coxiella burnetii* be transmitted by embryo transfer in goats? *Theriogenology* 80, 571-575.
- Alsaleh, A., Pellerin, J.L., Rodolakis, A., Larrat, M., Cochonneau, D., Bruyas, J.F., Fieni, F., 2011. Detection of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in oviducts and uterine flushing media and in genital tract tissues of the non pregnant goat. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 34, 355-360.
- Álvarez, J., Bezos, J., de la Cruz, M.L., Casal, C., Romero, B., Domínguez, L., de Juan, L., Pérez, A., 2014. Bovine tuberculosis:

- within-herd transmission models to support and direct the decision-making process. *Research in veterinary science* 97 Suppl, S61-68.
- Álvarez, J., Sarradell, J., Kerkaert, B., Bandyopadhyay, D., Torremorell, M., Morrison, R., Pérez, A., 2015. Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Preventive veterinary medicine* 121, 240-245.
- Álvarez-Gutiérrez, J., del Castillo-Otero, D., García-Fernández, A., Romero-Romero, B., del Rey-Pérez, J., Soto-Campos, G., Castillo-Gómez, J., 2001. [Prospective study of 221 community acquired pneumonias followed up in an outpatient clinic. Etiology and clinical-radiological progression]. *Medicina clínica* 116, 161-166.
- Amano, K., Williams, J.C., 1984. Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *Journal of bacteriology* 160, 994-1002.
- Amano, K., Williams, J.C., Missler, S.R., Reinhold, V.N., 1987. Structure and biological relationships of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *The Journal of biological chemistry* 262, 4740-4747.
- Amara, A.B., Bechah, Y., Mege, J.L., 2012. Immune response and *Coxiella burnetii* invasion. *Advances in experimental medicine and biology* 984, 287-298.
- Anastacio, 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, e293-300.
- Anastacio, 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, 500-505.
- Anderson, A., Bijlmer, H., Fournier, P.E., Graves, S., Hartzell, J., Kersh, G.J., Limonard, G., Marrie, T.J., Massung, R.F., McQuiston, J.H., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., Sexton, D.J., 2013. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm Rep* 62, 1-30.
- Anderson, A.D., Baker, T.R., Littrell, A.C., Mott, R.L., Niebuhr, D.W., Smoak, B.L., 2011. Seroepidemiologic survey for *Coxiella burnetii* among hospitalized US troops deployed to Iraq. *Zoonoses and public health* 58, 276-283.
- Anderson, A.D., Szymanski, T.J., Emery, M.P., Kohrs, P.H., Bjork, A.C., Marsden-Haug, N., Nett, R.J., Woodhall, D.M., Self, J.S., Fitzpatrick, K.A., Priestley, R.A., Kersh, G.J., 2013. Epizootiological investigation of a Q fever outbreak and implications for future control strategies. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 247, 1379-1386.
- Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Hoffman, R.L., 1990. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 2, 283-287.
- Anderson, T.D., Cheville, N.F., Meador, V.P., 1986a. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. *Veterinary pathology* 23, 227-239.
- Anderson, T.D., Meador, V.P., Cheville, N.F., 1986b. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Veterinary pathology* 23, 219-226.
- Andoh, M., Nagaoka, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 2004. Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. *Microbiol Immunol* 48, 971-975.
- Andoh, M., Zhang, G., Russell-Lodrigue, K.E., Shive, H.R., Weeks, B.R., Samuel, J.E., 2007. T cells are essential for bacterial clearance, and gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and B cells are crucial for disease development in *Coxiella burnetii* infection in mice. *Infect Immun* 75, 3245-3255.
- Andrews, P.S., Marmion, B.P., 1959. Chronic Q fever. 2. Morbid anatomical and bacteriological findings in a patient with endocarditis. *British medical journal* 2, 983-988.
- Angelakis, E., Edouard, S., Lafranchi, M.A., Pham, T., Lafforgue, P., Raoult, D., 2014. Emergence of Q fever arthritis in France. *J Clin Microbiol* 52, 1064-1067.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Jos, S.L., Berenger, J.M., Parola, P., Raoult, D., 2016. *Candidatus* *Coxiella massiliensis* Infection. *Emerg Infect Dis* 22, 285-288.
- Angelakis, E., Raoult, D., 2010. Q Fever. *Vet. Microbiol.* 140, 297-309.
- Angen, O., Stahl, M., Agerholm, J.S., Christoffersen, A.B., Agger, J.F., 2011. Dynamics of relationship between the presence of *Coxiella burnetii* DNA, antibodies, and intrinsic variables in cow milk and bulk tank milk from Danish dairy cattle. *Journal of dairy science* 94, 5750-5759.
- Anonimous. 2004. Code of Hygienic Practice for Milk and Milk Products. In: Joint FAO/WHO Food Standards Programme – Codex Committee on Food Hygiene, 26th Session, Washington DC, EEUU, 28.
- Antón, E.A., García, C., Martí, J., Bustillo, J.M., 1990. Incidencia y características de la

- fiebre Q en un hábitat comarcal. *Enf Infec y Microbiol Clín* 8, 350-353.
- Aparicio-Garrido, J., Echevarría, V., Salinas, V.M., 1970. Contribución al estudio de la fiebre Q y de la fiebre botonosa en España. *Rev. Diag. Biol.* 19, 447-456.
- Arashima, Y., Kato, K., Komiya, T., Kumasaka, K., Matsukawa, Y., Murakami, M., Takahashi, K., Ikeda, T., Arakawa, Y., 2004. Improvement of chronic nonspecific symptoms by long-term minocycline treatment in Japanese patients with *Coxiella burnetii* infection considered to have post-Q fever fatigue syndrome. *Intern Med* 43, 49-54.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G., 2006. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC.Microbiol.* 6, 38.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet.Res.* 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamuy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A., 2001. Etude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin de décontamination des lisiers par la cyanamide calcique. *Rec.Rech.Rumin.* 8, 153-156.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003. Excretion of *Coxiella burnetii* during an experimental infection of pregnant goats with an abortive goat strain CbC1. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990, 524-526.
- Arricau Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary research* 34, 423-433.
- 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, 163-168.
- Asadi, J., Khalili, M., Kafi, M., Ansari-Lari, M., Hosseini, S. M., 2014. Risk factors of Q fever in sheep and goat flocks with history of abortion. *Comparative Clinical Pathology* 23, 625-630.
- Astobiza, I., 2012. Distribución de *Coxiella burnetii* en los rumiantes domésticos y en la fauna silvestre de la comunidad autónoma vasca. Evaluación del efecto del tratamiento antibiótico y de la vacunación en el control de la fiebre Q en rebaños ovinos naturalmente infectados. Universidad del País Vasco, Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2009. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *Vet.J.*
- 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, 81-85.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res.Vet.Sci.*
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011a. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Research in veterinary science* 91, e58-63.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2011b. Four-year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock. *Applied and environmental microbiology* 77, 7405-7407.
- 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, 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, 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 veterinary research* 8, 241.
- Astorga, R.J., Reguillo, L., Hernández, M., Cardoso-Toset, F., Tarradas, C., Maldonado, A., Gómez-Laguna, J., 2014. Serosurvey on schmallenberg virus and selected ovine reproductive pathogens in culled ewes from southern Spain. *Transbound Emerg Dis* 61, 4-11.
- Ausina, V., Sanbeat, M.A., Esteban, G. *et al.*, 1988. Estudio seroepidemiológico de la fiebre Q en áreas urbanas y rurales de

- Cataluña. *Enferm Infec Microbiol Clin* 6, 95-105.
- Avorn, J.L., Barrett, J.F., Davey, P.G., McEwen, S.A., O'Brien, T.F., B., L.-B.S., 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10, Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups Alliance for the Prudent Use of Antibiotics, MA, United States of America.
- Ayres, J.G., Flint, N., Smith, E.G., Tunnicliffe, W.S., Fletcher, T.J., Hammond, K., Ward, D., Marmion, B.P., 1998. Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *QJM* 91, 105-123.
- Baboudieri, B., 1959. Q fever: a zoonosis. *Adv.Vet.Sci* 5, 81-154.
- Babudieri, B., Moscovici, C., 1950. [Research on the behavior of *Coxiella burnetii* in relation to various physical and chemical agents]. *Rendiconti - Istituto superiore di sanita* 13, 739-748.
- Baca, O.G., Paretsky, D., 1983. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol Rev* 47, 127-149.
- Baker, M.D., Pithua, P.O., 2014. Low seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Boer goats in Missouri. *BMC Res Notes* 7, 421.
- Bamberg, W.M., Pape, W.J., Beebe, J.L., Nevin-Woods, C., Ray, W., Maguire, H., Nucci, J., Massung, R.F., Gershman, K., 2007. Outbreak of Q fever associated with a horse-boarding ranch, Colorado, 2005. *Vector borne and zoonotic diseases* 7, 394-402.
- Banazis, M.J., Bestall, A.S., Reid, S.A., Fenwick, S.G., 2010. A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. *Veterinary Microbiology* 143, 337-345.
- Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 8, 829-835.
- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S.G., Dubovi, E., Schukken, Y., 2008. Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Veterinary research* 39, 23.
- Bartolomé, J., Marin, A., Lorente, S., Heredero, E., Crespo, M.D., 2004. Acute Q Fever: 35 cases in Castilla-La Mancha. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 22, 292-294.
- Bartolomé, J., Riquelme, E., Hernandez-Pérez, N., García-Ruiz, S., Lujan, R., Lorente, S., Medrano-Callejas, R., Crespo, M.D., 2007. [Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* infection among blood donors in Albacete]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 25, 382-386.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B. 2011. Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999375-38.
- Bauer, A.E., Hubbard, K.R., Johnson, A.J., Messick, J.B., Weng, H.Y., Pogranichniy, R.M., 2016. A cross sectional study evaluating the prevalence of *Coxiella burnetii*, potential risk factors for infection, and agreement between diagnostic methods in goats in Indiana. *Preventive veterinary medicine* 126, 131-137.
- 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 veterinary research* 11, 186.
- Baumgartner, W., Bachmann, S., 1992. Histological and immunocytochemical characterization of *Coxiella burnetii*-associated lesions in the murine uterus and placenta. *Infect Immun* 60, 5232-5241.
- Bautista-Hernández, V., Gutiérrez, F., Ray, V.G., Arribas, J.M., García-Puente, J., Casinello, N., Arcas, R., 2004. Constrictive pericarditis due to *Coxiella burnetii*. *The Annals of thoracic surgery* 78, 326-328.
- Beaman, M.H., Hung, J., 1989. Pericarditis associated with tick-borne Q fever. *Australian and New Zealand journal of medicine* 19, 254-256.
- Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A., 2006. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J.Bacteriol.* 188, 2309-2324.
- Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., Williams, K.P., Sobral, B.W., Kupko, J.J., 3rd, Porcella, S.F., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., 2009. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect Immun* 77, 642-656.
- Beaudeau, F., Guatteo, R., Seegers, H., 2006. Excretion of *Coxiella burnetii* by dairy cows: consequences for disease screening and control. *Épidémiologie et Santé Animale* 49, 1-4.
- Behymer, D., Ruppner, R., Riemann, H.P., Biberstein, E.L., Franti, C.E., 1977. Observation on chemotherapy in cows chronically infected with *Coxiella burnetii* (Q fever). *Folia Vet Lat* 7, 64-70.
- Behymer, D.E., Biberstein, E.L., Riemann, H.P., Franti, C.E., Sawyer, M., Ruppner, R., Crenshaw, G.L., 1976. Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle: challenge of immunity after vaccination.

- American journal of veterinary research 37, 631-634.
- Bell, E.J., Parker, R.R., Stoenner, H.G., 1949. Experimental Q fever in cattle. American journal of public health and the nation's health 39, 478-484.
- Bell, M., Patel, M., Sheridan, J., 1997. Q fever vaccination in Queensland abattoirs. Commun Dis Intell 21, 29-31.
- Bellini, C., Magouras, I., Chapuis-Taillard, C., Clerc, O., Masserey, E., Peduto, G., Peter, O., Schaerrer, S., Schuepbach, G., Greub, G., 2014. Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland. New Microbes New Infect 2, 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.
- Bercovich, Z., 2000. The use of skin delayed-type hypersensitivity as an adjunct test to diagnose brucellosis in cattle: a review. The Veterinary quarterly 22, 123-130.
- Berri, M., Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2003a. PCR-based detection of *Coxiella burnetii* from clinical samples. Methods Mol Biol 216, 153-161.
- 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. The Veterinary record 157, 737-740.
- Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A., 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. Vet Microbiol 72, 285-293.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J.L., Arricau-Bouvery, N., Russo, P., Pepin, M., Rodolakis, A., 2003b. Ovine manure used as a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. The Veterinary record 153, 269-270.
- 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. Research in veterinary science 83, 47-52.
- 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. The Veterinary record 156, 548-549.
- 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. The Veterinary record 148, 502-505.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A., 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. Vet Microbiol 85, 55-60.
- Besag, J., York, J., Mollie, A., 1991. Bayesian Image Restoration with Two Applications in Spatial Statistics. The Annals of the Institute of Statistics and Mathematics 43, 1-159.
- Bezoz, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A.J., López, L., Rueda, P., Domínguez, L., 2014. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. Research in veterinary science 97 Suppl, S44-52.
- Biberstein, E.L., Behymer, D.E., Bushnell, R., Crenshaw, G., Riemann, H.P., Franti, C.E., 1974. A survey of Q fever (*Coxiella burnetii*) in California dairy cows. American journal of veterinary research 35, 1577-1582.
- Biberstein, E.L., Riemann, H.P., Franti, C.E., Behymer, D.E., Ruppner, R., Bushnell, R., Crenshaw, G., 1977. Vaccination of dairy cattle against Q fever (*Coxiella burnetii*): results of field trials. American journal of veterinary research 38, 189-193.
- Bielawska-Drozd, A., Cieslik, P., Mirski, T., Gawel, J., Michalski, A., Niemcewicz, M., Bartoszcze, M., Zakowska, D., Lasocki, K., Knap, J., Kocik, J., 2014. Prevalence of *Coxiella burnetii* in environmental samples collected from cattle farms in Eastern and Central Poland (2011-2012). Vet Microbiol 174, 600-606.
- Bildfell, R.J., Thomson, G.W., Haines, D.M., McEwen, B.J., Smart, N., 2000. *Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 12, 419-425.
- Bjork, A., Marsden-Haug, N., Nett, R.J., Kersh, G.J., Nicholson, W., Gibson, D., Szymanski, T., Emery, M., Kohrs, P., Woodhall, D., Anderson, A.D., 2014. First reported multistate human Q fever outbreak in the United States, 2011. Vector borne and zoonotic diseases 14, 111-117.
- BKh, B., Kapinskii, M.B., Vygovskii, A.P., Berdnikov, I.F., 1957. [Q fever in Ural]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii 28, 41-46.
- Blain, S., 2007. Contagious diseases of ruminants: management of Q fever in goats. Summa, Animali da Reddito 2, 59-63.
- 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, 117-124.
- Bolaños, M., Santana, O.E., Ángel-Moreno, A., Pérez-Arellano, J.L., Liminana, J.M.,

- Serra-Majem, L., Martín-Sánchez, A.M., 2003a. Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). *Eur J Epidemiol* 18, 259-262.
- Bolaños, M., Santana, O.E., Pérez-Arellano, J.L., Angel-Moreno, A., Moreno, G., Burgazzoli, J.L., Martín-Sánchez, A.M., 2003b. Q fever in Gran Canaria: 40 new cases. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 21, 20-23.
- Bond, K.A., Vincent, G., Wilks, C.R., Franklin, L., Sutton, B., Stenos, J., Cowan, R., Lim, K., Athan, E., Harris, O., Macfarlane-Berry, L., Segal, Y., Firestone, S.M., 2016. One Health approach to controlling a Q fever outbreak on an Australian goat farm. *Epidemiol Infect* 144, 1129-1141.
- Bontje, D.M., Backer, J.A., Hogerwerf, L., Roest, H.I., van Roermund, H.J., 2016. Analysis of Q fever in Dutch dairy goat herds and assessment of control measures by means of a transmission model. *Preventive veterinary medicine* 123, 71-89.
- Botelho-Nevers, E., Fournier, P.E., Richet, H., Fenollar, F., Lepidi, H., Foucault, C., Branchereau, A., Piquet, P., Maurin, M., Raoult, D., 2007. *Coxiella burnetii* infection of aortic aneurysms or vascular grafts: report of 30 new cases and evaluation of outcome. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 26, 635-640.
- Bottcher, J., Vossen, A., Janowitz, B., Alex, M., Gangl, A., Randt, A., Meier, N., 2011. Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd. *Vet.Microbiol.*
- Brennan, M.L., Christley, R.M., 2012. Biosecurity on cattle farms: a study in north-west England. *PLoS One* 7, e28139.
- Brooke, R.J., Kretzschmar, M.E., Mutters, N.T., Teunis, P.F., 2013. Human dose response relation for airborne exposure to *Coxiella burnetii*. *BMC infectious diseases* 13, 488.
- Brooke, R.J., Mutters, N.T., Peter, O., Kretzschmar, M.E., Teunis, P.F., 2015. Exposure to low doses of *Coxiella burnetii* caused high illness attack rates: Insights from combining human challenge and outbreak data. *Epidemics* 11, 1-6.
- Brooke, R.J., Teunis, P.F., Kretzschmar, M.E., Wielders, C.C., Schneeberger, P.M., Waller, L.A., 2017. Use of a Dose-Response Model to Study Temporal Trends in Spatial Exposure to *Coxiella burnetii*: Analysis of a Multiyear Outbreak of Q Fever. *Zoonoses and public health* 64, 118-126.
- Brooks, D.L., Ermel, R.W., Franti, C.E., Ruppner, R., Behymer, D.E., Williams, J.C., Stephenson, E.H., 1986. Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. *American journal of veterinary research* 47, 1235-1238.
- Brooks, S., Gelman, A.R., 1998. General Methods for Monitoring Convergence of Iterative Simulations. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 7, 434-455.
- Brouqui, P., Badiaga, S., Raoult, D., 2004. Q fever outbreak in homeless shelter. *Emerg Infect Dis* 10, 1297-1299.
- Brown, G.L., Colwell, D.C., Hooper, W.L., 1968. An outbreak of Q fever in Staffordshire. *The Journal of hygiene* 66, 649-655.
- Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J., 1996. A dog-related outbreak of Q fever. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 23, 753-755.
- Burnet, F.M., Freeman, M., 1983. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Reviews of infectious diseases* 5, 800-808.
- Burton, P.R., Stueckemann, J., Paretsky, D., 1975. Electron microscopy studies of the limiting layers of the rickettsia *Coxiella burnetii*. *Journal of bacteriology* 122, 316-324.
- Buxton, D., Barlow, R.M., Finlayson, J., Anderson, I.E., Mackellar, A., 1990. Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. *J Comp Pathol* 102, 221-237.
- Cabassi, C.S., Taddei, S., Donofrio, G., Ghidini, F., Piancastelli, C., Flammini, C.F., Cavarani, S., 2006. Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *The new microbiologica* 29, 211-214.
- Cameron, A.R., 1999. Survey Toolbox for Livestock Diseases - A practical manual and software package for active surveillance of livestock diseases in developing countries. Canberra, Australia.
- Cameron, A.R., Baldock, F.C., 1998. A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. *Preventive veterinary medicine* 34, 1-17.
- Camuset, P., Remmy, D., 2008. Q Fever (*Coxiella burnetii*) Eradication in a Dairy Herd by Using Vaccination with a Phase 1 Vaccine. In: XXV World Buiatrics Congress, Budapest.
- Candela, M.G., Caballol, A., Atance, P.M., 2016. Wide exposure to *Coxiella burnetii* in ruminant and feline species living in a natural environment: zoonoses in a human-livestock-wildlife interface. *Epidemiol Infect*, 1-4.
- Cantas, H., Muwonge, A., Sareyyupoglu, B., Yardimci, H., Skjerve, E., 2011. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC.Vet.Res.* 7, 13.
- Capuano, F., Landolfi, M.C., Monetti, D.M., 2001. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Vet.Rec.* 149, 669-671.

- Capuano, F., Perugini, A.G., Parisi, A., Montagna, C.O., Nilvetti, M., 2004. Improved detection of *Coxiella burnetii* in cows milk by immunomagnetic separation and PCR. *Vet Res Commun* 28 Suppl 1, 279-282.
- 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, 1182-1186.
- Carballedo, A.D., Olmeda, S.A., Díez de Tejada Martín, P., Jado, I., Díez, A., Blanco, J. Anda, P. 2008. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in ruminants from central Spain. In: 5th International Meeting on *Rickettsiae* and *Rickettsial* Diseases, Marsella, 60.
- Carbonero, A., Guzman, L.T., Montano, K., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Saa, L.R., 2015. *Coxiella burnetii* seroprevalence and associated risk factors in dairy and mixed cattle farms from Ecuador. *Preventive veterinary medicine* 118, 427-435.
- Carcopino, X., Raoult, D., Bretelle, F., Boubli, L., Stein, A., 2009. Q Fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1166, 79-89.
- Cardeñosa, N., Sanfeliu, I., Font, B., Muñoz, T., Nogueras, M.M., Segura, F., 2006a. Short report: seroprevalence of human infection by *Coxiella burnetii* in Barcelona (northeast of Spain). *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75, 33-35.
- Cardeñosa, N., Sanfeliu, I., Font, B., Muñoz, T., Nogueras, M.M., Segura, F., 2006b. Short report: seroprevalence of human infection by *Coxiella burnetii* in Barcelona (northeast of Spain). *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 75, 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, e3055.
- Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V., Oliveira, S.C., 2006. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial cell factories* 5, 13.
- Carrieri, M.P., Tissot-Dupont, H., Rey, D., Brousse, P., Renard, H., Obadia, Y., Raoult, D., 2002. Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 21, 17-21.
- Cekani, M., Papa, A., Kota, M., Velo, E., Berxholi, K., 2008a. Report of a serological study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Albania. *Vet.J.* 175, 276-278.
- Cerf, O., Condron, R., 2006. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol Infect* 134, 946-951.
- Cetinkaya, B., Kalender, H., Ertas, H.B., Muz, A., Arslan, N., Ongor, H., Gurcay, M., 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet.Rec.* 146, 131-136.
- Ceylan, E., Berktaş, M., Keles, I., Agaoglu, Z., 2009. Seroprevalence of Q Fever in Cattle and Sheep in the East of Turkey *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 4, 114-121.
- Cisterna, R. 1983. Epidemiología de la infección por *Coxiella burnetii*. In: Conferencias, Simposia y Mesas Redondas. IX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Microbiología., Valladolid, 455-464.
- Clark, W.H., Lennette, E.H., Railsback, O.C., Romer, M.S., 1951. Q fever in California. VII. Clinical features in one hundred eighty cases. *A.M.A. archives of internal medicine* 88, 155-167.
- Clavero, G., Pérez Gallardo, F., Valle, E., 1952. [Four cases of Q fever acquired in laboratory]. *Revista de sanidad e higiene publica* 26, 199-201.
- Clemente, L., Barahona, M.J., Andrade, M.F., Botelho, A., 2009. Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. *Vet.Rec.* 164, 373-374.
- Clemente, L., Fernandes, T.L., Barahona, M.J., Bernardino, R., Botelho, A., 2008. Confirmation by PCR of *Coxiella burnetii* infection in animals at a zoo in Lisbon, Portugal. *The Veterinary record* 163, 221-222.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Cockrell, D.C., Voth, D.E., Howe, D., Mead, D.J., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., 2007. Proteome and antigen profiling of *Coxiella burnetii* developmental forms. *Infect Immun* 75, 290-298.
- Commandeur, M., Jeurissen, L., van der Hoek, W., Roest, H.J., Hermans, T.C., 2014. Spatial relationships in the Q fever outbreaks 2007-2010 in the Netherlands. *International journal of environmental health research* 24, 137-157.
- Cong, W., Meng, Q.F., Shan, X.F., Sun, W.W., Kang, Y.H., Chen, L., Wang, W.L., Qian, A.D., 2015. *Coxiella burnetii* (Q fever) Infection in Farmed Ruminants in Three Northeastern Provinces and Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Vector borne and zoonotic diseases* 15, 512-514.
- Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio. 2015. Indicadores en materia de agricultura, ganadería industria alimentaria, protección animal y vías pecuarias.
- Conti, L.A., Belcuore, T.R., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., Jenelle, J., Singleton, J.,



- Childs, J.E., Huey, M., Wiersma, S., Hopkins, R.S., 2004. Pseudoepidemic of Q fever at an animal research facility. *Vector borne and zoonotic diseases* 4, 343-350.
- Cooper, A., Stephens, J., Ketheesan, N., Govan, B., 2013. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in wildlife and ticks in northern Queensland, Australia. *Vector borne and zoonotic diseases* 13, 12-16.
- Cour Boveda MI, G.S.M., González Cuadrado S, Palau Beato ML, González Gómez C, Ferro Dalda A, 1990. *Coxiella burnetii*: serologic study in various populations. *An Med Interna*. 7, 513-516.
- Courcoul, A., Vergu, E., Denis, J.B., Beaudeau, F., 2010. Spread of Q fever within dairy cattle herds: key parameters inferred using a Bayesian approach. *Proc Biol Sci* 277, 2857-2865.
- Cox, H.R., 1939a. Studies of a filter-passing infectious agent isolated from ticks. V. Further attempts to cultivate in cell-free media. Suggested classification. *Public Health Rep* 54, 1822-1827.
- Cox, H. R.; J. Bell., 1939b. The cultivation of *Rickettsia diaporica* in tissue culture and in the tissues of developing chicken embryos. *Public Health Rep*. 54, 2171-2175.
- Crowther, R.W., Spicer, A.J., 1976. Abortion in sheep and goats in Cyprus caused by *Coxiella burnetii*. *The Veterinary record* 99, 29-30.
- Currie, W.B., Thorburn, G.D., 1977. Parturition in goats: studies on the interactions between the foetus, placenta, prostaglandin F and progesterone before parturition, at term or at parturition induced prematurely by corticotrophin infusion of the foetus. *J Endocrinol* 73, 263-278.
- Cuzick, J., Edwards, R., 1990. Spatial clustering for inhomogeneous populations. *J R Statist Soc B* 52, 73-104.
- Czaplicki, G., Houtain, J.Y., Mullender, C., Manteca, C., Saegerman, C., 2009. Bulk tank milk, reliable tool for diagnosing Q fever in dairy herds? *Epidemiol. Sante´ Anim*. 56, 117-127.
- Czaplicki, G., Houtain, J.Y., Mullender, C., Porter, S.R., Humblet, M.F., Manteca, C., Saegerman, C., 2012. Apparent prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk from dairy herds in southern Belgium. *Vet J* 192, 529-531.
- Czopowicz, M., Kaba, J., Szalus-Jordanow, O., Nowicki, M., Witkowski, L., Nowicka, D., Frymus, T., 2010. Prevalence of antibodies against *Chlamydia abortus* and *Coxiella burnetii* in goat herds in Poland. *Pol J Vet Sci* 13, 175-179.
- Chang, C.C., Lin, P.S., Hou, M.Y., Lin, C.C., Hung, M.N., Wu, T.M., Shu, P.Y., Shih, W.Y., Lin, J.H., Chen, W.C., Wu, H.S., Lin, L.J., 2010. Identification of risk factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in veterinary-associated populations in southern Taiwan. *Zoonoses and public health* 57, e95-101.
- Chang, K., Yan, J.J., Lee, H.C., Liu, K.H., Lee, N.Y., Ko, W.C., 2004. Acute hepatitis with or without jaundice: a predominant presentation of acute Q fever in southern Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi* 37, 103-108.
- Chanton-Greutmann, H., Thoma, R., Corboz, L., Borel, N., Pospischil, A., 2002. [Abortion in small ruminants in Switzerland: investigations during two lambing seasons (1996-1998) with special regard to chlamydial abortions]. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 144, 483-492.
- Chauhan, R., Wadhwa, G., Sharma, S.K., Jain, C.K., 2014. Current developments in therapeutic and diagnostic strategies for Q fever: glimpses of patent analysis. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 9, 104-111.
- Chmielewski, T., Tylewska-Wierzbowska, S., 2013. Q fever outbreaks in Poland during 2005-2011. *Med Sci Monit* 19, 1073-1079.
- D'Amato, F., Eldin, C., Georgiades, K., Edouard, S., Delerce, J., Labas, N., Raoult, D., 2015. Loss of TSS1 in hypervirulent *Coxiella burnetii* 175, the causative agent of Q fever in French Guiana. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 41, 35-41.
- Dal Pozzo, F., Martinelle, L., Leonard, P., Renaville, B., Renaville, R., Thys, C., Smeets, F., Czaplicki, G., Van Esbroeck, M., Saegerman, C., 2016. Q Fever Serological Survey and Associated Risk Factors in Veterinarians, Southern Belgium, 2013. *Transbound Emerg Dis*.
- Damoser, J., Hofer, E., Muller, M., 1993. [Abortions in a lower Austrian sheep facility caused by *Coxiella burnetii*]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 106, 361-364.
- Davies, T.R., Edwards, Y., Morgan, A., Caul, E.O., 1997. Prevalence of Q fever in a rural practice. *Journal of public health medicine* 19, 324-327.
- Davis, G.E., Cox, H.R. 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals, and filtration experiments. *Public Health Rep* 53, 2259-2261.
- Daza-Pérez, R.M., Castillo-Rivera, R., et al., 1980. Estudio de la tasa de anticuerpos a *Coxiella burnetii* en la población sana. 74, 52-54.
- de Bruin, A., de Groot, A., de Heer, L., Bok, J., Wielinga, P.R., Hamans, M., van Rotterdam, B.J., Janse, I., 2011. Detection of *Coxiella burnetii* in complex matrices by using multiplex quantitative

- PCR during a major Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6516-6523.
- de 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. *Journal of applied microbiology* 114, 1395-1404.
- de Bruin, A., van Alphen, P.T., van der Plaats, R.Q., de, H.L., Reusken, C.B., van Rotterdam, B.J., Janse, I., 2012. Molecular typing of *Coxiella burnetii* from animal and environmental matrices during Q fever epidemics in the Netherlands. *BMC Vet. Res.* 8, 165.
- de Bruin, A., van Rotterdam, B. 2011. Detection of *Coxiella burnetii* by (q)PCR: a comparison of available assays. RIVM Letter Report. National Institute for Public Health and Environment, Ministry of health, Welfare and Sport.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Le Pape, M., 2012a. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64, 104-106.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Le Pape, M., 2012b. *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64, 120-122.
- de Rooij, M.M., Borlee, F., Smit, L.A., de Bruin, 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, e0151281.
- de Rooij, M.M., Schimmer, B., Versteeg, B., Schneeberger, P., Berends, B.R., Heederik, D., van der Hoek, W., Wouters, I.M., 2012. Risk factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) seropositivity in veterinary medicine students. *PLoS One* 7, e32108.
- de Ruiz, H.L., 1977. Q fever in Colombia, S.A. A serological survey of human and bovine populations. *Zentralbl Veterinarmed B* 24, 287-292.
- Dean, A.S., Bonfoh, B., Kulo, A.E., Boukaya, G.A., Amidou, M., Hattendorf, J., Pilo, P., Schelling, E., 2013. Epidemiology of brucellosis and q Fever in linked human and animal populations in northern togo. *PLoS One* 8, e71501.
- Del Castillo, A., Pérez Cabrera, M.A., de Armas, F., *et al.* 1995. Primeros datos sobre la seroprevalencia de la fiebre Q en Tenerife. In: III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas Alcalá de Henares, 75.
- Delgado, J., Aspritzaga, I., Ezpeleta, G., Muniozuren, A., 2011. Study and Management of a Q Fever Outbreak among Machine Tool Workers in the Basque Country (Spain). *Epidemiol Res Int* 2011.
- Delgado, L., Gutiérrez, P., Manual práctico de manejo de una explotación de ovino de carne. <http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwht9aG4KPTAhUKwBQKHTvaAi4QFggjMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.jcy.l.es%2Fweb%2Fjcy%2Fbinarios%2F331%2F665%2Fmanual%2520explotacion%2520ovino%2520carneop.pdf&usq=AFQjCNESZrxZvM2PavvGMv5rXsmEobFCgg&bvm=bv.152479541,d.d24>
- Delsing, C.E., Kullberg, B.J., 2008. Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. *Neth.J.Med.* 66, 365-367.
- Delsing, C.E., Warris, A., Bleeker-Rovers, C.P., 2011. Q fever: still more queries than answers. *Advances in experimental medicine and biology* 719, 133-143.
- Dellacasagrande, J., Ghigo, E., Hammami, S.M., Toman, R., Raoult, D., Capo, C., Mege, J.L., 2000. alpha(v)beta(3) integrin and bacterial lipopolysaccharide are involved in *Coxiella burnetii*-stimulated production of tumor necrosis factor by human monocytes. *Infect Immun* 68, 5673-5678.
- Denison, A.M., Massung, R.F., Thompson, H.A., 2007a. Analysis of the O-antigen biosynthesis regions of phase II isolates of *Coxiella burnetii*. *FEMS microbiology letters* 267, 102-107.
- Denison, A.M., Thompson, H.A., Massung, R.F., 2007b. ISIII insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *Bmc Microbiology* 7.
- DePuy, W., Benka, V., Massey, A., Deem, S.L., Kinnaird, M., O'Brien, T., Wanyoike, S., Njoka, J., Butt, B., Foufopoulos, J., Eisenberg, J.N., Hardin, R., 2014. Q fever risk across a dynamic, heterogeneous landscape in Laikipia County, Kenya. *Ecohealth* 11, 429-433.
- Deringer, J.R., Chen, C., Samuel, J.E., Brown, W.C., 2011. Immunoreactive *Coxiella burnetii* Nine Mile proteins separated by 2D electrophoresis and identified by tandem mass spectrometry. *Microbiology* 157, 526-542.
- Derrick, E.H., 1937. "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med.J.Aust.* 2, 281-299.
- Derrick, E.H., 1973. The course of infection with *Coxiella burnetii*. *The Medical journal of Australia* 1, 1051-1057. Derrick, E.H., Smith, D.J.W., Brown, H.E., 1939. The role of the Bandicoot in the epidemiology of Q fever: a preliminary study. *Med. J. Aust.* 1, 150-155.

- Di Domenico, M., Curini, V., De Massis, F., Di Provido, A., Scacchia, M., Camma, C., 2014. *Coxiella burnetii* in central Italy: novel genotypes are circulating in cattle and goats. *Vector borne and zoonotic diseases* 14, 710-715.
- Díaz, J.M., Fernández, G., Prieto, A., Valverde, S., Lago, N., Díaz, P., Panadero, R., López, C., Morrondo, P., Díez-Baños, P., 2014. Epidemiology of reproductive pathogens in semi-intensive lamb-producing flocks in North-West Spain: a comparative serological study. *Vet J* 200, 335-338.
- Dijkstra, F., van der Hoek, W., Wijers, N., Schimmer, B., Rietveld, A., Wijkmans, C.J., Vellema, P., Schneeberger, P.M., 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, 3-12.
- Dilbeck, P.M., McElwain, T.F., 1994. Immunohistochemical detection of *Coxiella burnetii* in formalin-fixed placenta. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 6, 125-127.
- Dohoo, I.R., Martin, W., Stryhn, H., 2003. *Veterinary Epidemiologic Research* Charlottetown, PE, Canada.
- Dolce, P., Belanger, M.J., Tumanowicz, K., Gauthier, C.P., Jutras, P., Masse, R., Montpetit, C., Bernatchez, H., McColl, D., Artsob, H., 2003. *Coxiella burnetii* seroprevalence of shepherds and their flocks in the lower Saint-Lawrence River region of Quebec, Canada. *The Canadian journal of infectious diseases = Journal canadien des maladies infectieuses* 14, 97-102.
- Domingo, P., Muñoz, C., Franquet, T., Gurgui, M., Sancho, F., Vázquez, G., 1999. Acute Q fever in adult patients: report on 63 sporadic cases in an urban area. *Clin.Infect.Dis.* 29, 874-879.
- Dorko, E., Rimarova, K., Pilipcinec, E., 2012. Influence of the environment and occupational exposure on the occurrence of Q fever. *Cent Eur J Public Health* 20, 208-214.
- Doung-Ngern, P., Chuxnum, T., Pangjai, D., Opaschaitat, P., Kittiwat, N., Rodtian, P., Buameetoo, N., Kersh, G.J., Padungtod, P., 2017. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* Antibodies among Ruminants and Occupationally Exposed People in Thailand, 2012-2013. *The American journal of tropical medicine and hygiene*.
- Drancourt, M., Raoult, D., 2005. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *J Clin Microbiol* 43, 4311-4315.
- Drancourt, M., Raoult, D. 2015. *Coxiella*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1-11.
- Dubourg, G., Socolovschi, C., Del Giudice, P., Fournier, P.E., Raoult, D., 2014. Scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bite: an emerging syndrome with multiple causes. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 33, 1449-1456.
- Dupuis, G., Petite, J., Peter, O., Vouilloz, M., 1987. An important outbreak of human Q fever in a Swiss Alpine valley. *International journal of epidemiology* 16, 282-287.
- Durand, M.P., 1993. [Lactéal and placentar excretion of *Coxiella burnetii*, agent of Q fever, in the cow. Importance and prevention]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 177, 935-945; discussion 945-936.
- Durham, P.J., Paine, G.D., 1997. Serological survey for antibodies to infectious agents in beef cattle in northern South Australia. *Aust Vet J* 75, 139-140.
- Duron, O., Jourdain, E., McCoy, K.D., 2014. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 557-563.
- Duron, O., Noel, V., McCoy, K.D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., Vavre, F., Zenner, L., Jourdain, E., Durand, P., Arnathau, C., Renaud, F., Trape, J.F., Biguezoton, A.S., Cremaschi, J., Dietrich, M., Leger, E., Appelgren, A., Dupraz, M., Gómez-Díaz, E., Diatta, G., Dayo, G.K., Adakal, H., Zoungrana, S., Vial, L., Chevillon, C., 2015a. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS pathogens* 11, e1004892.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., Jourdain, E., 2015b. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends in parasitology* 31, 536-552.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare EFSA, 2010. Scientific opinion on Q fever. *EFSA Journal* 8, 1595 (1114pp).
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2008. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2008. *EFSA Journal* 8.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-

- borne Outbreaks in 2009. EFSA Journal 9.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2010. EFSA Journal 10.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 11.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 12.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. EFSA Journal 13.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015b. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 12.
- EFSA (European Food Safety Authority) y ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal 14.
- Eibach, R., Bothe, F., Runge, M., Ganter, M., 2013. Long-term monitoring of a *Coxiella burnetii*-infected sheep flock after vaccination and antibiotic treatment under field conditions. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 126, 3-9.
- Eklund, C.M., Parker, R.R., Lackman, D.B., 1947. A case of Q fever probably contracted by exposure to ticks in nature. Public Health Rep 62, 1413-1416.
- ELIKA. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria., 2007. Fiebre Q. [http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo11/fiebre%20Q\\_07.pdf](http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo11/fiebre%20Q_07.pdf)
- Ei-Mahallawy, H.S., Kelly, P., Zhang, J., Yang, Y., Wei, L., Tian, L., Fan, W., Zhang, Z., Wang, C., 2016a. Serological and molecular evidence of *Coxiella burnetii* in samples from humans and animals in China. Ann Agric Environ Med 23, 87-91.
- Ei-Mahallawy, H.S., Kelly, P., Zhang, J., Yang, Y., Zhang, H., Wei, L., Mao, Y., Yang, Z., Zhang, Z., Fan, W., Wang, C., 2016b. High seroprevalence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle in China. Tropical animal health and production 48, 423-426.
- Eldin, C., Angelakis, E., Renvoise, A., Raoult, D., 2013. *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. The American journal of tropical medicine and hygiene 88, 765-769.
- Eldin, C., Raoult, D., 2016. Moving from Q fever to *C. burnetii* infection. Epidemiol Infect 144, 1163-1164.
- Elsa, J., Duron, O., Severine, B., González-Acuna, D., Sidi-Boumedine, K., 2015. Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. Infect Ecol Epidemiol 5, 29230.
- Emery, M.P., Ostlund, E.N., Ait Ichou, M., Ballin, J.D., McFarling, D., McGonigle, L., 2014. *Coxiella burnetii* serology assays in goat abortion storm. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 26, 141-145.
- Emery, M.P., Ostlund, E.N., Schmitt, B.J., 2012. Comparison of Q fever serology methods in cattle, goats, and sheep. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 24, 379-382.
- Enright, J.B., Longhurst, W.M., Franti, C.E., Behymer, D.E., Dutton, V.J., Wright, M.E., 1971. *Coxiella burnetii* in a wildlife-livestock environment. Isolations of *Rickettsiae* from sheep and cattle. American journal of epidemiology 94, 72-78.
- Enright, J.B., Sadler, W.W., Thomas, R.C., 1957. Thermal inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to pasteurization of milk. Public health monograph 47, 1-30.
- Esmaeili, S., Bagheri Amiri, F., Mostafavi, E., 2014. Seroprevalence survey of Q fever among sheep in northwestern Iran. Vector borne and zoonotic diseases 14, 189-192.
- Esmaeili, S., Mostafavi, E., Shahdordizadeh, M., Mahmoudi, H., 2013. A seroepidemiological survey of Q fever among sheep in Mazandaran province, northern Iran. Ann Agric Environ Med 20, 708-710.
- Esmaeili, S., Naddaf, S.R., Pourhossein, B., Hashemi Shahraki, A., Bagheri Amiri, F., Gouya, M.M., Mostafavi, E., 2016. Seroprevalence of brucellosis, leptospirosis, and Q Fever among butchers and slaughterhouse workers in South-Eastern Iran. PLoS One 11, e0144953.
- Esmailnejad, A., Abbazadeh Hasiri, M., 2016. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection among companion dogs in fars province, south iran. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine.

- Esnaol, A., Martín, S., Palacín, I., Escobar, I., Marco, J., Extramiana, A.B., Elgorriaga, M. 2010. Estudio de la patología abortiva en pequeños rumiantes en España (2007-2010) (I): Análisis etiológico. In: XXXV Congreso de la SEOC, Valladolid.
- Espejo, E., Gil-Díaz, A., Oteo, J.A., Castillo-Rueda, R., García-Álvarez, L., Santana-Báez, S., Bella, F., 2014. Clinical presentation of acute Q fever in Spain: seasonal and geographical differences. *International journal of infectious diseases* : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases 26, 162-164.
- Espí, A., Prieto, J. M.; Álvarez, A. 2001. Situación sanitaria del ovino en Asturias: seroprevalencia de la enfermedad de la frontera, maedi-visna, aborto enzoótico, agalaxia contagiosa fiebre Q y leptospirosis. . In: XXVI Jornadas Científica de la SEOC, Sevilla.
- Espinosa, N., Canas, E., Bernabeu-Wittel, M., Martín, A., Viciano, P., Pachón, J., 2010. The changing etiology of fever of intermediate duration. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 28, 416-420.
- Evans, A.D., Powell, D.E., Burrell, C.D., 1959. Fatal endocarditis associated with Q fever. *Lancet* 1, 864-865.
- Evstigneeva, A.S., Komarova, N.F., Makarova, V.A., Tarasevich, I.V., 2005. [Survival of *Coxiella burnetii* in soil]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, 57-59.
- Ezatkah, M., Alimolaei, M., Khalili, M., Sharifi, H., 2015. Seroepidemiological study of Q fever in small ruminants from Southeast Iran. *Journal of infection and public health* 8, 170-176.
- Faix, D.J., Harrison, D.J., Riddle, M.S., Vaughn, A.F., Yingst, S.L., Earhart, K., Thibault, G., 2008. Outbreak of Q fever among US military in western Iraq, June-July 2005. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 46, e65-68.
- Farfante, J., Largarga, B., Segrera, J., *et al.*, 1992. Fiebre Q. Estudio de 14 casos en la isla de Gran Canaria. *Can Med Assoc J* 7, 23-26.
- Fernández-Aguilar, X., Cabezón, O., Colom-Cadena, A., Lavin, S., López-Olvera, J.R., 2016. Serological survey of *Coxiella burnetii* at the wildlife-livestock interface in the Eastern Pyrenees, Spain. *Acta veterinaria Scandinavica* 58, 26.
- Fernández-Guerrero, M.L., 2014. [Q fever in Spain: "an inconclusive history"]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 32, 211-212.
- Fernández, M., Ferreras, M.C., García-Marín, J.F., Pérez, V. 2012. Abortos en la especie ovina: caracterización lesional y diagnóstico en Castilla y León. In: XXXVII Congreso de la SEOC, Ciudad Real.
- Fernández, R., Vihelmi, I., Díaz, M. *et al.*, 1985. Fiebre Q aguda y crónica: clínica, epidemiología, aislamiento del agente y datos serológicos. *Revista clínica española* 177, 62-68.
- Field, P.R., Hunt, J.G., Murphy, A.M., 1983. Detection and persistence of specific IgM antibody to *Coxiella burnetii* by enzyme-linked immunosorbent assay: a comparison with immunofluorescence and complement fixation tests. *The Journal of infectious diseases* 148, 477-487.
- Fishbein, D.B., Raoult, D., 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 47, 35-40.
- Fonseca, F., Pinto, M.R., Oliviera, J., Marqués de Gama, M., Lacerdo, M.T., 1949. Febre Q em Portugal. *Clin Contemp* 28, 1567-1578.
- Fournier, P.E., Marrie, T.J., Raoult, D., 1998. Diagnosis of Q fever. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1823-1834.
- Fournier, P.E., Raoult, D., 2003. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol* 41, 5094-5098.
- Frangoulidis, D. 2010. *Coxiella burnetii*- stability in the environment and molecular typing. In: Q-fever conference, Breda, The Netherlands, 25-26 February.
- Frangoulidis, D., Spletstoeser, W.D., Landt, O., Dehnhardt, J., Henning, K., Hilbert, A., Bauer, T., Antwerpen, M., Meyer, H., Walter, M.C., Knobloch, J.K., 2013. Microevolution of the chromosomal region of acute disease antigen A (adaA) in the query (Q) fever agent *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 8, e53440.
- Frangoulidis, D., Walter, M.C. 2016. Recent advances in whole genome sequencing of *Coxiella burnetii*. In: Current findings in Q fever Symposium, CODA-CERVA Veterinary and Agrochemical Research Center, Bruselas, 19/04/2016.
- Frazier, M.E., Heinzen, R.A., Mallavia, L.P., Baca, O.G., 1992. DNA probes for detecting *Coxiella burnetii* strains. *Acta virologica* 36, 83-89.
- Fretz, R., Schaeren, W., Tanner, M., Baumgartner, A., 2007. Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *International journal of food microbiology* 116, 414-418.
- 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. *Journal of applied microbiology* 118, 1083-1095.
- Galiero, A., Fratini, F., Camma, C., Di Domenico, M., Curini, V., Baronti, I., Turchi, B., Cerri,

- D., 2016. Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: Screening and genotyping. *International journal of food microbiology* 237, 47-54.
- Gallagher, W.H., 1961. Q Fever. *JAMA* 3, 1887-1889.
- Galluzzo, P., Gargano, V., Verso M.G., Villari S., Vesco G. 2015. *Coxiella burnetii* spread in Sicily. In: XVI National Congress of the Italian Society of Laboratory Diagnostics, Montesilvano, Italia.
- Gami, A.S., Antonios, V.S., Thompson, R.L., Chaliki, H.P., Ammash, N.M., 2004. Q fever endocarditis in the United States. *Mayo Clin Proc* 79, 253-257.
- Ganter, M., 2015. Zoonotic risks from small ruminants. *Vet Microbiol* 181, 53-65.
- García-Clemente, M., Seco-García, A.J., Gutiérrez-Rodríguez, M., Romero-Álvarez, P., Fernández-Bustamante, J., Rodríguez-Pérez, M., 2007. Outbreak of *Coxiella burnetii* pneumonia. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 25, 184-186.
- García-Ispuerto, I., López-Helguera, I., Tutusaus, J., Mur-Novales, R., López-Gatius, F., 2015. Effects of long-term vaccination against *Coxiella burnetii* on the fertility of high-producing dairy cows. *Acta veterinaria Hungarica* 63, 223-233.
- García-Ispuerto, I., López-Helguera, I., Tutusaus, J., Serrano, B., Monleon, E., Badiola, J.J., López-Gatius, F., 2013. *Coxiella burnetii* shedding during the peripartum period and subsequent fertility in dairy cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 48, 441-446.
- García-Ispuerto, I., Nogareda, C., Yaniz, J.L., Almería, S., Martínez-Bello, D., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., López-Gatius, F., 2010a. *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 74, 212-220.
- García-Ispuerto, I., Nogareda, C., Yaniz, J.L., Almería, S., Martínez-Bello, D., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., López-Gatius, F., 2010b. *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 74, 212-220.
- García-Ispuerto, I., Tutusaus, J., López-Gatius, F., 2014. Does *Coxiella burnetii* affect reproduction in cattle? A clinical update. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 49, 529-535.
- García-Pérez, A.L., Astobiza, I., Barandika, J.F., Atxaerandio, R., Hurtado, A., Juste, R.A., 2009. Short communication: investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *J.Dairy Sci.* 92, 1581-1584.
- García-Seco, T., Pérez-Sancho, M., Martínez-Nevado, E., Álvarez, J., Santiago-Moreno, J., Goyache, J., Domínguez, L., García, N., 2016. Detection of *Coxiella burnetii* Infection in a Saharawi Dorcas Gazelle (*Gazella dorcas neglecta*). *Journal of zoo and wildlife medicine: official publication of the American Association of Zoo Veterinarians* 47, 939-941.
- García-Curiel, A., Nájera-Morrondo, E. 1984. Estudio epidemiológico de las rickettsiosis en la provincia de Sevilla, basado en las reacciones serológicas de inmunofluorescencia indirecta. *Rev San Hig Pub.* 58, 83-98.
- Garner, M.G., Longbottom, H.M., Cannon, R.M., Plant, A.J., 1997. A review of Q fever in Australia 1991-1994. *Australian and New Zealand journal of public health* 21, 722-730.
- Gefenaite, G., Munster, J.M., van Houdt, R., Hak, E., 2011. Effectiveness of the Q fever vaccine: a meta-analysis. *Vaccine* 29, 395-398.
- Gehlke, C.E., Biehl, K., 1934. Certain effects of grouping upon the size of the correlation coefficient in census tract material. *Journal of the American Statistical Association* 29, 169-170.
- Gelman, A., Hill, J., 2007. *Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models*. Cambridge University Press, New York.
- Gelman, A.R., Donald, B., 1992. Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Stat Sci* 7, 457-472.
- Generalitat de Catalunya, Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural. Procedimiento ante una comunicación de fiebre Q en una explotación ganadera y/o comunicación de un caso en humanos del 25 de mayo de 2015.
- Georgiev, M., Afonso, A., Neubauer, H., Needham, H., Thiery, R., Rodolakis, A., Roest, H., Stark, K., Stegeman, J., Vellema, P., van der Hoek, W., More, S., 2013. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 18.
- Gidding, H.F., Wallace, C., Lawrence, G.L., McIntyre, P.B., 2009. Australia's national Q fever vaccination program. *Vaccine* 27, 2037-2041.
- Gikas, A., Kofteridis, D.P., Manios, A., Padiaditis, J., Tselentis, Y., 2001. Newer macrolides as empiric treatment for acute Q fever infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45, 3644-3646.
- 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, 1084-1087.

- Giménez, D.F., 1965. Gram Staining of *Coxiella burnetii*. Journal of bacteriology 90, 834-835.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., Raoult, D., 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. Emerging Infectious Diseases 11, 1211-1217.
- Gómez-Calcerrada López, V., 1995. Abortos microbianos y parasitarios en el ganado caprino de Canarias. Med. Vet. Lisb. 43, 26-36.
- Gonder, J.C., Kishimoto, R.A., Castello, M.D., Pedersen, C.E., Jr., Larson, E.W., 1979. Cynomolgus monkey model for experimental Q fever infection. The Journal of infectious diseases 139, 191-196.
- González-Barrio, D., 2016. Epidemiología y control de la fiebre Q (*Coxiella burnetii*) en fauna silvestre ibérica. Universidad de Castilla-La Mancha. Tesis Doctoral.
- González-Barrio, D., Fernández-de-Mera, I.G., Ortiz, J.A., Queiros, J., Ruiz-Fons, F., 2015a. Long-term dynamics of *Coxiella burnetii* in farmed red deer (*Cervus elaphus*). Front Vet Sci 2, 74.
- González-Barrio, D., Hagen, F., Tilburg, J.J., Ruiz-Fons, F., 2016a. *Coxiella burnetii* genotypes in Iberian wildlife. Microbial ecology.
- González-Barrio, D., Jado, I., Fernández de Mera, I.G., del Rocío Fernández-Santos, M., Rodríguez-Vargas, M., García-Amil, C., Beltrán-Beck, B., Anda, P., Ruiz-Fons, F., 2016b. Genotypes of *Coxiella burnetii* in wildlife: disentangling the molecular epidemiology of a multi-host pathogen. Environmental microbiology reports.
- González-Barrio, D., Maio, E., Vieira-Pinto, M., Ruiz-Fons, F., 2015b. European Rabbits as Reservoir for *Coxiella burnetii*. Emerg Infect Dis 21, 1055-1058.
- González-Barrio, D., Velasco Avila, A.L., Boadella, M., Beltrán-Beck, B., Barasona, J.A., Santos, J.P., Queiros, J., García-Pérez, A.L., Barral, M., Ruiz-Fons, F., 2015c. Host and environmental factors modulate the exposure of free-ranging and farmed red deer (*Cervus elaphus*) to *Coxiella burnetii*. Applied and environmental microbiology 81, 6223-6231.
- González-Quijada, S., Mora-Simon, M.J., Martín-Ezquerro, A., 2014. Association between serological evidence of past *Coxiella burnetii* infection and atherosclerotic cardiovascular disease in elderly patients. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 20, 873-878.
- González-Quijada, S., Salazar-Thieroldt, E., Mora-Simon, M.J., 2015. Persistent Q fever and ischaemic stroke in elderly patients. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 21, 362-367.
- González-Sinde, M., 1995. *Coxiella burnetii*: estudio epidemiológico en la provincia de Huesca. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- González-Sinde M.C., Aznar, R., Ferrero M. et al., 1991. Fiebre Q en la provincia de Huesca. In: IV Reunión Nacional de la SEIMC, Santiago de Compostela, 643-645.
- González-Sinde, M.C., Giménez, M., González, S. et al., 1991. Seroprevalencia de *Coxiella burnetii* en el ganado de Huesca. In: IV Reunión Nacional de la SEIMC, Santiago de Compostela 689-691.
- Goyette, M., Poirier, A., Bouchard, J., Morrier, E., 1994. Q fever in Quebec (1989-93): Report of 14 cases. The Canadian journal of infectious diseases= Journal canadien des maladies infectieuses 5, 113-118.
- Graham, C.J., Yamauchi, T., Rountree, P., 1989. Q fever in animal laboratory workers: an outbreak and its investigation. Am J Infect Control 17, 345-348.
- Greenslade, E., Beasley, R., Jennings, L., Woodward, A., Weinstein, P., 2003. Has *Coxiella burnetii* (Q fever) been introduced into New Zealand? Emerg.Infect.Dis. 9, 138-140.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., 2016. Q fever vaccination: a state of art. In: Current findings in Q fever, CODA-CERVA Veterinary and Agrochemical Research Center, Bruselas, 19/04/2016.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. Vet.Res. 37, 827-833.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007a. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. Zoonoses.Public Health 54, 191-194.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007b. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. Vet.Res. 38, 849-860.
- Guatteo, R., Beaudreau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007c. Performances of an ELISA applied to serum and milk for the detection of antibodies to *Coxiella burnetii* in dairy cattle. Revue de médecine Vétérinaire 5, 250-252.
- Guatteo, R., Joly, A., Beaudreau, F., 2012. Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. Vet Microbiol 155, 430-433.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudreau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. Vaccine 26, 4320-4328.

- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.F., Joly, A., Beaudreau, F., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Vet.Microbiol.*
- Guatteo, R., Beaudreau, 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 de médecine Vétérinaire* 12, 641-644.
- Gwida, M., El-Ashker, M., El-Diasty, M., Engelhardt, C., Khan, I., Neubauer, H., 2014. Q fever in cattle in some Egyptian Governorates: a preliminary study. *BMC Res Notes* 7, 881.
- Gyuranecz, M., Denes, B., Hornok, S., Kovacs, P., Horvath, G., Jurkovich, V., Varga, T., Hajtos, I., Szabo, R., Magyar, T., Vass, N., Hofmann-Lehmann, R., Erdelyi, K., Bhide, M., Dan, A., 2012a. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hungary: screening of dairy cows, sheep, commercial milk samples, and ticks. *Vector borne and zoonotic diseases* 12, 650-653.
- Gyuranecz, M., Reiczigel, J., Krisztalovics, K., Monse, L., Szabone, G.K., Szilagyi, A., Szepe, B., Makrai, L., Magyar, T., Bhide, M., Erdelyi, K., 2012b. Factors influencing emergence of tularemia, Hungary, 1984-2010. *Emerg Infect Dis* 18, 1379-1381.
- Gyuranecz, M., Sulyok, K., Balla, E., Mag, T., Balazs, A., Simor, Z., Denes, B., Hornok, S., Bajnoczi, P., Hornstra, H., Pearson, T., Keim, P., Dan, A., 2014. Q fever epidemic in Hungary, April to July 2013. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 19.
- Hackert, V.H., Dukers-Muijers, N.H., van Loo, I.H., Wegdam-Blans, M., Somers, C., Hoebe, C.J., 2015. *Coxiella burnetii* infection is lower in children than in adults after community exposure: overlooked cause of infrequent Q fever reporting in the young. *Pediatr Infect Dis J* 34, 1283-1288.
- Hackert, V.H., van der Hoek, W., Dukers-Muijers, N., de Bruin, A., Al Dahouk, S., Neubauer, H., Bruggeman, C.A., Hoebe, C.J., 2012. Q fever: single-point source outbreak with high attack rates and massive numbers of undetected infections across an entire region. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 55, 1591-1599.
- Hackstadt, T., 1988. Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide. *Infect Immun* 56, 802-807.
- Hackstadt, T., Williams, J.C., 1981. Stability of the adenosine 5'-triphosphate pool in *Coxiella burnetii*: influence of pH and substrate. *Journal of bacteriology* 148, 419-425.
- Haider, N., Rahman, M.S., Khan, S.U., Mikolon, A., Osmani, M.G., Gurley, E.S., Shanta, I.S., Paul, S.K., Macfarlane-Berry, L., Islam, A., Islam, A., Desmond, J., Epstein, J.H., Priestley, R.A., Kersh, G.J., Rahman, M.Z., Daszak, P., Luby, S.P., Massung, R.F., Zeidner, N., 2015. Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in cattle and goats in Bangladesh. *Ecohealth* 12, 354-358.
- Hansen, M.S., Rodolakis, A., Cochonneau, D., Agger, J.F., Christoffersen, A.B., Jensen, T.K., Agerholm, J.S., 2011. *Coxiella burnetii* associated placental lesions and infection level in parturient cows. *Vet J* 190, e135-139.
- Harman, J.B., 1949. Q fever in Great Britain; clinical account of eight cases. *Lancet* 2, 1028-1030.
- Harris, R.J., Storm, P.A., Lloyd, A., Arens, M., Marmion, B.P., 2000. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiol Infect* 124, 543-549.
- Harvey, M.S., Marmion, B.P., 1956. The varying epidemiology of Q fever in the southeast region of Great Britain. I. In an urban area. *The Journal of hygiene* 54, 533-546.
- Hassig, M., Lubsen, J., 1998. Relationship between abortions and seroprevalences to selected infectious agents in dairy cows. *Zentralbl Veterinarmed B* 45, 435-441.
- Hatchette, T., Campbell, N., Hudson, R., Raoult, D., Marrie, T.J., 2003a. Natural history of Q fever in goats. *Vector borne and zoonotic diseases* 3, 11-15.
- Hatchette, T., Campbell, N., Whitney, H., Hudson, R., Marrie, T.J., 2002. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in selected populations of domestic ruminants in Newfoundland. *Can.Vet.J.* 43, 363-364.
- Hatchette, T.F., Hayes, M., Merry, H., Schlech, W.F., Marrie, T.J., 2003b. The effect of *C. burnetii* infection on the quality of life of patients following an outbreak of Q fever. *Epidemiol Infect* 130, 491-495.
- Hatchette, T.F., Hudson, R.C., Schlech, W.F., Campbell, N.A., Hatchette, J.E., Ratnam, S., Raoult, D., Donovan, C., Marrie, T.J., 2001. Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerg Infect Dis* 7, 413-419.
- Hawker, J.I., Ayres, J.G., Blair, I., Evans, M.R., Smith, D.L., Smith, E.G., Burge, P.S., Carpenter, M.J., Caul, E.O., Coupland, B., Desselberger, U., Farrell, I.D., Saunders, P.J., Wood, M.J., 1998. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Communicable disease and public health / PHLS* 1, 180-187.
- Hazlett, M.J., McDowall, R., DeLay, J., Stalker, M., McEwen, B., van Dreumel, T., Spinato, M., Binnington, B., Slavic, D., Carman,



- S., Cai, H.Y., 2013. A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* infection concurrently with other major pathogens. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 25, 359-368.
- Heinzen, R., Stiegler, G.L., Whiting, L.L., Schmitt, S.A., Mallavia, L.P., Frazier, M.E., 1990. Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Annals of the New York Academy of Sciences* 590, 504-513.
- Heinzen, R.A., Frazier, M.E., Mallavia, L.P., 1991. Sequence and linkage analysis of the *Coxiella burnetii* citrate synthase-encoding gene. *Gene* 109, 63-69.
- Heinzen, R.A., Hackstadt, T., Samuel, J.E., 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends in microbiology* 7, 149-154.
- Hellenbrand, W., Breuer, T., Petersen, L., 2001a. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis* 7, 789-796.
- Hellenbrand, W., Breuer, T., Petersen, L., 2001b. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerging Infectious Diseases* 7, 789-796.
- Hellín, T., 1990. Fiebre Q. Universidad Autónoma de Madrid. Tesis Doctoral.
- Hellín, T., Bouza, E., Casimir, L. *et al.*, 1981. Fiebre Q aguda: experiencia en 23 casos. *Med Clin (Barcelona)* 77, 1-7.
- Henning, K., Hotzel, H., Peters, M., Welge, P., Pops, W., Theegarten, D., 2009. [Unanticipated outbreak of Q fever during a study using sheep, and its significance for further projects]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 122, 13-19.
- 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<sup>(R)</sup>. *Vaccine* 29, 2653-2656.
- Hernychova, L., Toman, R., Ciampor, F., Hubalek, M., Vackova, J., Macela, A., Skultety, L., 2008. Detection and identification of *Coxiella burnetii* based on the mass spectrometric analyses of the extracted proteins. *Anal Chem* 80, 7097-7104.
- Herr, S., Huchzermeyer, H.F., Te Brugge, L.A., Williamson, C.C., Roos, J.A., Schiele, G.J., 1985. The use of a single complement fixation test technique in bovine brucellosis, Johne's disease, dourine, equine piroplasmiasis and Q fever serology. *Onderstepoort J Vet Res* 52, 279-282.
- Hickie, I., Davenport, T., Wakefield, D., Vollmer-Conna, U., Cameron, B., Vernon, S.D., Reeves, W.C., Lloyd, A., Dubbo Infection Outcomes Study, G., 2006. Post-infective and chronic fatigue syndromes precipitated by viral and non-viral pathogens: prospective cohort study. *BMJ* 333, 575.
- Hickie, I., Lloyd, A., Wakefield, D., Ricci, C., 1996. Is there a postinfection fatigue syndrome? *Aust Fam Physician* 25, 1847-1852.
- Hilbert, A., Schmoock, G., Lenzko, H., Moog, U., Diller, R., Frohlich, A., Hoffmann, L., Horner, S., Elschner, M., Tomaso, H., Henning, K., Neubauer, H., Sprague, L.D., 2012. Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy German sheep flocks. *BMC Res Notes* 5, 152.
- Hilbink, F., Penrose, M., Kovacova, E., Kazar, J., 1993. Q fever is absent from New Zealand. *Int.J.Epidemiol.* 22, 945-949.
- Hirai, A., Nakama, A., Chiba, T., Kai, A., 2012. Development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in cheese samples. *The Journal of veterinary medical science* 74, 175-180.
- Hirai, K., To, H., 1998. Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. *The Journal of veterinary medical science* 60, 781-790.
- Ho, T., Htwe, K.K., Yamasaki, N., Zhang, G.Q., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1995. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. *Microbiol Immunol* 39, 663-671.
- Hogema, B.M., Slot, E., Molier, M., Schneeberger, P.M., Hermans, M.H., van Hannen, E.J., van der Hoek, W., Cuijpers, H.T., Zaaier, H.L., 2012. *Coxiella burnetii* infection among blood donors during the 2009 Q-fever outbreak in The Netherlands. *Transfusion* 52, 144-150.
- Hogerwerf, L., Borlee, F., Still, K., Heederik, D., van Rotterdam, B., de Bruin, A., Nielen, M., Wouters, I.M., 2012. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in inhalable airborne dust samples from goat farms after mandatory culling. *Applied and environmental microbiology* 78, 5410-5412.
- Hogerwerf, L., Courcoul, A., Klinkenberg, D., Beaudeau, F., Vergu, E., Nielen, M., 2013. Dairy goat demography and Q fever infection dynamics. *Veterinary research* 44, 28.
- Hogerwerf, L., Koop, G., Klinkenberg, D., Roest, H.I., Vellema, P., Nielen, M., 2014. Test and cull of high risk *Coxiella burnetii* infected pregnant dairy goats is not feasible due to poor test performance. *Vet J* 200, 343-345.
- Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H.I., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D., Nielen, M., 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17, 379-386.

- Hoover, T.A., Culp, D.W., Vodkin, M.H., Williams, J.C., Thompson, H.A., 2002. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* Nine Mile strain. *Infect Immun* 70, 6726-6733.
- 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. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 924-931.
- Hornstra, H.M., Priestley, R.A., Georgia, S.M., Kachur, S., Birdsell, D.N., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., Kersh, G.J., Keim, P., Massung, R.F., Pearson, T., 2011. Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *Plos One* 6.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 1989. *Applied logistic regression*. New York.
- Hotta, A., Kawamura, M., To, H., Andoh, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 2002. Phase variation analysis of *Coxiella burnetii* during serial passage in cell culture by use of monoclonal antibodies. *Infect Immun* 70, 4747-4749.
- Houe, H., Baker, J.C., Maes, R.K., Ruegg, P.L., Lloyd, J.W., 1995. Application of antibody titers against bovine viral diarrhea virus (BVDV) as a measure to detect herds with cattle persistently infected with BVDV. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 7, 327-332.
- Houwers, D.J., Richardus, J.H., 1987. Infections with *Coxiella burnetii* in man and animals in The Netherlands. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 267, 30-36.
- Howe, D., Mallavia, L.P., 2000. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun* 68, 3815-3821.
- Howe, K.S., Hasler, B., Stark, K.D., 2013. Economic principles for resource allocation decisions at national level to mitigate the effects of disease in farm animal populations. *Epidemiol Infect* 141, 91-101.
- Htwe, K.K., Amano, K., Sugiyama, Y., Yagami, K., Minamoto, N., Hashimoto, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1992. Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* in domestic and companion animals in Japan. *The Veterinary record* 131, 490.
- Hubalek, Z., Juricova, Z., Svobodova, S., Halouzka, J., 1993. A Serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech-Republic. *Journal of Wildlife Diseases* 29, 604-607.
- Huijskens, E.G., Smit, L.A., Rossen, J.W., Heederik, D., Koopmans, M., 2016. Evaluation of patients with community-acquired pneumonia caused by zoonotic pathogens in an area with a high density of animal farms. *Zoonoses and public health* 63, 160-166.
- Huijsmans, C.J., Schellekens, J.J., Wever, P.C., Toman, R., Savelkoul, P.H., Janse, I., Hermans, M.H., 2011. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2051-2057.
- Igual, R., Asencio, R., Román, P., *et al.*, 1990. Detección de anticuerpos frente a *C. burnetii* en el área norte de Huelva. In: IV Congreso de la SEIMC, Madrid.
- Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía, Ministerio de Energía, Turismo y Agenda Digital. Atlas eólico de España. 2017. <http://atlaseolico.idae.es/>
- Instituto Nacional de Estadística, 2011. Notas de prensa. Censo agrario 2009. <http://www.ine.es/prensa/np668.pdf>
- ISCIII, Instituto de Salud Carlos III, 2017. Enfermedades de declaración obligatoria. Informes anuales. <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/enfermedades-declaracion-obligatoria-informes-anuales.shtml>
- Isken, L.D., Kraaij-Dirkzwager, M., Vermeer-de Bondt, P.E., Rumke, H.C., Wijkmans, C., Opstelten, W., Timen, A., 2013. Implementation of a Q fever vaccination program for high-risk patients in the Netherlands. *Vaccine* 31, 2617-2622.
- Jacobs, J.A., Siegford, J.M., 2012. Invited review: The impact of automatic milking systems on dairy cow management, behavior, health, and welfare. *Journal of dairy science* 95, 2227-2247.
- Jado, I., Carranza-Rodríguez, C., Barandika, J.F., Toledo, A., García-Amil, C., Serrano, B., Bolaños, M., Gil, H., Escudero, R., García-Pérez, A.L., Olmeda, A.S., Astobiza, I., Lobo, B., Rodríguez-Vargas, M., Pérez-Arellano, J.L., López-Gatius, F., Pascual-Velasco, F., Cilla, G., Rodríguez, N.F., Anda, P., 2012. Molecular method for the characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. *BMC Microbiol* 12, 91.
- Jager, C., Willems, H., Thiele, D., Baljer, G., 1998. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiology and Infection* 120, 157-164.
- Janbon, F., Raoult, D., Reynes, J., Bertrand, A., 1989. Concomitant human infection due to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnetii*. *The Journal of infectious diseases* 160, 354-355.

- Jaspers, U., Thiele, D., Krauss, H., 1994. Monoclonal antibody based competitive ELISA for the detection of specific antibodies against *Coxiella burnetii* in sera from different animal species. Zentralbl Bakteriologie 281, 61-66.
- Jellison, W.L., Ormsbee, R., et al., 1948. Q fever studies in Southern California; natural infection in a dairy cow. Public Health Rep 63, 1611-1618.
- Jensen, T.K., Montgomery, D.L., Jaeger, P.T., Lindhardt, T., Agerholm, J.S., Bille-Hansen, V., Boye, M., 2007. Application of fluorescent in situ hybridisation for demonstration of *Coxiella burnetii* in placentas from ruminant abortions. APMIS 115, 347-353.
- Jones, R.M., Hertwig, S., Pitman, J., Vipond, R., Aspan, A., Bolske, G., McCaughey, C., McKenna, J.P., van Rotterdam, B.J., de Bruin, A., Ruuls, R., Buijs, R., Roest, H.J., Sawyer, J., 2011. Interlaboratory comparison of real-time polymerase chain reaction methods to detect *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 23, 108-111.
- Jones, R., Nicas, M., Hubbard, A., Reingold, A., 2006. The Infectious Dose of *Coxiella burnetii* (Q Fever). Applied Biosafety 11, 32-41.
- Joulie, A., Laroucau, K., Bailly, X., Prigent, M., Gasqui, P., Lepetitcolin, E., Blanchard, B., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., Jourdain, E., 2015. Circulation of *Coxiella burnetii* in a Naturally Infected Flock of Dairy Sheep: Shedding Dynamics, Environmental Contamination, and Genotype Diversity. Applied and environmental microbiology 81, 7253-7260.
- Jung, B.Y., Seo, M.G., Lee, S.H., Byun, J.W., Oem, J.K., Kwak, D., 2014. Molecular and serologic detection of *Coxiella burnetii* in native Korean goats (*Capra hircus coreanae*). Vet Microbiol 173, 152-155.
- Kadra, B., Balla, É., 2006. Development and production of vaccines against abortion caused by *Chlamydia abortus* and *Coxiella burnetii* in small ruminants. Small Ruminant Research 62, 75-78.
- Kampen, A.H., Hopp, P., Groneng, G.M., Melkild, I., Urdahl, A.M., Karlsson, A.C., Tharaldsen, J., 2012. No indication of *Coxiella burnetii* infection in Norwegian farmed ruminants. BMC veterinary research 8, 59.
- Kampschreur, L.M., Oosterheert, J.J., Wever, P.C., Bleeker-Rovers, C.P., 2014. Antibiotic prophylaxis for high-risk patients with acute Q Fever: no definitive answers yet. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 58, 446-447.
- Kanfer, E., Farrag, N., Price, C., MacDonald, D., Coleman, J., Barrett, A.J., 1988. Q fever following bone marrow transplantation. Bone marrow transplantation 3, 165-166.
- Kanoute, Y.B., Gagnon, B.G., Schindler, C., Bonfoh, B., Schelling, E., 2016. Epidemiology of brucellosis, Q Fever and Rift Valley Fever at the human and livestock interface in northern Cote d'Ivoire. Acta tropica.
- Kaplan, M.M., Bertagna, P., 1955. The geographical distribution of Q fever. Bulletin of the World Health Organization 13, 829-860.
- Karagiannis, I., Schimmer, B., Van Lier, A., Timen, A., Schneeberger, P., Van Rotterdam, B., De Bruin, A., Wijkmans, C., Rietveld, A., Van Duynhoven, Y., 2009. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. Epidemiol Infect 137, 1283-1294.
- Karlsson, E., Macellaro, A., Bystrom, M., Forsman, M., Frangoulidis, D., Janse, I., Larsson, P., Lindgren, P., Ohrman, C., van Rotterdam, B., Sjodin, A., Myrtennas, K., 2014. Eight new genomes and synthetic controls increase the accessibility of rapid melt-MAMA SNP typing of *Coxiella burnetii*. PLoS One 9, e85417.
- Keijmel, S.P., Delsing, C.E., Sprong, T., Bleijenberg, G., van der Meer, J.W., Knoop, H., Bleeker-Rovers, C.P., 2013. The Qure study: Q fever fatigue syndrome--response to treatment; a randomized placebo-controlled trial. BMC infectious diseases 13, 157.
- Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Mason, P.R., Raoult, D., 1993. Q fever in Zimbabwe. A review of the disease and the results of a serosurvey of humans, cattle, goats and dogs. S Afr Med J 83, 21-25.
- 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, 37-45.
- Kermode, M., Yong, K., Hurley, S., Marmion, B., 2003. An economic evaluation of increased uptake in Q fever vaccination among meat and agricultural industry workers following implementation of the National Q Fever Management Program. Australian and New Zealand journal of public health 27, 390-398.
- Kersh, G.J., Fitzpatrick, K.A., Self, J.S., Priestley, R.A., Kelly, A.J., Lash, R.R., Marsden-Haug, N., Nett, R.J., Bjork, A., Massung, R.F., Anderson, A.D., 2013. Presence and persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. Applied and environmental microbiology 79, 1697-1703.
- Kersh, G.J., Priestley, R.A., Hornstra, H.M., Self, J.S., Fitzpatrick, K.A., Biggerstaff, B.J., Keim, P., Pearson, T., Massung, R.F., 2016. Genotyping and axenic growth of

- Coxiella burnetii* isolates found in the United States environment. Vector borne and zoonotic diseases 16, 588-594.
- Khaled, H., Sidi-Boumedine, K., Merdja, S., Dufour, P., Dahmani, A., Thiery, R., Rousset, E., Bouyoucef, A., 2016. Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 47, 19-25.
- Khalili, M., Sakhaee, E., 2009. An update on a serologic survey of Q Fever in domestic animals in Iran. The American journal of tropical medicine and hygiene 80, 1031-1032.
- Khalili, M., Sakhaee, E., Aflatoonian, M.R., Shahabi-Nejad, N., 2011. Herd-prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in dairy cattle farms based on bulk tank milk analysis. Asian Pac J Trop Med 4, 58-60.
- Kim, S.G., Kim, E.H., Lafferty, C.J., Dubovi, E., 2005. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. Emerg.Infect.Dis. 11, 619-621.
- Kirkbride, C.A., 1993a. Bacterial agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 5, 64-68.
- Kirkbride, C.A., 1993b. Diagnoses in 1,784 ovine abortions and stillbirths. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 5, 398-402.
- Kittelberger, R., Mars, J., Wibberley, G., Sting, R., Henning, K., Horner, G.W., Garnett, K.M., Hannah, M.J., Jenner, J.A., Piggott, C.J., O'Keefe, J.S., 2009. Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants : recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. N.Z.Vet.J. 57, 262-268.
- 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, e85424.
- Klee, S.R., Ellerbrok, H., Tyczka, J., Franz, T., Appel, B., 2006a. Evaluation of a real-time PCR assay to detect *Coxiella burnetii*. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1078, 563-565.
- Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B., 2006b. 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., Richards, A.L., Breiman, R.F., Cleaveland, S., Njenga, M.K., 2013. *Coxiella burnetii* in humans, domestic ruminants, and ticks in rural western Kenya. The American journal of tropical medicine and hygiene 88, 513-518.
- Kovacova, E., Kazar, J., 2000. *Rickettsial* diseases and their serological diagnosis. Clin Lab 46, 239-245.
- Kovacova, E., Kazar, J., 2002. Q fever--still a query and underestimated infectious disease. Acta Virologica 46, 193-210.
- Kovacova, E., Kazar, J., Spanelova, D., 1998. Suitability of various *Coxiella burnetii* antigen preparations for detection of serum antibodies by various tests. Acta virologica 42, 365-368.
- Kowalczywska, M., Sekeyova, Z., Raoult, D., 2011. Proteomics paves the way for Q fever diagnostics. Genome Med 3, 50.
- Krauss, H., Schmeer, N., Schiefer, H.G., 1987. Epidemiology and significance of Q fever in the Federal Republic of Germany. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 267, 42-50.
- Kreizinger, Z., Szeredi, L., Bacsadi, A., Nemes, C., Sugar, L., Varga, T., Sulyok, K.M., Szigeti, A., Acs, K., Tobias, E., Borel, N., Gyuranecz, M., 2015. Occurrence of *Coxiella burnetii* and Chlamydiales species in abortions of domestic ruminants and in wild ruminants in Hungary, Central Europe. Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 27, 206-210.
- Krt, B., 2003. The influence of *Coxiella burnetii* phase I and phase II antigens on the serological diagnosis of Q fever in cattle. Slov Vet Res. 40 (3/4): 203-208.
- Krumbiegel, E.R., Wisniewski, H.J., 1970. Q fever in the Milwaukee area. II. Consumption of infected raw milk by human volunteers. Archives of environmental health 21, 63-65.
- Kruszewski, D., Lembowicz, K., Tylewska-Wierzbanska, S., 1996. Possible sexual transmission of Q fever among humans. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 22, 1087-1088.
- Kruszewski, D., Tylewska-Wierzbanska, S., 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. Research in veterinary science 62, 299-300.
- Kulagin, S.M., 1956. [Epidemiology of Q fever]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii 27, 3-10.
- Kulagin, S.M., Fedorova, N.I., Sokolova, N.F., 1958. [Problem of survival of *Rickettsia burnetii* in water and method of its disinfection]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii 29, 62-66.

- Kulagin, S.M., Silich, V.A., 1956. [Q fever in Grozny region]. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii 27, 35-39.
- Kuley, R., Smith, H.E., Janse, I., Harders, F.L., Baas, F., Schijlen, E., Nabuurs-Franssen, M.H., Smits, M.A., Roest, H.I., Bossers, A., 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 announcements 4.
- Kulldorff, M., N, N., 1995. Spatial disease clusters: detection and inference. Statistics in medicine 14, 499-810.
- Kulldorff, M. and Information Management Services. 2009. Inc. SaTScanTM v8.0: Software for the spatial and space-time scan statistics.
- La Scola, B., Lepidi, H., Raoult, D., 1997. Pathologic changes during acute Q fever: influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs. Infect Immun 65, 2443-2447.
- La Scola, B., Raoult, D., 2001. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 7, 75-79.
- Ladbury, G.A., Van Leuken, J.P., Swart, A., Vellema, P., Schimmer, B., Ter Schegget, R., Van der Hoek, W., 2015. Integrating interdisciplinary methodologies for One Health: goat farm re-implicated as the probable source of an urban Q fever outbreak, the Netherlands, 2009. BMC infectious diseases 15, 372.
- Lai, C.H., Chang, L.L., Lin, J.N., Chen, W.F., Wei, Y.F., Chiu, C.T., Wu, J.T., Hsu, C.K., Chen, J.Y., Lee, H.S., Lin, H.H., Chen, Y.H., 2014. Clinical characteristics of Q fever and etiology of community-acquired pneumonia in a tropical region of southern Taiwan: a prospective observational study. PLoS One 9, e102808.
- Lai, C.H., Chang, L.L., Lin, J.N., Liao, M.H., Liu, S.S., Lee, H.H., Lin, H.H., Chen, Y.H., 2015. Association of Human Q Fever with Animal Husbandry, Taiwan, 2004-2012. Emerg Infect Dis 21, 2217-2220.
- Lambton, S.L., Smith, R.P., Gillard, K., Horigan, M., Farren, C., Pritchard, G.C., 2016. Serological survey using ELISA to determine the prevalence of *Coxiella burnetii* infection (Q fever) in sheep and goats in Great Britain. Epidemiol Infect 144, 19-24.
- 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, 37-41.
- Lang, G.H., 1989. Q fever: an emerging public health concern in Canada. Can J Vet Res 53, 1-6.
- Lang, G.H. 1990. Coxiellosis in animals, In: Press, C. (Ed.) Q Fever. Vol. 1. The Disease. Boca Raton, Fla, USA.
- Lange, S., Sollner, H., Dittmar, H., Hofmann, J., Lange, A., 1992. [Q fever antibody titer--follow-up study in cattle with special reference to pregnancy]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 105, 260-263.
- Layne, P., Romero F, Pérez, A. et al., 1994. Fiebre Q. Revisión de 35 casos en la isla de Tenerife. An Med Intern (Madrid) 11, 85.
- Ledina, D., Bradaric, N., Milas, I., Ivic, I., Brncic, N., Kuzmivic, N., 2007. Chronic fatigue syndrome after Q fever. Med Sci Monit 13, CS88-92.
- Lennette, E.H., Holmes, M.A., Abinanti, F.R., 1952. Q fever studies. XIV. Observations on the pathogenesis of the experimental infection induced in sheep by the intravenous route. American journal of hygiene 55, 254-267.
- Leone, M., Honstetter, A., Lepidi, H., Capo, C., Bayard, F., Raoult, D., Mege, J.L., 2004. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. The Journal of infectious diseases 189, 339-345.
- Lepe, J.A., Guerrero, F.J., Ruiz-Calderón, A., del Castillo, E., Gómez-Salvago, S., Jiménez-Alonso, M.A., Palomo, S., Perea, R., 1999. [The epidemiology of Q fever in the northern area of Huelva, Spain]. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica 17, 65-68.
- Lepe, JA; Guevara, D., Úbeda, J.M., 1994. Estudio seroepidemiológico de fiebre Q y fiebre botonosa en la zona norte de la provincia de Huelva. In: VI Congreso Nacional de la SEIMC, Valencia, 324.
- Leroy, Q., Armougom, F., Barbry, P., Raoult, D., 2011. Genotyping of *Coxiella burnetii* using microarrays reveals a conserved genome for hard tick isolates. PLoS One 6, e25781.
- Leulmi, H., Aouadi, A., Bitam, I., Bessas, A., Benakhla, A., Raoult, D., Parola, P., 2016. Detection of Bartonella tamiae, Coxiella burnetii and Rickettsiae in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. Parasites & vectors 9, 27.
- Leung-Shea, C., Danaher, P.J., 2006. Q fever in members of the United States armed forces returning from Iraq. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 43, e77-82.
- Lewis, G.S., 2004. Steroidal regulation of uterine immune defenses. Animal reproduction science 82-83, 281-294.

- Li, Q., Niu, D., Wen, B., Chen, M., Qiu, L., Zhang, J., 2005. Protective immunity against Q fever induced with a recombinant P1 antigen fused with HspB of *Coxiella burnetii*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1063, 130-142.
- Limonard, G.J., Nabuurs-Franssen, M.H., Dekhuijzen, P.N., Groot, C.A., 2011. Prevention of Q fever endocarditis. *The Lancet. Infectious diseases* 11, 82-83.
- Limonard, G.J., Thijsen, S.F., Bossink, A.W., Asscheman, A., Bouwman, J.J., 2012. Developing a new clinical tool for diagnosing chronic Q fever: the *Coxiella* ELISPOT. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64, 57-60.
- Literak, I., Kroupa, L., 1998. Herd-level *Coxiella burnetii* seroprevalence was not associated with herd-level breeding performance in Czech dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 33, 261-265.
- Lockhart, M.G., Graves, S.R., Banazis, M.J., Fenwick, S.G., Stenos, J., 2011. A comparison of methods for extracting DNA from *Coxiella burnetii* as measured by a duplex qPCR assay. *Lett Appl Microbiol* 52, 514-520.
- Loftis, A.D., Priestley, R.A., Massung, R.F., 2010. Detection of *Coxiella burnetii* in commercially available raw milk from the United States. *Foodborne pathogens and disease* 7, 1453-1456.
- López-Gatius, F., Almeria, S., García-Ispuerto, I., 2012. Serological screening for *Coxiella burnetii* infection and related reproductive performance in high producing dairy cows. *Research in veterinary science* 93, 67-73.
- López-Helguera, I., López-Gatius, F., Tutusaus, J., García-Ispuerto, I., 2013. Reproductive performance of high producing lactating cows in *Coxiella*-infected herds following vaccination with phase-I *Coxiella burnetii* vaccine during advanced pregnancy. *Vaccine* 31, 3046-3050.
- López-Olvera, J.R., Vidal, D., Vicente, J., Pérez, M., Luján, L., Gortázar, C., 2009. Serological survey of selected infectious diseases in mouflon (*Ovis aries musimon*) from southcentral Spain. *Eur J Wildl Res.* 55, 75-79.
- Lucchese, L., Capello, K., Barberio, A., Zuliani, F., Stegeman, A., Ceglie, L., Guerrini, E., Marangon, S., Natale, A., 2015. IFAT and ELISA phase I/phase II as tools for the identification of Q fever chronic milk shedders in cattle. *Vet Microbiol* 179, 102-108.
- Luoto, L., Huebner, R.J., 1950. Q fever studies in southern California; IX. Isolation of Q fever organisms from parturient placenta; of naturally infected dairy cows. *Public Health Rep* 65, 541-544.
- Luoto, L., Huebner, R.J., Stoenner, H.G., 1951. Q fever studies in Southern California. XII. Aureomycin treatment of dairy cattle naturally infected with *Coxiella burnetii*. *Public Health Rep* 66, 199-204.
- Luque-Larena, J.J., Mougeot, F., Roig, D.V., Lambin, X., Rodríguez-Pastor, R., Rodríguez-Valín, E., Anda, P., Escudero, R., 2015. Tularemia Outbreaks and Common Vole (*Microtus arvalis*) Irruptive Population Dynamics in Northwestern Spain, 1997-2014. *Vector borne and zoonotic diseases* 15, 568-570.
- Lyoo, K.S., Kim, D., Jang, H.G., Lee, S.J., Park, M.Y., Hahn, T.W., 2017. Prevalence of Antibodies Against *Coxiella burnetii* in Korean Native Cattle, Dairy Cattle, and Dogs in South Korea. *Vector borne and zoonotic diseases* 17, 213-216.
- Machado-Ferreira, E., Vizzoni, V.F., Balsemao-Pires, E., Moerbeck, L., Gazeta, G.S., Piesman, J., Voloch, C.M., Soares, C.A., 2016. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol Res.*
- Magouras, I., Hunninghaus, J., Scherrer, S., Wittenbrink, M.M., Hamburger, A., Stark, K.D., Schupbach-Regula, G., 2015. *Coxiella burnetii* infections in small ruminants and humans in Switzerland. *Transbound Emerg Dis.*
- Maltezou, H.C., Constantopoulou, I., Kallergi, C., Vlahou, V., Georgakopoulos, D., Kafetzis, D.A., Raoult, D., 2004. Q fever in children in Greece. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70, 540-544.
- Mallavia, L.P., 1991. Genetics of *Rickettsiae*. *Eur J Epidemiol* 7, 213-221.
- Marco, L.; Ciruelos, J.R.; Bustos, P., Martínez, J.L., 1985. Fiebre Q: a propósito de 5 casos en Guipúzcoa. *Gac Med Bilbao* 82, 293-295.
- Marenzoni, M.L., Stefanetti, V., Papa, P., Casagrande Proietti, P., Bietta, A., Coletti, M., Passamonti, F., Henning, K., 2013. Is the horse a reservoir or an indicator of *Coxiella burnetii* infection? Systematic review and biomolecular investigation. *Vet Microbiol* 167, 662-669.
- Mares-Guia, M.A., Rozental, T., Guterres, A., Gomes, R., Almeida, D.N., Moreira, N.S., Barreira, J.D., Favacho, A.R., Santana, A.L., Lemos, E.R., 2014. Molecular identification of the agent of Q fever - *Coxiella burnetii* - in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 47, 231-234.
- Mariconti, M., Epis, S., Gaibani, P., Dalla Valle, C., Sasser, D., Tomao, P., Fabbi, M., Castelli, F., Marone, P., Sambri, V., Bazzocchi, C., Bandi, C., 2012. Humans parasitized by the hard tick *Ixodes ricinus* are seropositive to *Mitochondria*: is *Mitochondria* a novel pathogen, or just a marker of tick bite? *Pathogens and global health* 106, 391-396.
- Marmion, B., 2007. Q fever: the long journey to control by vaccination. *The Medical journal of Australia* 186, 164-166.

- Marmion, B.P., Higgins, F.E., Bridges, J.B., Edwards, A.T., 1960. A case of subacute Rickettsial endocarditis; with a survey of cardiac patients for this infection. *British medical journal* 2, 1264-1267.
- Marmion, B.P., Shannon, M., Maddocks, I., Storm, P., Penttila, I., 1996. Protracted debility and fatigue after acute Q fever. *Lancet* 347, 977-978.
- Marmion, B.P., Stoker, M.G., 1950. Q fever in Great Britain. *Epidemiology of an outbreak. Lancet* 2, 611-616.
- Marmion, B.P., Storm, P.A., Ayres, J.G., Semendric, L., Mathews, L., Winslow, W., Turra, M., Harris, R.J., 2005. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever. *QJM* 98, 7-20.
- Marrie, T.J., 1988. Q fever, 1979-1987-Nova Scotia. *Can Dis Wkly Rep.* 14, 69-70.
- Marrie, T.J. 1990a. Acute Q fever, In: Q fever. The disease. CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 125-160.
- Marrie, T.J. 1990b. Epidemiology of Q fever, In: Press, I. (Ed.) Q fever: The Disease. Boca Raton, Fla., 49-70.
- Marrie, T.J., 1990c. Q fever - a review. *The Canadian veterinary journal= La revue veterinaire canadienne* 31, 555-563.
- Marrie, T.J., Durant, H., Williams, J.C., Mintz, E., Waag, D.M., 1988. Exposure to parturient cats: a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *The Journal of infectious diseases* 158, 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, 119-127.
- Marrie, T.J., Raoult, D., 1997. Q fever--a review and issues for the next century. *International journal of antimicrobial agents* 8, 145-161.
- Marrie, T.J., Stein, A., Janigan, D., Raoult, D., 1996. Route of infection determines the clinical manifestations of acute Q fever. *The Journal of infectious diseases* 173, 484-487.
- Martin, R.J., Schnurrenberger, P.R., Ferris, D.H., Hanger, P.N., Morrissey, R.A., 1982. Decreasing prevalence of Q fever in Illinois. *Public Health Rep* 97, 170-174.
- Martínez-Ibeas, A.M., 2016. Patologías abortivas en ganado caprino: Causas más frecuentes y medidas de control. *Tierras Caprino* 15.
- Martínez-Luengas, F., Borobio, M.V., Gálvez, J., León de Lope, M., Corral, J.L., Manas, R., Suárez, A., Gallardo, R.M., Perea, E.J., 1985. [Q fever in Seville. Comparison with other entities. Description of 34 cases and review]. *Revista clínica española* 176, 400-405.
- Martínez, J.M., Pérez, M., Olivella, A., *et al.*, 1992. Fiebre Q: brote epidémico de la forma febril pura. *Atención Primaria* 9, 425-428.
- Martini, M., Baldelli, R., Paulucci De Calboli, L., 1994. An epidemiological study on Q fever in the Emilia-Romagna Region, Italy. *Zentralbl Bakteriol* 280, 416-422.
- Martinov, S., 2007a. Contemporary state of the problem Q fever in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 21, 353-361.
- Martinov, S., 2007b. Studies on mastites in sheep, caused by *Coxiella burnetii*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 21, 484-490.
- Martinov, S.P., Neikov, P., Popov, G.V., 1989. Experimental Q fever in sheep. *Eur J Epidemiol* 5, 428-431.
- Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, G., Patta, C., Tola, S., 2007. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 19, 96-98.
- Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., Chessa, G., Cillara, G., Chisu, V., Tola, S., 2004. Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. *Vet Microbiol* 99, 301-305.
- Massung, R.F., Cutler, S.J., Frangoulidis, D., 2012. Molecular typing of *Coxiella burnetii* (Q fever). *Advances in experimental medicine and biology* 984, 381-396.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q fever. *Clin.Microbiol.Rev.* 12, 518-553.
- Mazeri, S., Scolamacchia, F., Handel, I.G., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvort, B.M., 2013. Risk factor analysis for antibodies to *Brucella*, *Leptospira* and *C. burnetii* among cattle in the Adamawa Region of Cameroon: a cross-sectional study. *Tropical animal health and production* 45, 617-623.
- Mazyad, S.A., Hafez, A.O., 2007. Q fever (*Coxiella burnetii*) among man and farm animals in North Sinai, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 37, 135-142.
- McCaughy, C., Murray, L.J., McKenna, J.P., Menzies, F.D., McCullough, S.J., O'Neill, H.J., Wyatt, D.E., Cardwell, C.R., Coyle, P.V., 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol Infect* 138, 21-27.
- McCaul, T.F., Banerjee-Bhatnagar, N., Williams, J.C., 1991a. Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect Immun* 59, 3243-3253.
- McCaul, T.F., Williams, J.C., 1981. Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal of bacteriology* 147, 1063-1076.
- McCaul, T.F., Williams, J.C., Thompson, H.A., 1991b. Electron microscopy of *Coxiella*

- burnetii* in tissue culture. Induction of cell types as products of developmental cycle. *Acta virologica* 35, 545-556.
- McQuiston, J.H., Childs, J.E., 2002. Q fever in humans and animals in the United States. *Vector.Borne.Zoonotic.Dis.* 2, 179-191.
- McQuiston, J.H., Nargund, V.N., Miller, J.D., Priestley, R., Shaw, E.I., Thompson, H.A., 2005. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among veterinary school dairy herds in the United States, 2003. *Vector borne and zoonotic diseases* 5, 90-91.
- Meadows, S., Jones-Bitton, A., McEwen, S., Jansen, J., Menzies, P., 2015a. *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in goats in Ontario, Canada. *Preventive veterinary medicine* 121, 199-205.
- Meadows, S., Jones-Bitton, A., McEwen, S., Jansen, J., Menzies, P., 2015b. *Coxiella burnetii* seropositivity and associated risk factors in sheep in Ontario, Canada. *Preventive veterinary medicine* 122, 129-134.
- Meadows, S., Jones-Bitton, A., McEwen, S.A., Jansen, J., Patel, S.N., Filejski, C., Menzies, P., 2016. *Coxiella burnetii* (Q Fever) Seropositivity and associated risk Factors in sheep and goat farm workers in Ontario, Canada. *Vector borne and zoonotic diseases.* 16 (10): 643-649.
- Mediannikov, O., Fenollar, F., Socolovschi, C., Diatta, G., Bassene, H., Molez, J.F., Sokhna, C., Trape, J.F., Raoult, D., 2010. *Coxiella burnetii* in Humans and Ticks in Rural Senegal. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4.
- Meekelenkamp, J.C., Schneeberger, P.M., Wever, P.C., Leenders, A.C., 2012. Comparison of ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay detecting *Coxiella burnetii* IgM phase II for the diagnosis of acute Q fever. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31, 1267-1270.
- Meerburg, B.G., Reusken, C.B.E.M., 2011. The role of wild rodents in spread and transmission of *Coxiella burnetii* needs further elucidation. *Wildlife Research* 38, 617-625.
- Mege, J.L., Maurin, M., Capo, C., Raoult, D., 1997. *Coxiella burnetii*: the 'query' fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS Microbiol Rev* 19, 209-217.
- Melenotte, C., Million, M., Hartung, O., Botelho-Nevers, E., Claudel, M., Craighero, F., Brouqui, P., Raoult, D., 2012. Query rectal bleeding. *Lancet* 380, 446.
- Mensa, J., Pumarola, A., García San Miguel, J., *et al.*, 1983. Fiebre Q: a propósito de 13 observaciones. *Med Clin (Barcelona)* 80, 249-253.
- Mentaberre, G., Gutiérrez, C., Rodríguez, N.F., Joseph, S., González-Barrio, D., Cabezón, O., de la Fuente, J., Gortazar, C., Boadella, M., 2013. A transversal study on antibodies against selected pathogens in dromedary camels in the Canary Islands, Spain. *Vet Microbiol* 167, 468-473.
- Menzies, P.I., 2012. Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. *Animal reproduction science* 130, 162-172.
- 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, 639-649.
- Merino, F.J., Nebreda, T., Campos, A., 1998. Most common clinical presentation of Q fever in a province in the north of Spain. *Eur J Epidemiol* 14, 729-730.
- Milazzo, A., Hall, R., Storm, P.A., Harris, R.J., Winslow, W., Marmion, B.P., 2001. Sexually transmitted Q fever. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 33, 399-402.
- Millán, A., Argany, A.; Febles.; J., *et al.*, 1989. Fiebre Q en la isla de La Palma. Revisión de 35 pacientes. *An Med Intern (Madrid)* 6, 527-530.
- Million, M., Belleveque, L., Labussiere, A.S., Dekel, M., Ferry, T., Deroche, P., Socolovschi, C., Cammilleri, S., Raoult, D., 2014. Culture-negative prosthetic joint arthritis related to *Coxiella burnetii*. *The American journal of medicine* 127, 786 e787-786 e710.
- Million, M., Lepidi, H., Raoult, D., 2009. [Q fever: current diagnosis and treatment options]. *Medecine et maladies infectieuses* 39, 82-94.
- Million, M., Raoult, D., 2015. Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management. *J Infect* 71 Suppl 1, S2-9.
- Million, M., Walter, G., Thuny, F., Habib, G., Raoult, D., 2013. Evolution from acute Q fever to endocarditis is associated with underlying valvulopathy and age and can be prevented by prolonged antibiotic treatment. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 57, 836-844.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente. 2009. Encuestas Ganaderas MAPAMA 2009.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente. 2017a. Anuario de estadística del MAPAMA 2015.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente, 2017b.



- Caracterización del sector ovino y caprino en España. 2014. [http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/caracterizaciondelsectorovinoycaprinoenespana2014\\_def\\_tcm7-411855.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/caracterizaciondelsectorovinoycaprinoenespana2014_def_tcm7-411855.pdf)
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente. 2017c. Caracterización del sector ovino y caprino en España. 2015.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente. 2017d. Encuestas ganaderas 2015.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente, 2017e. Encuestas ganaderas del MAPAMA. 2016.
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente, 2017f. Indicadores económicos del sector ovino y caprino de leche. 2015. [http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosdelsectorovinoycaprinodeleche2015\\_tcm7-439813.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosdelsectorovinoycaprinodeleche2015_tcm7-439813.pdf)
- MAPAMA, Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente, 2017g. Indicadores económicos del sector ovino y caprino. 2015. [http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosdelsectorovinoycaprino2015\\_tcm7-270866.pdf](http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicosdelsectorovinoycaprino2015_tcm7-270866.pdf)
- Moeller, R.B., Jr., 2001. Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991-1998). Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 13, 265-270.
- Moffat, M. A. Massie, A., Laing, A. G., Mackenzie, R. M., Robinson, H. G. Q fever in North-East Scotland. 1970. Lancet 2, 1025-20127.
- Mogollón, M.V., Anguita, M.P., Aguado, J.M., Tornos, P., Miró, J.M., Galvez-Acebal, J., Muñoz-Sanz, A., Farinas, M.C., Fernández-Guerrero, M., Vilacosta, I., Muñoz, P., Montejo-Baranda, J.M., Hidalgo-Tenorio, C., Falco, V., del Río, A., Arnaiz, A.M., San-Feliu, I., de Alarcón, A., Spanish Q fever endocarditis group, 2011. Q fever endocarditis in Spain. Clinical characteristics and outcome. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica 29, 109-116.
- Montejo-Baranda, M., Corral-Carranceja, J., Aguirre-Errasti, C., 1985. Q fever in the Basque Country: 1981-1984. Reviews of infectious diseases 7, 700-701.
- Montes, M., Cilla, G., Vicente, D., Nieto, V., Ercibengoa, M., Pérez-Trallero, E., 2006. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): a hyperendemic area of Q fever. Annals of the New York Academy of Sciences 1078, 129-132.
- Moore, J.D., Barr, B.C., Daft, B.M., O'Connor, M.T., 1991. Pathology and diagnosis of *Coxiella burnetii* infection in a goat herd. Veterinary pathology 28, 81-84.
- Moos, A., Hackstadt, T., 1987. Comparative virulence of intra and inter strain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. Infect Immun 55, 1144-1150.
- Moran, P.A., 1950. Notes on continuous stochastic phenomena. Biometrika 37, 17-23.
- Moreno, M., Font, B., Sanfeliu, I. et al., 1995. Neumonía por fiebre Q. In: VI Reunión Nacional de la SEIMC, Sitges, 42.
- 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, e67622.
- Morón, A., Jiménez, C., Gutiérrez, C. et al., 1992. Fiebre Q. Características clínicas y epidemiológicas en cincuenta casos. Atención Primaria 10, 987.
- Morovic, M., Babic Milutin, N., Grgic, D., Rode, O.D., 2009. Q fever in Dalmatia, Croatia. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15 Suppl 2, 181-182.
- Morroy, G., 2011. Q-Quest 1: A Study on costs, Complaints and Quality of Life of Q Fever Patients. The Netherlands.
- Morroy, G., Keijmel, S.P., Delsing, C.E., Bleijenberg, G., Langendam, M., Timen, A., Bleeker-Rovers, C.P., 2016. Fatigue following Acute Q-Fever: A systematic literature review. PLoS One 11, e0155884.
- Moya, M.S.; Orte, L.; de Teresa, E. et al., 1976. Endocarditis por fiebre Q postcomisurotomía mitral. Presentación de un caso. Rev Esp Cardiol 29, 453-458.
- Muema, J., Thumbi, S.M., Obonyo, M., Wanyoike, S., Nanyingi, M., Osoro, E., Bitek, A., Karanja, S., 2017. Seroprevalence and Factors Associated with *Coxiella burnetii* Infection in Small Ruminants in Baringo County, Kenya. Zoonoses and public health.
- Muleme, M., Stenos, J., Vincent, G., Campbell, A., Graves, S., Warner, S., Devlin, J.M., Nguyen, C., Stevenson, M.A., Wilks, C.R., Firestone, S.M., 2016. Bayesian validation of the indirect immunofluorescence assay and its superiority to the enzyme-linked immunosorbent assay and the complement fixation test for detecting antibodies against *Coxiella burnetii* in goat serum. Clin Vaccine Immunol 23, 507-514.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the

- polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1, 263-273.
- Muñoz-Sanz, A., Vera, A., Rodríguez-Vidigal, F.F., 2007. Q fever in Extremadura: an emerging infection. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 25, 230-234.
- Munster, J.M., Leenders, A.C., Hamilton, C.J., Meekelenkamp, J.C., Schneeberger, P.M., van der Hoek, W., Rietveld, A., de Vries, E., Stolk, R.P., Aarnoudse, J.G., Hak, E., 2013. Routine screening for *Coxiella burnetii* infection during pregnancy: a clustered randomised controlled trial during an outbreak, the Netherlands, 2010. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 18.
- Muñiz, J.A., Alayo, A., Arrazola, A. *et al.*, 1986. Fiebre Q en la Comunidad Autónoma Vasca (1981-84). *Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco*, 65-72.
- Muramatsu, Y., Hukuta, K., Satoh, S., Muramatsu, M., Nishimura, M., Nagahata, H., Ueno, H., Morita, C., Tamura, Y., 2006. Seroepidemiologic survey of *Coxiella burnetii* and attempt to detect *Coxiella* DNA in aged non-laying chickens in a prefecture of Japan where poultry farming prospers. *The Journal of veterinary medical science* 68, 1007-1008.
- Muramatsu, Y., Usaki, N., Thongchai, C., Kramomtong, I., Kriengsak, P., Tamura, Y., 2014. Seroepidemiologic survey in Thailand of *Coxiella burnetii* infection in cattle and chickens and presence in ticks attached to dairy cattle. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 45, 1167-1172.
- Murcia, J., Reus, S., Climent, V., Manso, M.I., López, I., Tello, A., 2002. [Acute myocardial failure in a young man: Q-fever myocarditis]. *Rev Esp Cardiol* 55, 875-877.
- Murphy, A.M., Field, P.R., 1970. The persistence of complement-fixing antibodies to Q-fever (*Coxiella burnetii*) after infection. *The Medical journal of Australia* 1, 1148-1150.
- Muskens, J., van, E.E., van, M.C., Bartels, C., Lam, T.J., 2011a. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet.Rec.* 168, 79.
- Muskens, J., van Maanen, C., Mars, M.H., 2011b. Dairy cows with metritis: *Coxiella burnetii* test results in uterine, blood and bulk milk samples. *Vet Microbiol* 147, 186-189.
- Muskens, J., Wouda, W., von Bannisseht-Wijsmuller, T., van Maanen, C., 2012. Prevalence of *Coxiella burnetii* infections in aborted fetuses and stillborn calves. *The Veterinary record* 170, 260.
- NABC National Agricultural Biosecurity Centre, Kansas State University, 2010. Q fever. <http://nabc.ksu.edu/content/factsheets/category/Q%20Fever>
- Naesens, R., Magerman, K., Gysens, I., Leenders, A., Meekelenkamp, J., Van Esbroeck, M., Coppens, G., Oris, E., Craeghs, J., Thoelen, I., Gabriels, P., Vandeveld, M., Forier, A.M., Waumans, L., Cartuyvels, R., 2012. Q fever across the Dutch border in Limburg province, Belgium. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 31, 2053-2055.
- Nakeel, M.J., Arimi, S.M., Kitala, P.K., Mdihiu, G., Njenga, J.M., Wabacha, J.K., 2016. A Sero-epidemiological Survey of Brucellosis, Q-Fever and Leptospirosis in Livestock and Humans and Associated Risk Factors in Kajiado County- Kenya. *Journal of Tropical Diseases & Public Health* 4.
- Natale, A., Bucci, G., Capello, K., Barberio, A., Tavella, A., Nardelli, S., Marangon, S., Ceglie, L., 2012. Old and new diagnostic approaches for Q fever diagnosis: correlation among serological (CFT, ELISA) and molecular analyses. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 35, 375-379.
- Natale, A., Busani, L., Comin, A., De Rui, S., Buffon, L., Nardelli, S., Marangon, S., Ceglie, L., 2009. First report of bovine Q-fever in north-eastern Italy: preliminary results. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 2, 144-145.
- Nebreda, T., Contreras, E., Merino, F., Doderó, E., Campos, A., 2001. [Outbreak of Q fever and seroprevalence in a rural population from Soria Province]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 19, 57-60.
- Nelder, M.P., Lloyd, J.E., Loftis, A.D., Reeves, W.K., 2008. *Coxiella burnetii* in wild-caught filth flies. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1002-1004.
- Nett, R.J., Book, E., Anderson, A.D., 2012. Q Fever with unusual exposure history: a classic presentation of a commonly misdiagnosed disease. *Case reports in infectious diseases* 2012, 916142.
- Nguyen, S.V., Hirai, K., 1999. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS microbiology letters* 180, 249-254.
- Nielsen, K.T., Nielsen, S.S., Agger, J.F., Christoffersen, A.B., Agerholm, J.S., 2011. Association between antibodies to *Coxiella burnetii* in bulk tank milk and

- perinatal mortality of Danish dairy calves. *Acta veterinaria Scandinavica* 53, 64.
- Nielsen, S.Y., Molbak, K., Nybo Andersen, A.M., Brink Henriksen, T., Kantso, B., Krogfelt, K.A., Hjollund, N.H., 2013. Prevalence of *Coxiella burnetii* in women exposed to livestock animals, Denmark, 1996 to 2002. *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 18.
- Niemczuk, K., Szymanska-Czerwinska, M., Smietanka, K., Bocian, L., 2014. Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. *Vet Microbiol* 171, 147-152.
- Njeru, J., Henning, K., Pletz, M.W., Heller, R., Neubauer, H., 2016. Q fever is an old and neglected zoonotic disease in Kenya: a systematic review. *BMC public health* 16, 297.
- Nocker, A., Camper, A.K., 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Applied and environmental microbiology* 72, 1997-2004.
- Nogareda, C., Jubert, A., Kantzoura, V., Kouam, M.K., Feidas, H., Theodoropoulos, G., 2013. Geographical distribution modelling for *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii* infections in dairy cattle farms in northeastern Spain. *Epidemiol Infect* 141, 81-90.
- Nourse, C., Allworth, A., Jones, A., Horvath, R., McCormack, J., Bartlett, J., Hayes, D., Robson, J.M., 2004. Three cases of Q fever osteomyelitis in children and a review of the literature. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39, e61-66.
- Nuño-Mateo, F.J., Noval-Menéndez, J., Campoamor-Serrano, M.T., del Valle-Prieto, A., 2002. [Acute Q fever in Asturias]. *Revista clínica española* 202, 572-573.
- Nusinovici, S., Frossling, J., Widgren, S., Beaudreau, F., Lindberg, A., 2015a. Q fever infection in dairy cattle herds: increased risk with high wind speed and low precipitation. *Epidemiol Infect* 143, 3316-3326.
- Nusinovici, S., Hoch, T., Brahim, M.L., Joly, A., Beaudreau, F., 2015b. The Effect of Wind on *Coxiella burnetii* Transmission Between Cattle Herds: a Mechanistic Approach. *Transbound Emerg Dis*.
- Nusinovici, S., Hoch, T., Widgren, S., Joly, A., Lindberg, A., Beaudreau, F., 2014. Relative contributions of neighbourhood and animal movements to *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle herds. *Geospat Health* 8, 471-477.
- Nusinovici, S., Madouasse, A., Hoch, T., Guatteo, R., Beaudreau, F., 2015c. Evaluation of two PCR tests for *Coxiella burnetii* detection in dairy cattle farms using latent class analysis. *PLoS One* 10, e0144608.
- O'Connor, B.A., Tribe, I.G., Givney, R., 2015. A windy day in a sheep saleyard: an outbreak of Q fever in rural South Australia. *Epidemiol Infect* 143, 391-398.
- O'Neill, T.J., Sargeant, J.M., Poljak, Z., 2014. A systematic review and meta-analysis of phase I inactivated vaccines to reduce shedding of *Coxiella burnetii* from sheep and goats from routes of public health importance. *Zoonoses and public health* 61, 519-533.
- Obaidat, M.M., 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*, 561-566.
- Ogata, H., Audic, S., Renesto-Audiffren, P., Fournier, P.E., Barbe, V., Samson, D., Roux, V., Cossart, P., Weissenbach, J., Claverie, J.M., Raoult, D., 2001. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. *Science* 293, 2093-2098.
- Ohlson, A., Malmsten, J., Frossling, J., Bolske, G., Aspan, A., Dalin, A.M., Lindberg, A., 2014. Surveys on *Coxiella burnetii* infections in Swedish cattle, sheep, goats and moose. *Acta veterinaria Scandinavica* 56, 39.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2017. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2017.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. 2016. Fiebre Q, In: Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2016.
- Omsland, A., 2012. Axenic growth of *Coxiella burnetii*. *Advances in experimental medicine and biology* 984, 215-229.
- Omsland, A., Cockrell, D.C., Howe, D., Fischer, E.R., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Heinzen, R.A., 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4430-4434.
- Ongor, H., Cetinkaya, B., Karahan, M., Acik, M.N., Bulut, H., Muz, A., 2004. Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *The Veterinary record* 154, 570-572.
- Openshaw, S., 1983. The modifiable areal unit problem. *Geo Abstracts University of East Anglia*.
- 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. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 498-501.
- Ortega-Mora, L.M., 2012. Is Q fever a significant cause of reproductive failure in cattle? *The Veterinary record* 170, 257-258.
- Ortiz de Lejarazu, R., Tornel, J., Onrubia, C., *et al.* 1983. Anticuerpos fijadores del

- complemento frente a *Coxiella burnetii* en diversos grupos de población. Estudio de 290 sueros seleccionados clínicamente. In: IX Congreso de la Sociedad Española de Microbiología, Valladolid 393-394.
- Oteo, J.A.; Estrada, A. *et al.* 1991. Prevalencia de *Coxiella burnetii* (fiebre Q) en 3.154 garrapatas (*Ixodoidea*) del Valle del Ebro. In: IV Reunión Nacional de la SEIMC, Santiago de Compostela, 663-665.
- Otero, M., Gil, J., Rodríguez, C., de la Vega, A., Machado, C., Pedromingo, M., Tolmos, M., Navarro, E. 2016. Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de una serie de casos de fiebre Q entre 2010 y 2014 en la provincia de Ávila. In: XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI). Enfermedades infecciosas.
- Oyston, P.C.F., Davies, C., 2011. Q fever: the neglected biothreat agent. *Journal of Medical Microbiology* 60, 9-21.
- Ozdemir, H., Can, R. Sezen, Y., Gulcu, H.B., Kalender, H., Basbug, O., 1999. Prevalence of Q fever in sheep in Elazig province and its treatment. *Firat Univ. J. Health Sci.* 24, 30-61.
- Pacheco, R.C., Echaide, I.E., Alves, R.N., Beletti, M.E., Nava, S., Labruna, M.B., 2013. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. *Emerg Infect Dis* 19, 344-346.
- Paiba, G.A., Green, L.E., Lloyd, G., Patel, D., Morgan, K.L., 1999. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk in England and Wales. *The Veterinary record* 144, 519-522.
- Paiba, G.A., Green, L.E., Bewley, K., Webster, G.J., Green, L.E., Morgan, K.L. 1999. An investigation of *Coxiella burnetii* infection at calving within a herd of dairy cows in England using PCR, In: Elsevier (Ed.) *Rickettsiae and Rickettsia diseases at the turn of the third millennium*. Paris, France, 387-392.
- Palau, L., López, O., Cour, M.I., González, M.C., Cuevas, L., García, M.C., 1989. *Coxiella burnetii*: serologic study on bovine from the community of Madrid. *Rev. Sanid. Hig. Pública*, 43-46.
- Palenzuela M.S., Ortiz de Lejarazu, R., Orduña, A. 1991. Prevalencia de infecciones por *Coxiella burnetii* y su relación con la infección con la infección por *Brucella* en Valladolid. In: IV Reunión Nacional de la SEIMC., Santiago de Compostela 695-699.
- 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*. *The Canadian veterinary journal= La revue veterinaire canadienne* 24, 60-61.
- Palosuo, T., Leinikki, P., Petterson, T., Saikku, P., Jantti, V., 1974. Hazards of expanding tourism: report of six cases of Q fever in Finland. *Scandinavian journal of infectious diseases* 6, 173-176.
- Pan, L., Zhang, L., Fan, D., Zhang, X., Liu, H., Lu, Q., Xu, Q., 2013. Rapid, simple and sensitive detection of Q fever by loop-mediated isothermal amplification of the htpAB gene. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2231.
- Panaiotov, S., Ciccozzi, M., Brankova, N., Levterova, V., Mitova-Tiholova, M., Amicosante, M., Rezza, G., Kantardjiev, T., 2009. An outbreak of Q fever in Bulgaria. *Ann Ist Super Sanita* 45, 83-86.
- 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. *Veterinary research* 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. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 2, 146-147.
- Parisi, A., Fraccalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Capuano, F., Sottili, R., 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Vet Microbiol* 118, 101-106.
- Parkhill, J., Wren, B.W., Thomson, N.R., Titball, R.W., Holden, M.T., Prentice, M.B., Sebahia, M., James, K.D., Churcher, C., Mungall, K.L., Baker, S., Basham, D., Bentley, S.D., Brooks, K., Cerdeno-Tarraga, A.M., Chillingworth, T., Cronin, A., Davies, R.M., Davis, P., Dougan, G., Feltwell, T., Hamlin, N., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A.V., Leather, S., Moule, S., Oyston, P.C., Quail, M., Rutherford, K., Simmonds, M., Skelton, J., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* 413, 523-527.
- Pascual-Velasco, F., Carrascosa-Porras, M., Martínez-Bernal, M.A., Jado-García, I., 2007. [Q fever following a tick bite]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 25, 360.
- Pascual-Velasco, F., Montes, M., Marimón, J.M., Cilla, G., 1998. High seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in Eastern Cantabria (Spain). *Int.J.Epidemiol.* 27, 142-145.
- Pascual-Velasco, F. 1994. Estudio epidemiológico de la fiebre Q en la isla de Lanzarote (Canarias). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Tesis Doctoral.

- Pascual-Velasco, F. 1996. Fiebre Q. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social.
- Pascual-Velasco, F., Rodríguez-Pérez, J.C., Otero-Ferrío, I., *et al.*, 1992. Seroprevalencia de la fiebre Q en la población natural adulta de Lanzarote (Islas Canarias). *An Med Intern (Madrid)* 9, 428-432.
- Paul, S., Agger, J.F., Agerholm, J.S., Markussen, B., 2014. Prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* seropositivity in Danish beef and dairy cattle at slaughter adjusted for test uncertainty. *Preventive veterinary medicine* 113, 504-511.
- Paul, S., Agger, J.F., Markussen, B., Christoffersen, A.B., Agerholm, J.S., 2012. Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive veterinary medicine* 107, 57-64.
- Paul, S., Toft, N., Agerholm, J.S., Christoffersen, A.B., Agger, J.F., 2013. Bayesian estimation of sensitivity and specificity of *Coxiella burnetii* antibody ELISA tests in bovine blood and milk. *Preventive veterinary medicine* 109, 258-263.
- Peacock, M.G., Philip, R.N., Williams, J.C., Faulkner, R.S., 1983. Serological evaluation of Q fever in humans: enhanced phase I titers of immunoglobulins G and A are diagnostic for Q fever endocarditis. *Infect Immun* 41, 1089-1098.
- Pearson, T., Hornstra, H.M., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Olivas, S.M., Birdsell, D.M., Hall, C.M., German, S., Cook, J.M., Seymour, M.L., Priestley, R.A., Kondas, A.V., Clark Friedman, C.L., Price, E.P., Schupp, J.M., Liu, C.M., Price, L.B., Massung, R.F., Kersh, G.J., Keim, P., 2014. High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. *BMC Microbiol* 14, 41.
- Pérez-Trallero, E., Cilla, G., Montes, M., Saenz-Dominguez, J.R., Alcorta, M., 1995. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection among slaughterhouse workers in northern Spain. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 14, 71-73.
- Pérez, A., Alkhamis, M., Carlsson, U., Brito, B., Carrasco-Medanic, R., Whedbee, Z., Willeberg, P., 2011. Global animal disease surveillance. *Spat Spatiotemporal Epidemiol* 2, 135-145.
- Pérez, A.M., 2015. Past, Present, and Future of Veterinary Epidemiology and Economics: One Health, Many Challenges, No Silver Bullets. *Front Vet Sci* 2, 60.
- Pérez-Gallardo F, C.G., Hernández-Fernández S., 1949. Hallazgo en España de la *Rickettsia burnetii*, agente etiológico de la Fiebre Q. *Rev San Hig Pub.* 23, 489-496.
- Pérez-Gallardo F, C.G., Hernández-Fernández S., 1952. Investigaciones sobre la epidemiología de la fiebre Q en España. Los conejos de monte y los lirones como reservorios de la *Coxiella burnetii*. *Rev San Hig Pub.* 26, 81-87.
- Perugini, A.G., Capuano, F., Esposito, A., Marianelli, C., Martucciello, A., Iovane, G., Galiero, G., 2009. Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report. *Research in veterinary science* 87, 189-191.
- Peter, O., Dupuis, G., Burgdorfer, W., Peacock, M., 1985. Evaluation of the complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the early diagnosis of primary Q fever. *Eur J Clin Microbiol* 4, 394-396.
- Pfeiffer, D.U., Stevens, K.B., 2015. Spatial and temporal epidemiological analysis in the Big Data era. *Preventive veterinary medicine* 122, 213-220.
- Philip, C.B., 1948a. Comments on the name of the Q fever organism *Public Health Rep* 63, 58-59.
- Philip, C.B., 1948b. Observations on experimental Q fever. *The Journal of parasitology* 34, 457-464.
- Pijjerro, A., Vera, A., Garduño, E. *et al.* 1995. Fiebre Q en el área de Badajoz. In: VI Reunión Nacional de la SEIMC, Sitges 41.
- Pimenta, L., Alegria, N., Anastacio, S., Sidi-Boumedine, K., da Silva, G., Rabico, A., Simoes, J., 2015. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Portuguese dairy cattle herds. *Tropical animal health and production* 47, 227-230.
- 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. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 31, 231-235.
- Piñero, A., Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2014a. Progression of *Coxiella burnetii* infection after implementing a two-year vaccination program in a naturally infected dairy cattle herd. *Acta veterinaria Scandinavica* 56, 47.
- Piñero, A., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Barandika, J.F., Atxaerandio, R., García-Pérez, A.L., 2014b. 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. *Journal of dairy science* 97, 2718-2730.
- Pinsky, R.L., Fishbein, D.B., Greene, C.R., Gensheimer, K.F., 1991. An outbreak of cat-associated Q fever in the United States. *The Journal of infectious diseases* 164, 202-204.

- Plagemann, O., 1989. [The most frequent infectious causes of abortion in sheep in north Bavaria with special reference to Chlamydia and Salmonella infections]. Tierärztliche Praxis 17, 145-148.
- Plommet, M., Capponi, M., Gestin, J., 1973. Experimental Q fever in cattle. Ann Rech Vet J 4, 325-346.
- Portal de Salud de Castilla y León, 2017. Informes Epidemiológicos de Castilla y León. <http://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/inf-epidemiologicos>
- Porten, K., Rissland, J., Tigges, A., Broll, S., Hopp, W., Lunemann, M., van Treeck, U., Kimmig, P., Brockmann, S.O., Wagner-Wiening, C., Hellenbrand, W., Buchholz, U., 2006. A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. BMC infectious diseases 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.
- Prada J, G.B., Llorente A., 1950. Primer caso de fiebre Q humana en España. Gaceta Médica Española 24, 332-333.
- Prats, G., Gurgui, M., Ausina, V., Franco, M., Verger G., 1982. Infección por *Coxiella burnetii*. A propósito de 10 casos. Med Clin (Barcelona) 79, 155-159.
- Prigent, M., Rousset, E., Yang, E., Thiery, R., Sidi-Boumedine, K., 2015. Validation study for using lab-on-chip technology for *Coxiella burnetii* multi-locus-VNTR-analysis (MLVA) typing: application for studying genotypic diversity of strains from domestic ruminants in France. Microbes Infect 17, 782-788.
- Pritchard, G.C., Smith, R.P., Errington, J., Hannon, S., Jones, R.M., Mearns, R., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* in livestock abortion material using PCR. The Veterinary record 169, 391.
- ProMED mail post., 2016. Q fever - Netherlands: human, 2007 - 2015, fatalities.
- Psaroulaki, A., Chochlakakis, D., Angelakis, E., Ioannou, I., Tselentis, Y., 2014. *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 108, 625-631.
- Psaroulaki, A., Hadjichristodoulou, C., Loukaides, F., Soteriades, E., Konstantinidis, A., Papastergiou, P., Ioannidou, M.C., Tselentis, Y., 2006. Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 25, 576-586.
- Puras, A., Alguacil, A. Colina, F., 1984. Fiebre Q. Presentación de 8 casos. Rev Clin Esp 174, 163-166.
- Quijada, S.G., Teran, B.M., Murias, P.S., Anitua, A.A., Cermeno, J.L., Frías, A.B., 2012. Q fever and spontaneous abortion. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 18, 533-538.
- R development core team, 2011. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria).
- R development core team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria).
- Rady, M., Glavits, R., Nagy, G., 1985. Demonstration in Hungary of Q fever associated with abortions in cattle and sheep. Acta veterinaria Hungarica 33, 169-176.
- Raele, D.A., Garofolo, G., Galante, D., Cafiero, M.A., 2015. Molecular detection of *Coxiella burnetii* using an alternative loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP). Vet Ital 51, 73-78.
- Rahimi, E., Ameri, M., Karim, G., Doosti, A., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, caprine, and camel herds in Iran as determined by polymerase chain reaction. Foodborne pathogens and disease 8, 307-310.
- 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 and public health 57, e38-41.
- Rahman, M.A., Alam, M.M., Islam, M.A., Bhuiyan, A.K., Rahman, A.K., 2016. Serological and molecular evidence of Q fever in domestic ruminants in Bangladesh. Vet Med Int 2016, 9098416.
- Ransom, S.E., Huebner, R.J., 1951. Studies on the resistance of *Coxiella burnetii* to physical and chemical agents. American journal of hygiene 53, 110-119.
- Raoult, D., 2010. Q fever, free amoeba, and air conditioning. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 51, 869-870.
- Raoult, D., Laurent, J.C., Mutilod, M., 1994. Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. Am J Clin Pathol 101, 318-320.
- Raoult, D., Marrie, T., Mege, J., 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. The Lancet. Infectious diseases 5, 219-226.
- Raoult, D., Million, M., Thuny, F., Carrieri, P., 2011. Chronic Q fever detection in the Netherlands. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 53, 1170-1171.
- Raoult, D., Stein, A., 1994. Q fever during pregnancy--a risk for women, fetuses,

- and obstetricians. The New England journal of medicine 330, 371.
- Raoult, D., Tissot-Dupont, H., Foucault, C., Gouvernet, J., Fournier, P.E., Bernit, E., Stein, A., Nesri, M., Harle, J.R., Weiller, P.J., 2000. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine* 79, 109-123.
- Raska, K., Syrucek, L., 1956. Q fever in domestic and wild birds. *Bulletin of the World Health Organization* 15, 329-337.
- Ratmanov, P., Mediannikov, O., Raoult, D., 2013. Vectorborne diseases in West Africa: geographic distribution and geospatial characteristics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 107, 273-284.
- Raya-Cruz, M., Gallego-Lezaun, C., García-Gasalla, M., Cifuentes-Luna, C., Forteza-Forteza, T., Fernández-Baca, V., Gallegos-Álvarez, C., Payeras-Cifre, A., 2014. [Symptomatic acute Q fever: a series of 87 cases in an area of Mallorca]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 32, 213-218.
- Reeves, W.K., Loftis, A.D., Sanders, F., Spinks, M.D., Wills, W., Denison, A.M., Dasch, G.A., 2006. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: *Argasidae*) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. *Exp Appl Acarol* 39, 321-329.
- Reid, A., Malone, J., 2004. Q fever in Ireland. A seroprevalence study of exposure to *Coxiella burnetii* among Department of Agriculture workers. *Occup Med (Lond)* 54, 544-547.
- Reinthal, F.F., Mascher, F., Sixl, W., Arbesser, C.H., 1988. Incidence of Q fever among cattle, sheep and goats in the Upper Nile province in southern Sudan. *The Veterinary record* 122, 137.
- Rhode, C., Kelly, P.J., Raoult, D., 1993. Dairy cows as reservoirs of *Coxiella burnetii* in Zimbabwe. *Cent Afr J Med* 39, 208-210.
- Richardus, J.H., Dumas, A.M., Huisman, J., Schaap, G.J., 1985. Q fever in infancy: a review of 18 cases. *Pediatr Infect Dis* 4, 369-373.
- Ríos-Martin, d.l., Sanz-Moreno, J.C., Martín-Martínez, F., Tebar-Betegon, M.A., Cortes-García, M., Escudero-Nieto, R., 2006. Q fever outbreak in an urban area following a school-farm visit. *Med.Clin.(Barc.)* 126, 573-575.
- 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. *Preventive veterinary medicine* 130, 10-17.
- Robbins, F.C., Gauld, R.L., Warner, F.B., 1946. Q fever in the Mediterranean area; report of its occurrence in Allied troops; epidemiology. *American journal of hygiene* 44, 23-50.
- Robson, A.O., Shimmin, C.D., 1959. Chronic Q fever. I. Clinical aspects of a patient with endocarditis. *British medical journal* 2, 980-983.
- Rodolakis, A., 2006. Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small Ruminant Research* 62, 121-124.
- Rodolakis, A., 2009. Q Fever in dairy animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1166, 90-93.
- Rodolakis, A., 2010. Q fever in France. In: Q fever conference, Breda, The Netherlands.
- Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natorp, J.C., Vadet, J.P., rricau-Bouvery, N., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J.Dairy Sci.* 90, 5352-5360.
- Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J., 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Veterinary research* 29, 275-288.
- Rodríguez-Ferri, E.F., et al., 2017. Tularemia. Una aproximación a su estudio integral en Castilla y León. *Junta de Castilla y León, Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León.*
- Rodríguez, N.F., Carranza, C., Bolaños, M., Pérez-Arellano, J.L., Gutiérrez, C., 2010a. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Gran Canaria Island, Spain. *Transbound Emerg Dis* 57, 66-67.
- Rodríguez, N.F., Carranza, C., Bolaños, M., Pérez-Arellano, J.L., Gutiérrez, C., 2010b. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Gran Canaria Island, Spain. *Transbound.Emerg.Dis.* 57, 66-67.
- Roest, H.I., Bossers, A., Rebel, J.M., 2013a. Q fever diagnosis and control in domestic ruminants. *Dev Biol (Basel)* 135, 183-189.
- Roest, H.I., Bossers, A., van Zijderveld, F.G., Rebel, J.M., 2013b. Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *The Veterinary quarterly* 33, 148-160.
- Roest, H.I., Post, J., van Gelderen, B., van Zijderveld, F.G., Rebel, J.M., 2013c. Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. *Veterinary research* 44, 67.
- Roest, H.I., Ruuls, R.C., Tilburg, J.J., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H., Vellema, P., van den Brom, R., Dercksen, D., Wouda, W., Spierenburg, M.A., van der Spek, A.N., Buijs, R., de Boer, A.G., Willemsen, P.T., van Zijderveld, F.G., 2011a. Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17, 668-675.

- Roest, H.I., Tilburg, J.J., van der Hoek, W., Vellema, P., van Zijderveld, F.G., Klaassen, C.H., Raoult, D., 2011b. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol Infect* 139, 1-12.
- Roest, H.J., van Gelderen, B., Dinkla, A., Frangoulidis, D., van Zijderveld, F., Rebel, J., van Keulen, L., 2012. Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 7, e48949.
- Roest, H.J., van Steenberghe, J., Wijkmans, C., van Duijnhoven, Y.T., Stenvers, O., Oomen, T., Vellema, P., 2009. Q-fever in the Netherlands in 2008 and the forecast for 2009. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 134, 300-303.
- Rolain, J.M., Boulou, A., Mallet, M.N., Raoult, D., 2005a. Correlation between ratio of serum doxycycline concentration to MIC and rapid decline of antibody levels during treatment of Q fever endocarditis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49, 2673-2676.
- Rolain, J.M., Gouriet, F., Brouqui, P., Larrey, D., Janbon, F., Vene, S., Jarnestrom, V., Raoult, D., 2005b. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 40, 82-88.
- Rolain, J.M., Raoult, D., 2005. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. *QJM* 98, 615-617; author reply 617-620.
- Romero-Jiménez, M.J., Suárez-Lozano, I., Fajardo, J.M., Benavente, A., Menchero, A., de la Iglesia, A., 2003. [Hepatitis as unique manifestation of Q fever: clinical and epidemiologic characteristics in 109 patients]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 21, 193-195.
- Rose, M., Wemheuer, W., Schmidt, F.W., 1994. [Follow-up studies of the detection of IgG1 antibodies to *Coxiella burnetii* in blood and milk from cattle in relation to the reproductive cycle and milk production]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 101, 484-486.
- Rossow, H., Forbes, K.M., Tarkka, E., Kinnunen, P.M., Hemmila, H., Huitu, O., Nikkari, S., Henttonen, H., Kipar, A., Vapalahti, O., 2014. Experimental infection of voles with *Francisella tularensis* indicates their amplification role in tularemia outbreaks. *PLoS One* 9, e108864.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., 2009a. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 428-433.
- Rousset, E., Durand, B., Berri, M., Dufour, P., Prigent, M., Russo, P., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., Aubert, M., 2007. Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.* 124, 286-297.
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M., Gasnier, T., Duquesne, V., Thiery, R., Aubert, M.F., 2009b. Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 2, 188-189.
- Rowbotham, T.J., 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of clinical pathology* 33, 1179-1183.
- Ruiz-Beltrán, R., Herrero-Herrero, J.I., Martín-Sánchez, A.M., Martín-González, J.A., 1990. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia typhi* in Salamanca Province (Spain). *Serosurvey in the human population. Eur J Epidemiol* 6, 293-299.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. *BMC. Vet. Res.* 6, 3.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2011. Measuring antibody levels in bulk-tank milk as an epidemiological tool to search for the status of *Coxiella burnetii* in dairy sheep. *Epidemiol Infect* 139, 1631-1636.
- Ruiz-Fons, F., González-Barrio, D., Aguilar-Ríos, F., Soler, A.J., Garde, J.J., Gortazar, C., Fernández-Santos Mdel, R., 2014. Infectious pathogens potentially transmitted by semen of the black variety of the Manchega sheep breed: Health constraints for conservation purposes. *Animal reproduction science* 149, 152-157.
- Ruiz-Fons, F., Rodríguez, O., Torina, A., Naranjo, V., Gortazar, C., de la, F.J., 2008. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet. Microbiol.* 126, 282-286.
- Ruiz, A., Muñoz, J., Agud, J. M. *et al.*, 1985. Fiebre Q en Álava: estudio epidemiológico de un brote. *An Med Intern (Madrid)* 2, 217-223.
- Ruiz-Seco, M.P., López-Rodríguez, M., Estebanez-Muñoz, M., Pagan, B., Gómez-Cerezo, J.F., Barbado-Hernandez, F.J., 2011. [Q fever: 54 new cases from a tertiary hospital in Madrid]. *Revista clínica española* 211, 240-244.
- Ruiz-Téllez A, M.S.J., Agud-Aparicio JM *et al.*, 1985a. Fiebre Q en Alava: estudio clínico de un brote epidémico (primera de dos



- partes). *An Med Intern (Madrid)* 2, 104-108.
- Ruiz-Téllez A, M.S.J., Agud-Aparicio JM *et al.*, 1985b. Fiebre Q en Alava: estudio epidemiológico de un brote (segunda de dos partes). *An Med Intern (Madrid)* 2, 217-223.
- Runge, M., Binder, A., Schotte, U., Ganter, M., 2012. Investigations concerning the prevalence of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* in sheep in correlation with management systems and abortion rate in Lower Saxony in 2004. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 125, 138-143.
- Ruppanner, R., Brooks, D., Franti, C.E., Behymer, D.E., Morrish, D., Spinelli, J., 1982. Q fever hazards from sheep and goats used in research. *Archives of environmental health* 37, 103-110.
- Ruppanner, R., Riemann, H.P., Farver, T.B., West, G., Behymer, D.E., Wijayasinghe, C., 1978. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) and *Toxoplasma gondii* among dairy goats in California. *American journal of veterinary research* 39, 867-870.
- Ryan, E., Kirby, M., Clegg, T., Collins, D.M., 2011a. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and goats in the Republic of Ireland. *The Veterinary record* 169, 280.
- Ryan, E.D., Kirby, M., Collins, D.M., Sayers, R., Mee, J.F., Clegg, T., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiol.Infect.*, 1-5.
- Ryan, E.D., Kirby, M., Collins, D.M., Sayers, R., Mee, J.F., Clegg, T., 2011b. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiol Infect* 139, 1413-1417.
- Sadecky, E., Brezina, R., 1977. Vaccination of naturally infected ewes against Q-fever. *Acta virologica* 21, 89.
- Sadecky, E., Brezina, R., Kazar, J., Urvolgyi, J., 1975. Immunization against Q-fever of naturally infected dairy cows. *Acta virologica* 19, 486-488.
- Saegerman, C., Dal Pozzo, F., González, M., Mezo, M. 2016. Bayesian assessment of an indirect ELISA for the detection of *Coxiella burnetii* antibodies in bovine sera and milk. In *Current findings in Q fever Symposium (CODA-CERVA Veterinary and Agrochemical Research Center, Bruselas)*.
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Dal Pozzo, F., Czaplicki, G., 2015. Clinical indicators of exposure to *Coxiella burnetii* in dairy herds. *Transbound Emerg Dis* 62, 46-54.
- Sáez de Ocariz, e.a. 1987. Informe Técnico nº 5, Servicio de Publicaciones del DAPA del Gobierno Vasco.
- Saiti, I., Dukoska, V., Balla, F., Berxholi, K., 2014. Preliminary Data for the Presence of Q-Fever in Animals in Some of the Regions of Western Macedonia. *J. Int. Environmental Application & Science*, 9, 107-110.
- Salinas-Meléndez, J.A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., Fimbres-Durazo, H., Hernández-Vidal, G., 2002. Serologic survey in animals of 'Q' fever in Nuevo Leon. *Rev Latinoam Microbiol* 44, 75-78.
- Salmon, M.M., Howells, B., Glencross, E.J., Evans, A.D., Palmer, S.R., 1982. Q fever in an urban area. *Lancet* 1, 1002-1004.
- Sampere, M., Font, B., Font, J., Sanfeliu, I., Segura, F., 2003. Q fever in adults: review of 66 clinical cases. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 22, 108-110.
- Samuel, J.E., Frazier, M.E., Kahn, M.L., Thomashow, L.S., Mallavia, L.P., 1983. Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 41, 488-493.
- Sánchez, J., Souriau, A., Buendía, A.J., Arricau-Bouvery, N., Martínez, C.M., Salinas, J., Rodolakis, A., Navarro, J.A., 2006. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *J Comp Pathol* 135, 108-115.
- Sandoz, K.M., Beare, P.A., Cockrell, D.C., Heinzen, R.A., 2016a. Complementation of arginine auxotrophy for genetic transformation of *Coxiella burnetii* by use of a defined axenic medium. *Applied and environmental microbiology* 82, 3042-3051.
- Sandoz, K.M., Sturdevant, D.E., Hansen, B., Heinzen, R.A., 2014. Developmental transitions of *Coxiella burnetii* grown in axenic media. *J Microbiol Methods* 96, 104-110.
- Sanford, S.E., Josephson, G.K., MacDonald, A., 1994. *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. *The Canadian veterinary journal= La revue veterinaire canadienne* 35, 376-378.
- Santana, O.E., Cañas, F., Martín, A.M., 1995. Fiebre Q en el Hospital Insular de Gran Canaria 1993-1995. Libro de Comunicaciones. In: VI Reunión Nacional de la SEIMC, Sitges, 43.
- Santiago-Moreno, J., Carvajal, A., Astorga, R.J., Coloma, M.A., Toledano-Díaz, A., Gómez-Guillamón, F., Salas-Vega, R., López-Sebastián, A., 2011. Potential impact of diseases transmissible by sperm on the establishment of Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) genome resource banks. *Eur J Wildl Res.* 57, 211-216.
- 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, 159-160.
- Sanz, M., Pérez, M.; Verde, M.T., Ramos, J.J., Sáez, T., Fernández, A. 1994. Seroprevalencia de fiebre Q en ganado

- ovino de Zaragoza capital y ribera del Ebro adyacente, In: Universidad de Castilla la Mancha (Ed.) XVIII Jornadas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Murcia.
- Sanzo, J.M., García-Calabuig, M.A., Audicana, A., Dehesa, V., 1993. Q fever: prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in the Basque country. *International journal of epidemiology* 22, 1183-1188.
- Saz, J.V., Bacellar, F., Merino, F.J., Filipe, A., 1993. [Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia conorii* infection in the province of Soria]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* 11, 469-473.
- Scolamacchia, F., Handel, I.G., Fevre, E.M., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvort, B.M., 2010. Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. *PLoS One* 5, e8623.
- Scott, G.H., Williams, J.C., 1990. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Annals of the New York Academy of Sciences* 590, 291-296.
- Scott, G.H., Williams, J.C., Stephenson, E.H., 1987. Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol* 133, 691-700.
- Scrimgeour, E.M., Al-Ismaïly, S.I., Rolain, J.M., Al-Dhahry, S.H., El-Khatim, H.S., Raoult, D., 2003. Q Fever in human and livestock populations in Oman. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990, 221-225.
- Schling, 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. *Preventive veterinary medicine* 61, 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 Environ Health* 216, 698-702.
- Schimmer, B., de Lange, M.M., Hautvast, J.L., Vellema, P., van Duynhoven, Y.T., 2014. *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors on commercial sheep farms in The Netherlands. *The Veterinary record* 175, 17.
- Schimmer, B., Luttikholt, S., Hautvast, J.L., Graat, E.A., Vellema, P., van 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., ter, S.R., Wegdam, M., Zuchner, L., de, B.A., Schneeberger, P.M., Veenstra, T., Vellema, P., van der, H.W., 2010. The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infect Dis* 10, 69.
- Schmeer, N., 1985. [Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the demonstration of IgG1, IgG2 and IgM antibodies in bovine Q fever infection]. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 259, 20-34.
- Schmeer, N., Muller, P., Langel, J., Krauss, H., Frost, J.W., Wieda, J., 1987. Q fever vaccines for animals. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 267, 79-88.
- 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. *Medecine et maladies infectieuses* 44, 339-353.
- Schoffelen, T., Herremans, T., Sprong, T., Nabuurs-Franssen, M., van der Meer, J.W., Joosten, L.A., Netea, M.G., Bijlmer, H.A., van Deuren, M., 2014. Immunogenicity of the Q fever skin test. *J Infect* 69, 161-164.
- Schulz, J., Runge, M., Schröder, C., Ganter, M., Hartung, J., 2005. [Detection of *Coxiella burnetii* in the air of a sheep barn during shearing]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 112, 470-472.
- Schulze, L.S., Borchardt, S., Ouellet, V., Heuwieser, W., 2016. Effect of a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine on body temperature and milk yield in dairy cows. *Journal of dairy science* 99, 541-550.
- Schwabe, C., 1984. *Veterinary Medicine and Human Health*, 3rd ed Edition Baltimore, USA.
- Sekeyova, Z., Roux, V., Raoult, D., 1999. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by com1 and mucZ sequence comparison. *FEMS microbiology letters* 180, 61-67.
- Sellens, E., Norris, J.M., Dhondt, N.K., Heller, J., Hayes, L., Gidding, H.F., Willaby, H., Wood, N., Bosward, K.L., 2016. Q Fever knowledge, attitudes and vaccination status of Australia's veterinary workforce in 2014. *PLoS One* 11, e0146819.
- Seo, M.G., Ouh, I.O., Lee, S.H., Kwak, D., 2016. Detection and genotyping of *Coxiella burnetii* in pigs, South Korea, 2014-2015. *Emerg Infect Dis* 22, 2192-2195.
- Serbezov, V.S., Kazar, J., Novkirishki, V., Gatcheva, N., Kovacova, E., Voynova, V., 1999. Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg Infect Dis* 5, 388-394.
- Seshadri, R., Hendrix, L.R., Samuel, J.E., 1999. Differential expression of translational elements by life cycle variants of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 67, 6026-6033.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., Deboy, R.T., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Madupu, R., Dodson, R.J., Khouri, H.M., Lee, K.H., Carty, H.A., Scanlan, D., Heinzen, R.A., Thompson, H.A., Samuel, J.E., Fraser, C.M.,

- Heidelberg, J.F., 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 5455-5460.
- Sesma-Sánchez, P., 1990. *Coxiella burnetii* y neumonía comunitaria. Estudio de la seroprevalencia de anticuerpos a *Coxiella burnetii* en la comarca del Ferrol y su relación con la etiología de las neumonías adquiridas en el medio extrahospitalario. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis Doctoral.
- Setiyono, A., Ogawa, M., Cai, Y., Shiga, S., Kishimoto, T., Kurane, I., 2005. New criteria for immunofluorescence assay for Q fever diagnosis in Japan. J Clin Microbiol 43, 5555-5559.
- Shabbir, M.Z., Akram, S., Hassan, Z.U., Hanif, K., Rabbani, M., Muhammad, J., Chaudhary, M.H., Abbas, T., Ghori, M.T., Rashid, H., Jamil, T., Islam, Z.U., Rasool, H., Bano, A., Ahmad, A., Ali, M.A., Yaqub, T., McVey, W., Jayarao, B.M., 2016. Evidence of *Coxiella burnetii* in Punjab province, Pakistan. Acta tropica 163, 61-69.
- Shannon, J.G., Cockrell, D.C., Takahashi, K., Stahl, G.L., Heinzen, R.A., 2009. Antibody-mediated immunity to the obligate intracellular bacterial pathogen *Coxiella burnetii* is Fc receptor- and complement-independent. BMC Immunol 10, 26.
- Shapiro, A.J., Norris, J.M., Bosward, K.L., Heller, J., 2016. Q Fever (*Coxiella burnetii*) Knowledge and Attitudes of Australian Cat Breeders and Their Husbandry Practices. Zoonoses and public health.
- Shivaprasad, H.L., Cadenas, M.B., Diab, S.S., Nordhausen, R., Bradway, D., Crespo, R., Breitschwerdt, E.B., 2008. *Coxiella*-like infection in psittacines and a toucan. Avian diseases 52, 426-432.
- Sidi-Boumedine, K., Adam, G., Angen, O., Aspan, A., Bossers, A., Roest, H.J., Prigent, M., Thiery, R., Rousset, E., 2015a. Whole genome PCR scanning (WGPS) of *Coxiella burnetii* strains from ruminants. Microbes Infect 17, 772-775.
- 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. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15 Suppl 2, 194-195.
- Sidi-Boumedine, K., Duquesne, V., Prigent, M., Yang, E., Joulie, A., Thiery, R., Rousset, E., 2015b. Impact of IS1111 insertion on the MLVA genotyping of *Coxiella burnetii*. Microbes Infect 17, 789-794.
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Henning, K., Ziller, M., Niemczuck, K., Roest, H.I.J., Thiery, R., 2010. Draft Final Scientific Report. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-Fever in animals in the European Union. EFSA Journal EFSA-Q-2009-00511.
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., 2011. Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. EuroReference 5.
- Signs, K.A., Stobierski, M.G., Gandhi, T.N., 2012. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 55, 1387-1389.
- Sipka, M., 1958. Survival of *Rickettsia burneti* in cheese. Veterinarski Glasnik 12, 9-12.
- Sloan-Gardner, T.S., Massey, P.D., Hutchinson, P., Knope, K., Fearnley, E., 2016. Trends and risk factors for human Q fever in Australia, 1991-2014. Epidemiol Infect, 1-9.
- Smit, L.A., van der Sman-de Beer, F., Opstal-van Winden, A.W., Hooiveld, M., Beekhuizen, J., Wouters, I.M., Yzermans, J., Heederik, D., 2012. Q fever and pneumonia in an area with a high livestock density: a large population-based study. PLoS One 7, e38843.
- Smith, D. J. W., Derrick E. H. 1940. Studies in the epidemiology of Q fever. The isolation of six strains of *Rickettsia burneti* from the tick *Haemaphysalis humerosa*. Aust. J. Exp. Med. Sci. 18, 99-102.
- Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J., Raghavan, R., 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. Genome biology and evolution 7, 831-838.
- Sobradillo, V., Ansola, P., Baranda, F., Corral, C., 1989. Q fever pneumonia: a review of 164 community-acquired cases in the Basque country. The European respiratory journal 2, 263-266.
- Sobradillo, V., Aguirre, C., Villate, J.L., Antoñana, J.M., Montejo, M., Cisterna, R., 1983. Fiebre Q, brote epidémico en el País Vasco. Medicina clínica 80, 3-6.
- Sobradillo, V., Ansola, P., Baranda, F., 1986. Neumonía por fiebre Q en España. Archivos de bronconeumología 22, 227-232.
- Solá-Graffigna, D.M., 1997. Aportación al conocimiento de la epidemiología de la toxoplasmosis y fiebre Q en el ganado ovino y caprino del archipiélago canario. Tenerife.
- Souriau, A., Arricau-Bouvery, N., Bodier, C., Rodolakis, A., 2003. Comparison of the efficacy of Q fever vaccines against *Coxiella burnetii* experimental challenge in pregnant goats. Annals of the New York Academy of Sciences 990, 521-523.

- Spiegelhalter, D.J., Best, N.G., Carlin, B.P., Van Der Linde, A., 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 64, 583-639.
- Splino, M., Beran, J., Chlibek, R., 2003. Q fever outbreak during the Czech Army deployment in Bosnia. *Mil Med* 168, 840-842.
- Sprong, H., Tijssse-Klasen, E., Langelaar, M., de, B.A., Fonville, M., Gassner, F., Takken, W., Van, W.S., Nijhof, A., Jongejan, F., Maassen, C.B., Scholte, E.J., Hovius, J.W., Emil, H.K., Spitalska, E., van Duynhoven, Y.T., 2012. Prevalence of *Coxiella burnetii* in Ticks After a Large Outbreak of Q Fever. *Zoonoses.Public Health* 59, 69-75.
- Spyridaki, I., Gikas, A., Kofteridis, D., Psaroulaki, A., Tselentis, Y., 1998. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *J Clin Microbiol* 36, 2063-2067.
- Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Loukaides, F., Antoniou, M., 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. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66, 86-90.
- Stein, A., Lepidi, H., Mege, J.L., Marrie, T.J., Raoult, D., 2000. Repeated pregnancies in BALB/c mice infected with *Coxiella burnetii* cause disseminated infection, resulting in stillbirth and endocarditis. *The Journal of infectious diseases* 181, 188-194.
- Stein, A., Raoult, D., 1992. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30, 2462-2466.
- Stein, A., Raoult, D., 1993. Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microbial pathogenesis* 15, 177-185.
- Stein, A., Raoult, D., 1998. Q fever during pregnancy: a public health problem in southern France. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 27, 592-596.
- Stein, A., Raoult, D., 1999. Pigeon pneumonia in provence: a bird-borne Q fever outbreak. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 29, 617-620.
- Sting, R., Kopp, J., Mandl, J., Seeh, C., Seemann, G., Kimmig, P., Schmitt, K., Mentrup, T., 2002. Studies of *Coxiella burnetii* infections in dairy herds with special regard to infections in men. *Berl Munch.Tierarztl.Wochenschr.* 115, 360-365.
- Sting, R., Molz, K., Benesch, C., 2013a. Q fever outbreak in a goat herd--diagnostic investigations and measures for control. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 126, 394-400.
- Sting, R., Molz, K., Hoferer, M., 2015. Creating standards for absolute quantification of *Coxiella burnetii* in real-time PCR--a comparative study based on transmission electron microscopy. *Biologicals* 43, 18-22.
- Sting, R., Molz, K., Philipp, W., Bothe, F., Runge, M., Ganter, M., 2013b. Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats. *Vet Microbiol* 167, 600-608.
- Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3, 31.
- Stuen, S., Longbottom, D., 2011. Treatment and control of chlamydial and *Rickettsial* infections in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 27, 213-233.
- Sturtz, S., Ligges, U., Gelman, A., 2005. R2WinBUGS: A Package for Running WinBUGS from R. *Journal of Statistical Software* 12, 1-16.
- Suárez-Estrada, J., Rodríguez-Barbosa, J.I., Gutiérrez-Martín, C.B., Castaneda-López, M.R., Fernández-Marcos, J.M., González-Llamazares, O.R., Rodríguez-Ferri, E.F., 1996. Seropidemiological survey of Q fever in León province, Spain. *Eur J Epidemiol* 12, 245-250.
- Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Hornstra, H.M., Pearson, T., Szigeti, A., Dan, A., Balla, E., Keim, P.S., Gyuranecz, M., 2014. Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: indication of various genotypes. *BMC veterinary research* 10, 107.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L., 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol.Lett.* 254, 268-274.
- Szeredi, L., Janosi, S., Tenk, M., Tekes, L., Bozso, M., Deim, Z., Molnar, T., 2006. Epidemiological and pathological study on the causes of abortion in sheep and goats in Hungary (1998-2005). *Acta veterinaria Hungarica* 54, 503-515.
- Ta, T.H., Jiménez, B., Navarro, M., Meije, Y., González, F.J., López-Velez, R., 2008. Q Fever in returned febrile travelers. *Journal of travel medicine* 15, 126-129.
- Tan, C.K., Owens, L., 2000. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a *Rickettsia, Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Diseases of aquatic organisms* 41, 115-122.
- Tande, A.J., Cunningham, S.A., Raoult, D., Sim, F.H., Berbari, E.F., Patel, R., 2013. A case of Q fever prosthetic joint infection

- and description of an assay for detection of *Coxiella burnetii*. J Clin Microbiol 51, 66-69.
- Tatsumi, N., Baumgartner, A., Qiao, Y., Yamamoto, I., Yamaguchi, K., 2006. Detection of *Coxiella burnetii* in market chicken eggs and mayonnaise. Annals of the New York Academy of Sciences 1078, 502-505.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012a. Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows. Vet Microbiol 159, 432-437.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012b. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. Epidemiol Infect 140, 1710-1713.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2011. Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. Prev.Vet.Med. 101, 51-57.
- 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. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 37, 1-9.
- Téllez, A., Martín, A., Anda, P., de la Fuente, L., Benítez, P., García, C., León, P., 1989. Study of *C. burnetii* human and animal seroprevalence in a rural population in Madrid community. Eur.J.Epidemiol. 5, 444-446.
- Téllez, A., Sainz, C., Echevarría, C., de Carlos, S., Fernández, M.V., Leon, P., Brezina, R., 1988. Q fever in Spain: acute and chronic cases, 1981-1985. Reviews of infectious diseases 10, 198-202.
- Téllez, A., Anda, P., de Ory, F., et al. 1992. Fiebre Q crónica. Revisión de 58 casos. In: V Congreso de la SEIMC.
- Téllez, A., Anda, P., de Ory, F., et al. 1993. Chronic Q fever incidence in Spain. In: 6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Sevilla.
- Tempelman, C., Prins, J., Koopmans, C., 2011. Economic Consequences of the Q-Fever Outbreak. In: SEO Economisch Onderzoek Amsterdam.
- Terheggen, U., Leggat, P.A., 2007. Clinical manifestations of Q fever in adults and children. Travel Med Infect Dis 5, 159-164.
- Thiele, D., Willems, H., 1994. Is plasmid based differentiation of *Coxiella burnetii* in 'acute' and 'chronic' isolates still valid? Eur J Epidemiol 10, 427-434.
- Thomas, D.R., Salmon, R.L., Kench, S.M., Meadows, D., Coleman, T.J., Morgan-Capner, P., Morgan, K.L., 1994. Zoonotic illness--determining risks and measuring effects: association between current animal exposure and a history of illness in a well characterised rural population in the UK. Journal of epidemiology and community health 48, 151-155.
- Thompson, H.A., Hoover, T.A., Vodkin, M.H., Shaw, E.I., 2003. Do chromosomal deletions in the lipopolysaccharide biosynthetic regions explain all cases of phase variation in *Coxiella burnetii* strains? An update. Annals of the New York Academy of Sciences 990, 664-670.
- Tigertt, W.D., Benenson, A.S., Gochenour, W.S., 1961. Airborne Q fever. Bacteriological reviews 25, 285-293.
- Tilburg, J.J., Roest, H.J., Nabuurs-Franssen, M.H., Horrevorts, A.M., Klaassen, C.H., 2012. Genotyping reveals the presence of a predominant genotype of *Coxiella burnetii* in consumer milk products. J Clin Microbiol 50, 2156-2158.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. Emerg Infect Dis 10, 1264-1269.
- Tissot-Dupont, H., Raoult, D., 2008. Q fever. Infect.Dis.Clin.North Am. 22, 505-514, ix.
- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. American journal of epidemiology 150, 67-74.
- Tissot-Dupont, H., Vaillant, V., Rey, S., Raoult, D., 2007. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 44, 232-237.
- Tissot-Dupont, H., Raoult, D., Brouqui, P., Janbon, F., Peyramond, D., Weiller, P.J., Chicheportiche, C., Nezri, M., Poirier, R., 1992. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. The American journal of medicine 93, 427-434.
- 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. The Journal of veterinary medical science 60, 859-861.
- To, H., Sakai, R., Shirota, K., Kano, C., Abe, S., Sugimoto, T., Takehara, K., Morita, C., Takashima, I., Maruyama, T., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1998b. Coxiellosis in domestic and wild birds from Japan. Journal of Wildlife Diseases 34, 310-316.
- Toledo, A., Jado, I., Olmeda, A.S., Casado-Nistal, M.A., Gil, H., Escudero, R., Anda, P., 2009. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. Vector.Borne.Zoonotic.Dis. 9, 465-468.
- Toman, R., Skultety, L., Ihnatko, R., 2009. *Coxiella burnetii* glycomics and proteomics--tools for linking structure to function. Annals of

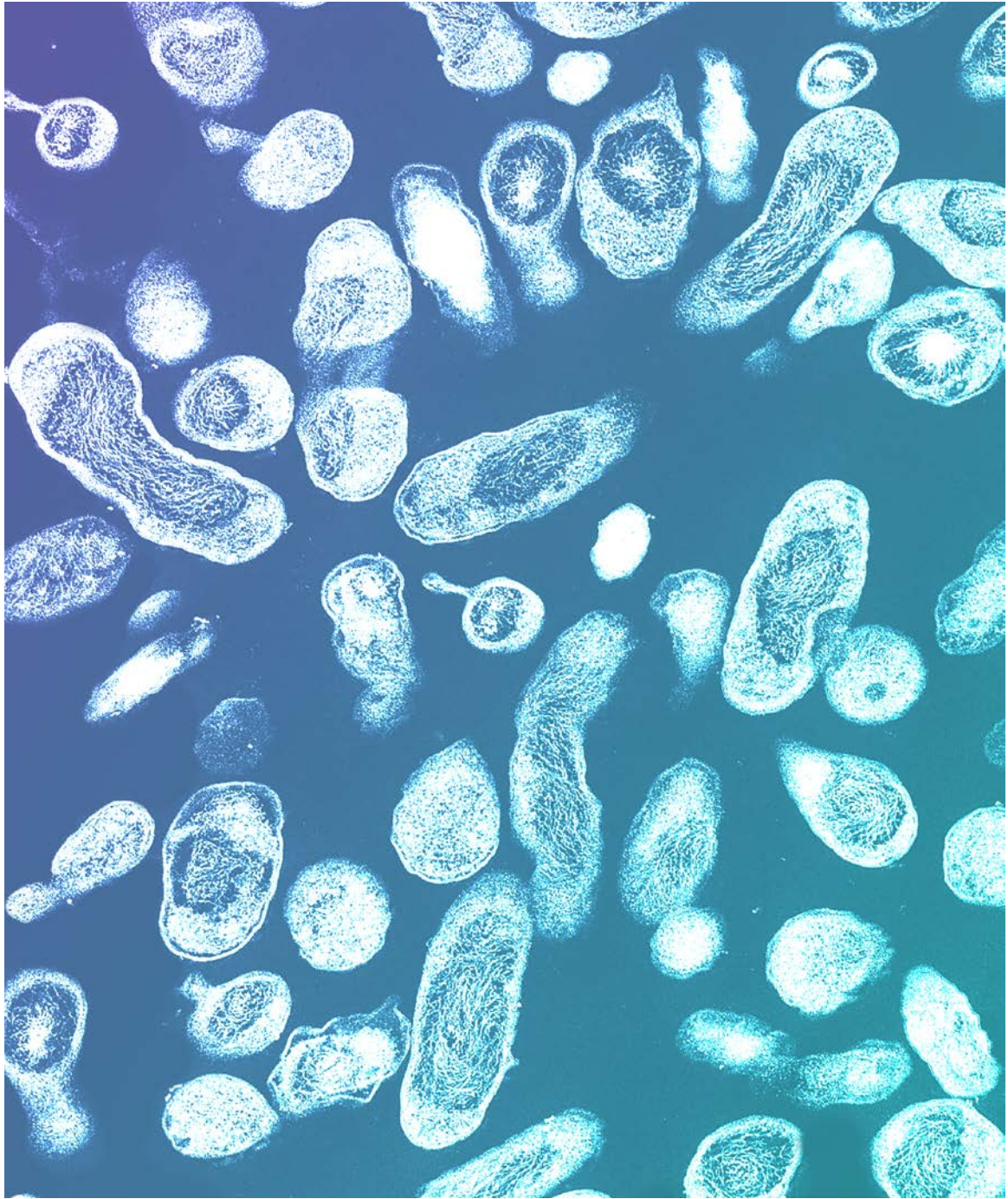
- the New York Academy of Sciences 1166, 67-78.
- Torres, M., Brugera, M., Cabrera, J. Rodés, J., 1978. Hepatitis por fiebre Q. Gastroenterol Hepatol 1, 230-232.
- Tozer, S.J., Lambert, S.B., Strong, C.L., Field, H.E., Sloots, T.P., Nissen, M.D., 2014. Potential animal and environmental sources of Q fever infection for humans in Queensland. Zoonoses and public health 61, 105-112.
- Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Gorla, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Nebbia, P., Rosati, S., 2011. Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc 23, 657-664.
- Tujulin, E., Lilliehook, B., Macellaro, A., Sjostedt, A., Norlander, L., 1999. Early cytokine induction in mouse P388D1 macrophages infected by *Coxiella burnetii*. Vet Immunol Immunopathol 68, 159-168.
- Tutusaus, J., López-Gatius, F., Almería, S., Serrano, B., Monleón, E., Badiola, J., García-Ispuerto, I., 2013. No detectable precolostral antibody response in calves born from cows with cotyledons positive for *Coxiella burnetii* by quantitative PCR. Acta veterinaria Hungarica 61, 432-441.
- Tyczka, J., Eberling, S., Baljer, G., 2005. Immunization experiments with recombinant *Coxiella burnetii* proteins in a murine infection model. Annals of the New York Academy of Sciences 1063, 143-148.
- Tylewska-Wierzbanska, S.K., Kruszewska, D., 1990. Q fever--sexually transmitted infection? The Journal of infectious diseases 161, 368-369.
- Urbano, A., Cardellach, F., Bruguera, M. *et al.*, 1978a. Forma hepática de fiebre Q, manifestación poco conocida de *Coxiella burnetii*. Med Clin (Barcelona) 71, 81-85.
- Urbano, A.G., J. M., Valls, V. *et al.*, 1978b. Endocarditis por *Coxiella burnetii*. Formas crónica de la fiebre Q. A propósito de un caso. Med Clin (Barcelona) 71, 242-246.
- 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. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases 33, 307-321.
- Valcárcel, F., Carballedo, A., Blanco, J., Díez de Tejada, P., Díez, A., Fernández, J.M., Pérez, J.L., Olmeda, A.S., 2011. Seroprevalencia de la coxielosis (fiebre Q) en rumiantes domésticos de la Comunidad de Madrid. Pequeños Rumiantes 12, 9-14.
- Valencia, M.C., Rodríguez, C.O., Punet, O.G., de Blas Giral, I., 2000. Q fever seroprevalence and associated risk factors among students from the Veterinary School of Zaragoza, Spain. Eur J Epidemiol 16, 469-476.
- Valergakis, G.E., Russell, C., Grogono-Thomas, R., Bradley, A.J., Eisler, M.C., 2012. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk of dairy cattle in south-west England. The Veterinary record 171, 156, 151-152.
- Valkova, D., Kazar, J., 1995. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. FEMS microbiology letters 125, 275-280.
- 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. Preventive veterinary medicine 121, 115-122.
- van Asseldonk, M.A., Prins, J., Bergevoet, R.H., 2013. Economic assessment of Q fever in the Netherlands. Preventive veterinary medicine 112, 27-34.
- van den Brom, R., Lievaart-Peterson, K., Lutikholt, S., Peperkamp, K., Wouda, W., Vellema, P., 2012a. Abortion in small ruminants in the Netherlands between 2006 and 2011. Tijdschrift voor diergeneeskunde 137, 450-457.
- van den Brom, R., Moll, L., van Schaik, G., Vellema, P., 2013a. Demography of Q fever seroprevalence in sheep and goats in The Netherlands in 2008. Preventive veterinary medicine 109, 76-82.
- van den Brom, R., Roest, H.J., de Bruin, A., Dercksen, D., Santman-Berends, I., van der Hoek, W., Dinkla, A., Vellema, J., Vellema, P., 2015a. 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, e0121355.
- van den Brom, R., Santman-Berends, I., Lutikholt, S., Moll, L., van Engelen, 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. Journal of dairy science 98, 3814-3825.
- van den Brom, R., Schimmer, B., Schneeberger, P.M., Swart, W.A., van der Hoek, W., Vellema, P., 2013b. Seroepidemiological survey for *Coxiella burnetii* antibodies and associated risk factors in Dutch livestock veterinarians. PLoS One 8, e54021.
- van den Brom, R., van Engelen, E., Lutikholt, S., Moll, L., van Maanen, K., Vellema, P., 2012b. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from dairy goat and dairy sheep farms in The Netherlands in 2008. The Veterinary record 170, 310.
- van den Brom, R., van Engelen, E., Roest, H.I., van der Hoek, W., Vellema, P., 2015c. *Coxiella burnetii* infections in sheep or

- goats: an opinionated review. *Vet Microbiol* 181, 119-129.
- van den Brom, R., Vellema, P., 2009. Q fever outbreaks in small ruminants and people in the Netherlands. *Small Ruminant Research* 86, 74-79.
- van der Hoek, W., Hunink, J., Vellema, P., Droogers, P., 2011a. Q fever in The Netherlands: the role of local environmental conditions. *International journal of environmental health research* 21, 441-451.
- van der Hoek, W., Meekelenkamp, J.C., Leenders, A.C., Wijers, N., Notermans, D.W., Hukkelhoven, C.W., 2011b. Antibodies against *Coxiella burnetii* and pregnancy outcome during the 2007-2008 Q fever outbreaks in The Netherlands. *BMC infectious diseases* 11, 44.
- 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. *Advances in experimental medicine and biology* 984, 329-364.
- van Engelen, E., Lutikholt, S., Peperkamp, K., Vellema, P., van den Brom, R., 2014a. Small ruminant abortions in The Netherlands during lambing season 2012-2013. *The Veterinary record* 174, 506.
- van Engelen, E., Schotten, N., Schimmer, B., Hautvast, J.L., van Schaik, G., van Duijnhoven, Y.T., 2014b. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Preventive veterinary medicine* 117, 103-109.
- van Leuken, J.P., Swart, A.N., Droogers, P., van Pul, A., Heederik, D., Havelaar, A.H., 2016. Climate change effects on airborne pathogenic bioaerosol concentrations: a scenario analysis. *Aerobiologia (Bologna)* 32, 607-617.
- van Loenhout, J.A., van Tiel, H.H., van den Heuvel, J., Vercoulen, J.H., Bor, H., van der Velden, K., Paget, W.J., Hautvast, J.L., 2014. Serious long-term health consequences of Q-fever and Legionnaires' disease. *J Infect* 68, 527-533.
- van Moll, P., Baumgartner, W., Eskens, U., Hanichen, T., 1993. Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle. *J Comp Pathol* 109, 295-301.
- van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M., Samuel, J.E., 2013. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol* 11, 561-573.
- van Woerden, H.C., Mason, B.W., Nehaul, L.K., Smith, R., Salmon, R.L., Healy, B., Valappil, M., Westmoreland, D., de Martin, S., Evans, M.R., Lloyd, G., Hamilton-Kirkwood, M., Williams, N.S., 2004. Q fever outbreak in industrial setting. *Emerg Infect Dis* 10, 1282-1289.
- Vangeel, I., Meroc, E., Roelandt, S., Welby, S., Riocreux, F., Stede, Y.V., Driessche, E.V., Schoubroeck, L.V., Czaplicki, G., Quinet, C., Hooyberghs, J., Houdart, P., Stede, Y.V., 2012. Seroprevalence of *Neospora caninum*, paratuberculosis and Q fever in cattle in Belgium in 2009-2010. *The Veterinary record* 171, 477.
- Vapniarsky, N., Barr, B.C., Murphy, B., 2012. Systemic *Coxiella*-like infection with myocarditis and hepatitis in an eclectic parrot (*Eclectus oratus*). *Veterinary pathology* 49, 717-722.
- Velasco, F.P., 2010. *Coxiella burnetii* Infections in domestic ruminants in Canary Islands (Spain). *Transbound Emerg Dis* 57, 464.
- Vellema, P., Moll, L., van den Brom, R., Dercksen, D. 2010. Research into possible side effects of Coxevac (2010). Health, G.A., ed. (Deventer, the Netherlands., GD Animal Health Report).
- Vellend, H., Salit, I.E., Spence, L, 1982. Q fever-Ontario. *Can Dis Wkly Rep.* 8, 171.
- Vicari, N., Faccini, S., Ricchi, M., Garbarino, C., Decastelli, L., Boldini, M., Rosignoli, C., Dalmasso, A., Bronzo, V., Fabbi, M., 2013. Occurrence of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk from northwestern Italy. *The Veterinary record* 172, 687.
- Viciano, P., Reyes, M.J., Alarcón, A. et al. 1991. Rickettsiosis como causa de síndrome febril de duración intermedia: estudio prospectivo, durante siete años, en la provincia de Sevilla. In: IV Reunión Nacional de la SEIMC., Santiago de Compostela, 667-672.
- Vidic, B., Mihajlovic, B., Galic, M., Pavlovic, R., Bobos, S., 1990. The finding of antibodies for *Coxiella burnetii* in cows having clinical indications of Q-fever. *Acta Vet (Beogr)* 40, 27-30.
- Villa, A., Fernández, A.B., Gracia, E. 2002. Abortos por *Coxiella burnetii* en el ganado ovino y caprino. In: XXVIII Jornadas Científicas de la SEOC, Valencia.
- Vodkin, M.H., Williams, J.C., 1988. A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both *mycobacteria* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 170, 1227-1234.
- Vongxay, K., Conlan, J.V., Khounsy, S., Dorny, P., Fenwick, S., Thompson, R.C., Blacksell, S.D., 2012. Seroprevalence of major bovine-associated zoonotic infectious diseases in the Lao People's Democratic Republic. *Vector borne and zoonotic diseases* 12, 861-866.
- Voth, D.E., Heinzen, R.A., 2007. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cell Microbiol* 9, 829-840.
- Vranakis, I., Papadioti, A., Tselentis, Y., Psaroulaki, A., Tsiotis, G., 2013. The contribution of proteomics towards

- deciphering the enigma of *Coxiella burnetii*. *Proteomics Clin Appl* 7, 193-204.
- Waag, D.M., England, M.J., Pitt, M.L., 1997. Comparative efficacy of a *Coxiella burnetii* chloroform:methanol residue (CMR) vaccine and a licensed cellular vaccine (Q-Vax) in rodents challenged by aerosol. *Vaccine* 15, 1779-1783.
- Wade, A.J., Cheng, A.C., Athan, E., Molloy, J.L., Harris, O.C., Stenos, J., Hughes, A.J., 2006. Q fever outbreak at a cosmetics supply factory. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 42, e50-52.
- Waldhalm, D.G., Stoenner, H.G., Simmons, R.E., Thomas, L.A., 1978. Abortion associated with *Coxiella burnetii* infection in dairy goats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 173, 1580-1581.
- Walter, M.C., Ohrman, C., Myrtennas, K., Sjodin, A., Bystrom, M., Larsson, P., Macellaro, A., Forsman, M., Frangoulidis, D., 2014. Genome sequence of *Coxiella burnetii* strain Namibia. *Standards in genomic sciences* 9, 22.
- Wallensten, A., Moore, P., Webster, H., Johnson, C., van der Burgt, G., Pritchard, G., Ellis-Iversen, J., Oliver, I., 2010. Q fever outbreak in Cheltenham, United Kingdom, in 2007 and the use of dispersion modelling to investigate the possibility of airborne spread. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 15.
- Ward, M.P., Carpenter, T.E., 2000a. Analysis of time-space clustering in veterinary epidemiology. *Preventive veterinary medicine* 43, 225-237.
- Ward, M.P., Carpenter, T.E., 2000b. Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. *Preventive veterinary medicine* 45, 257-284.
- Wardrop, N.A., Thomas, L.F., Cook, E.A., de Glanville, W.A., Atkinson, P.M., Wamae, C.N., Fevre, E.M., 2016. The seroepidemiology of *Coxiella burnetii* in humans and cattle, western Kenya: evidence from a cross-sectional study. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0005032.
- Webster, D., Haase, D., Marrie, T.J., Campbell, N., Pettipas, J., Davidson, R., Hatchette, T.F., 2009. Ovine-associated Q fever. *Epidemiol Infect* 137, 744-751.
- Wegdam-Blans, M.C., Kampschreur, L.M., Delsing, C.E., Bleeker-Rovers, C.P., Sprong, T., van Kasteren, M.E., Notermans, D.W., Renders, N.H., Bijlmer, H.A., Lestrade, P.J., Koopmans, M.P., Nabuurs-Franssen, M.H., Oosterheert, J.J., Dutch, Q.f.C.G., 2012. Chronic Q fever: review of the literature and a proposal of new diagnostic criteria. *J Infect* 64, 247-259.
- Wei, Y., Wang, X., Xiong, X., Wen, B., 2011. *Coxiella burnetii* antigen-stimulated dendritic cells mediated protection against *Coxiella burnetii* in BALB/c mice. *The Journal of infectious diseases* 203, 283-291.
- Weisburg, W.G., Woese, C.R., Dobson, M.E., Weiss, E., 1985. A common origin of *Rickettsiae* and certain plant pathogens. *Science* 230, 556-558.
- Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., 1951. Q fever in California. IV. Occurrence of *Coxiella burnetii* in the placenta of naturally infected sheep. *Public Health Rep* 66, 1473-1477.
- Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., 1958. Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of infective aerosols. *Annals of the New York Academy of Sciences* 70, 528-540.
- Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., Kaplan, W., 1959. Q fever studies. XXI. The recovery of *Coxiella burnetii* from the soil and surface water of premises harboring infected sheep. *American journal of hygiene* 70, 14-20.
- Wentworth, B.B., 1955. Historical review of the literature on Q fever. *Bacteriological reviews* 19, 129-149.
- Wever, P.C., van Hannen, E.J., Schellekens, J.J., van Lokven, J.W., Schneeberger, P., Zaijjer, H.L.; Hermans, M.H., 2010. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in veterinary samples and supermarket dairy products using routine hospital developed real-time PCR techniques. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 18, 74.
- Whelan, J., Schimmer, B., de Bruin, A., van Beest Holle, M.R., van der Hoek, W., ter Schegget, 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, 858-864.
- White, B., Brooks, T., Seaton, R.A., 2013. Q fever in military and paramilitary personnel in conflict zones: case report and review. *Travel Med Infect Dis* 11, 134-137.
- Whitney, E.A., Massung, R.F., Candee, A.J., Ailes, E.C., Myers, L.M., Patterson, N.E., Berkelman, R.L., 2009. Seroepidemiologic and occupational risk survey for *Coxiella burnetii* antibodies among US veterinarians. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48, 550-557.
- Wildman, M.J., Smith, E.G., Groves, J., Beattie, J.M., Caul, E.O., Ayres, J.G., 2002. Chronic fatigue following infection by *Coxiella burnetii* (Q fever): ten-year follow-up of the 1989 UK outbreak cohort. *QJM* 95, 527-538.
- Wilson, E.B., 1927. Probable inference, the law of succession, and statistical inference. *Journal of the American Statistical Association* 22, 209-212.



- Wilson, L.E., Couper, S., Prempeh, H., Young, D., Pollock, K.G., Stewart, W.C., Browning, L.M., Donaghy, M., 2010. Investigation of a Q fever outbreak in a Scottish co-located slaughterhouse and cutting plant. *Zoonoses and public health* 57, 493-498.
- Willems, H., Jager, C., Baljer, G., 1998. Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Journal of bacteriology* 180, 3816-3822.
- Williams, J.C., Hoover, T.A., Waag, D.M., Banerjee-Bhatnagar, N., Bolt, C.R., Scott, G.H., 1990. Antigenic structure of *Coxiella burnetii*. A comparison of lipopolysaccharide and protein antigens as vaccines against Q fever. *Annals of the New York Academy of Sciences* 590, 370-380.
- Wittenbrink, M.M., Gefaller, S., Failing, K., Bisping, W., 1994. [The effect of herd and animal factors on the detection of complement-binding antibodies against *Coxiella burnetii* in cattle]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 107, 185-191.
- Woc-Colburn, A.M., Garner, M.M., Bradway, D., West, G., D'Agostino, J., Trupkiewicz, J., Barr, B., Anderson, S.E., Rurangirwa, F.R., Nordhausen, R.W., 2008. Fatal coxiellosis in Swainson's Blue Mountain Rainbow Lorikeets (*Trichoglossus haematodus moluccanus*). *Veterinary pathology* 45, 247-254.
- Woldehiwet, Z., 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res.Vet.Sci.* 77, 93-100.
- Woldehiwet, Z., Sharma, R., 1992. Evidence of immunosuppression by bovine respiratory syncytial virus. *Scand J Immunol Suppl* 11, 75-80.
- Wouda, W., Dercksen, D.P., 2007. [Abortion and stillbirth among dairy goats as a consequence of *Coxiella burnetii*]. *Tijdschrift voor diergeneeskunde* 132, 908-911.
- World Health Organization, 1970. *Health Aspects of Chemical and Biological Weapons*, 1st Edition Geneva.
- Yacub, B., 1994. Detección de anticuerpos IgG frente a *Coxiella burnetii* en población sana del medio rural. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- Yadav, M.P., Sethi, M.S., 1980. A study on the reservoir status of Q-fever in avifauna, wild mammals and poikilotherms in Uttar Pradesh (India). *Int J Zoonoses* 7, 85-89.
- Yang, N., Cui, X., Qian, W., Yu, S., Liu, Q., 2012. Survey of nine abortifacient infectious agents in aborted bovine fetuses from dairy farms in Beijing, China, by PCR. *Acta veterinaria Hungarica* 60, 83-92.
- Yáñez-Ortega, J.L., Cobos-López, L.J., Martínez-Rodríguez, F.J. *et al.* 1992. Brote de fiebre Q en la provincia de Burgos, año 1992. (Boletín Microbiológico Semanal 6/1992: 1-3.).
- Yoshiie, K., Oda, H., Nagano, N., Matayoshi, S., 1991. Serological evidence that the Q fever agent (*Coxiella burnetii*) has spread widely among dairy cattle of Japan. *Microbiol Immunol* 35, 577-581.
- Zahid, M.U., Hussain, M.H., Saqib, M., Neubauer, H., Abbas, G., Khan, I., Mansoor, M.K., Asi, M.N., Ahmad, T., Muhammad, G., 2016. seroprevalence of Q fever (Coxiellosis) in small ruminants of two districts in Punjab, Pakistan. *Vector borne and zoonotic diseases* 16, 449-454.
- Zeman, D.H., Kirkbride, C.A., Leslie-Steen, P., Duimstra, J.R., 1989. Ovine abortion due to *Coxiella burnetii* infection. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 1, 178-180.
- Zhang, G., Kiss, K., Seshadri, R., Hendrix, L.R., Samuel, J.E., 2004. Identification and cloning of immunodominant antigens of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 72, 844-852.
- Zhang, G.Q., Nguyen, S.V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Kim, H.J., Fukushi, H., Hirai, K., 1998. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *J Clin Microbiol* 36, 77-80.
- Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1997. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (*com1*) encoding a 27-kDa outer membrane protein. *Microbiol Immunol* 41, 871-877.
- Zhong, J., 2012. *Coxiella*-like endosymbionts. *Advances in experimental medicine and biology* 984, 365-379.
- Zúñiga, M.C., García, J., Rodríguez, J. 1991. Seroprevalencia a *R. Conorii* y *C. burnetii* en la provincia de Orense durante seis años. In: IV Reunión Nacional de la SEIMC, Santiago de Compostela.



## **ANEXOS**



## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO I. LISTA DE ABREVIATURAS

**AEMET** = Agencia Española de Meteorología.  
**AIC** = *Akaike Information Criteria*.  
**ADN** = Ácido desoxirribonucleico.  
**AG** = Aglutinación.  
**ARNr** = Ácido ribonucleico ribosómico.  
**AUC** = *Area Under the Curve*.  
**DIC** = *Deviance Information Criteria*.  
**DO** = Densidad óptica.  
**EE.UU.** = Estados Unidos de América.  
**EFSA**: *European Food Safety Authority*.  
**ELISA**: *Enzyme-linked immunoassay*.  
**Et al.** = *et alii* (y otros).  
**Etc.** = etcétera.  
**OIE**: Organización Mundial de Sanidad Animal.  
**FC** = Fijación del complemento.  
**GIS** = *Geographic Information System*.  
**IFI** = Inmunofluorescencia indirecta.  
**IgG** = Inmunoglobulina G.  
**IgM** = Inmunoglobulina M.  
**ISCI** = Instituto de Salud Carlos III.  
**ITACyL** = Instituto tecnológico Agrario de Castilla y León.  
**km** = Kilómetro.  
**km<sup>2</sup>** = Kilómetro cuadrado.  
**LCV** = *Large Cell Variant*.  
**LPS** = Lipopolisacárido.  
**MAP** = microaglutinación en porta.  
**MAUP** = *Modifiable Areal Unit Problem*.  
**Mb** = Pares de megabases.  
**mg** = Miligramos.  
**MAPAMA** = Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medioambiente.  
**MLVA** = *Multiple Locus Variable-number tandem repeat Analysis*.  
**NA** = No aplicable.  
**ND** = No disponible.  
**PCR** = Reacción en cadena de la polimerasa.  
**PBAP** = Probabilidades Bayesianas *a posteriori*.  
**RIQ** = Rango intercuartílico.  
**SCV** = *Small Cell Variant*.  
**SDC** = *Small Dense Cell*.  
**Spp.** = Las especies del género.  
**UVL** = Unidad Veterinaria Local.  
**vs.** = *Versus*.

## 9.2. ANEXO II. LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representación del número de casos humanos anuales de fiebre Q en España recogidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Fuente: informes anuales de enfermedades de declaración obligatoria del ISCIII.

**Figura 2.** Número de pequeños rumiantes censados en Castilla y León entre los años 2009 y 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 3.** Distribución del censo de pequeños rumiantes por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 4.** Distribución de la densidad de pequeños rumiantes por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 5.** Distribución del número de explotaciones de pequeños rumiantes por municipio en la Comunidad de Castilla y León en los años 2009-2012, sin incluir aquellas con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 6.** Distribución del censo de ovinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 7.** Distribución de la densidad de ovinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 8.** Distribución del censo de caprinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 9.** Distribución de la densidad de caprinos por municipio en la Comunidad de Castilla y León entre los años 2009 a 2012, sin incluir aquellos pertenecientes a explotaciones con clasificación zootécnica de cebaderos. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Servicio de Sanidad Animal de la Junta de Castilla y León.

**Figura 10.** Distribución del número de explotaciones y número de cabezas de bovino por municipio en la Comunidad de Madrid en el año 2011. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Área de Ganadería de la Comunidad de Madrid.

**Figura 11.** Distribución del número cabezas de pequeños rumiantes (ovino y caprino) y del número de explotaciones de pequeños rumiantes (ovino, caprino y mixtas) por municipio en la Comunidad de Madrid en el año 2011. Este mapa ha sido construido a partir de la información facilitada por el Área de Ganadería de la Comunidad de Madrid.

**Figura 12.** Distribución de los municipios de Castilla y León incluidos en el estudio durante los cuatro años del mismo (2009-2012) y representación del número de años en los que cada municipio fue muestreado.

**Figura 13.** Número de rebaños ovinos muestreados por municipio de Castilla y León incluidos en el estudio durante los cuatro años del mismo.

**Figura 14.** Localización y características de los *clusters* de alta incidencia de fiebre Q detectados en cada uno de los años de estudio en rebaños ovinos de Castilla y León. El centroide y la extensión de cada *cluster* está representado por el punto y el círculo rojo en cada mapa, respectivamente.

**Figuras 15.A y 15.B.** Representación gráfica de los resultados de *odds ratio* e intervalos posteriores de probabilidad asociadas a la aptitud productiva [cárnica (categoría de referencia) vs. láctea] (figura 15.A) y del manejo [intensivo o mixto (categoría de referencia) vs. extensivo] (figura 15.B) estimados mediante un modelo multivariable sobre datos de ovinos de Castilla y León positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en los años en los que dichas variables se asociaron con la variable respuesta. La línea roja discontinua representa la ausencia de asociación (OR = 1).

**Figuras 16. A, 16. B y 16.C.** Representación gráfica de los resultados de *odds ratio* e intervalos posteriores de probabilidad asociadas al tamaño de rebaño clasificado en cuartiles en los años 2009 (figura 16.A), 2010 (figura 16.B), y 2011 (figura 16.C) estimados mediante un modelo multivariable sobre datos de ovinos de Castilla y León positivos al test ELISA frente a *C. burnetii*. La línea roja discontinua representa la ausencia de asociación (OR = 1).

**Figura 17.** Distribución de los valores medianos del factor aleatorio con estructura espacial Si estimado mediante un modelo multivariable en las regiones de estudio durante los cuatro años de estudio en rebaños ovinos de Castilla y León (2009-2012).

**Figura 18.** Representación del número y porcentaje de rebaños bovinos de la Comunidad de Madrid seropositivos y seronegativos a fiebre Q en 2009, en función de la aptitud. Los rebaños de lidia ( $n = 18$ ) mostraron todos un resultado negativo.

**Figura 19.** Distribución espacial de 110 explotaciones de bovino de la Comunidad de Madrid analizadas mediante un test ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en octubre y noviembre de 2009. Los puntos negros representan explotaciones seropositivas (con al menos un animal positivo o dudoso en el ELISA) y los puntos blancos explotaciones seronegativas.

**Figura 20.** Curvas ROC de los modelos de regresión logística a nivel de rebaño, individual para los animales de aptitud láctea e individual para los animales de aptitud cárnica en bovinos de la Comunidad de Madrid en 2009.

**Figura 21.** Probabilidad esperada de obtener un resultado positivo en el test ELISA para *C. burnetii* en función de la edad en bovinos de aptitud láctea y cárnica en la Comunidad de Madrid. Las líneas de puntos horizontales indican el 25% y el 50% de la probabilidad esperada de encontrar un resultado positivo.

**Figura 22.** Representación del número y porcentaje de rebaños de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid seropositivos y seronegativos a fiebre Q en 2011, en función de las especies presentes en los mismos.

**Figura 23.** Representación del número y porcentaje de rebaños de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid seropositivos y seronegativos a fiebre Q en 2011, en función de la aptitud productiva de los mismos.

**Figura 24.** Representación del número y porcentaje de ovejas y cabras de la Comunidad de Madrid seropositivas y seronegativas a fiebre Q en 2011, en función de la especie.

**Figura 25.** Representación de la tendencia ascendente en el número de animales positivos respecto al total de muestreados en el test ELISA en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid en 2011 de acuerdo al incremento de la edad de los mismos. Resultados transformados logarítmicamente.

**Figura 26.** Representación del número y porcentaje de rebaños de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid seropositivos y seronegativos a fiebre Q en 2011, en función de las especies presentes en los mismos.

**Figura 27.** Curvas ROC del modelo de regresión logística a nivel de rebaño para las explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid que incluyó la aptitud como efecto fijo y la delegación como factor aleatorio (modelo lineal generalizado mixto).

**Figura 28.** Efectos aleatorios estimados a través del modelo final que incluía la edad categorizada asociados a cada una de las 75 explotaciones de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid con al menos un animal positivo analizadas en la región de Madrid.

**Figura 29.** Curva ROC del modelo de regresión logística a nivel individual en pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid que incluyó únicamente la edad como efecto fijo.

**Figura 30.** Secuencia propuesta para el cálculo sistemático de las dinámicas epidemiológicas de las enfermedades infecciosas. Adaptado de Pérez, 2015.

**Figuras 31.A y 31.B.** Representación de los resultados de seroprevalencia de fiebre Q individual (Figura 30.A) y de rebaño (Figura 30.B) observados en el estudio 1 en ganado ovino de Castilla y León en los años 2009-2012 respecto a la frecuencia de los distintos niveles de seroprevalencia ovina observados mundialmente de acuerdo a los datos recogidos en las Tablas 3 y 13. La línea azul representa la curva normal de la distribución.

### 9.3. ANEXO III. LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Resumen de los principales estudios basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en muestras de suero de ganado bovino en distintas regiones del mundo. AG = aglutinación. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

**Tabla 2.** Resumen de los principales estudios de prevalencias de fiebre Q en bovino en distintas regiones del mundo basados en la detección de ADN del patógeno o de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en muestras de tanque leche. AG = aglutinación. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

**Tabla 3.** Resumen de los principales estudios basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en muestras de suero de ganado ovino en distintas regiones del mundo. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. AG = aglutinación. ND = no disponible.

**Tabla 4.** Resumen de los principales estudios de prevalencias de fiebre Q en ovino en distintas regiones del mundo basados en la detección de ADN del patógeno o de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en muestras de tanque de leche. ELISA = *Enzyme-linked immunoassay*.

**Tabla 5.** Resumen de los principales estudios basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en muestras de suero de ganado caprino en distintas regiones del mundo. AG = aglutinación. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

**Tabla 6.** Resumen de los principales estudios de prevalencias de fiebre Q en caprino en distintas regiones del mundo basados en la detección de ADN del patógeno o de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en muestras de tanque de leche. ELISA = *Enzyme-linked immunoassay*. FC = Fijación del complemento.

**Tabla 7.** Valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica de diversos test ELISA evaluados en distintos estudios realizados en rumiantes domésticos.

**Tabla 8.** Resumen de los principales estudios sobre casos humanos de fiebre Q en España reportados en la literatura. ND = no disponible.

**Tabla 9.** Principales estudios sobre seroprevalencias humanas a *C. burnetii* en España. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. MAP = microaglutinación en porta.

**Tabla 10.** Proporciones de casos humanos positivos a fiebre Q en España en función del género en trabajos publicados en la literatura científica entre 1985 y 2014.

**Tabla 11.** Número de casos por comunidad autónoma recogidos por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica entre 2009 y 2015. Fuente: ISCIII ([www.isciii.es](http://www.isciii.es)).



**Tabla 12.** Resumen de los principales trabajos basados en la determinación de prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en ganado bovino en distintas regiones de España. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

**Tabla 13.** Resumen de los principales trabajos sobre prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en ganado ovino en distintas regiones de España. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta. ND = no disponible.

**Tabla 14.** Resumen de los principales trabajos sobre prevalencias de anticuerpos frente a *C. burnetii* en ganado caprino en distintas regiones de España. ELISA = *enzyme-linked immunoassay*. FC = fijación del complemento. IFI = inmunofluorescencia indirecta.

**Tabla 15.** Resultados serológicos a nivel de municipio, de rebaño e individual de los ovinos procedentes de explotaciones de Castilla y León muestreados durante los años 2009-2012. 95% IC: intervalo de confianza al 95%.

**Tabla 16.** Número medio de ovinos seropositivos por explotación muestreada en función de cada una de las variables a nivel de rebaño disponibles en rebaños de Castilla y León muestreados entre los años 2009 y 2012. Entre paréntesis se indica el intervalo de confianza al 95%.

**Tabla 17.** Estimaciones de las distribuciones posteriores [mediana e intervalos posteriores de probabilidad al 95% (IPP)] de las *odds ratio* (OR) en el análisis univariable para los ovinos positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en función de las características de rebaño en explotaciones de Castilla y León en los años 2009-2012. NA = no aplicable.

**Tabla 18.** Estimaciones de las distribuciones posteriores [mediana e intervalos posteriores de probabilidad al 95% (IPP)] de las *odds ratio* (OR) en el análisis multivariable para los ovinos positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en función de las características de rebaño y de municipio en explotaciones de Castilla y León en los años 2009-2012. NA = no aplicable.

**Tabla 19.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% (IC) de las *odds ratio* (OR) para los rebaños positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en rebaños bovinos (n=110) de la Comunidad de Madrid en 2009, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. NA = no aplica.

**Tabla 20.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza (IC) al 95% de las *odds ratio* (OR) de los resultados positivos al ELISA para *C. burnetii* en bovinos de rebaños (n = 328) de Madrid en 2009, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. Q = cuartil.

**Tabla 21.** Estimaciones puntuales y errores estándar (ES) de los coeficientes de regresión ( $\beta$ ), estimaciones puntuales e intervalos de confianza (IC) al 95% de las *odds ratio* ajustadas (OR) y valor p de la asociación entre los resultados positivos en el ELISA frente a *C. burnetii* y los factores epidemiológicos a nivel individual y de rebaño, estimados usando un modelo multivariable de regresión logística con datos procedentes de bovino de la Comunidad de Madrid en 2009, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos.

**Tabla 22.** Número de rebaños de pequeños rumiantes incluidos en el estudio clasificados en función de la aptitud productiva y la especie animal presente en los mismos.

**Tabla 23.** Características a nivel individual de los animales incluidos en el estudio (n = 1340) de los que se dispuso información.

**Tabla 24.** Resultados serológicos a nivel individual y de rebaño de los pequeños rumiantes procedentes de explotaciones de la Comunidad de Madrid muestreados durante en el año 2011 empleando la interpretación sensible del test ELISA. 95% IC: intervalo de confianza al 95%. NA = no aplicable.

**Tabla 25.** Evolución de la proporción de pequeños rumiantes de la Comunidad de Madrid seropositivos en el test ELISA frente a *C. burnetii* en función de la edad de los mismos en la totalidad de individuos incluidos en el estudio (ovejas y cabras), empleando la interpretación sensible de los datos (en la que los animales dudosos en el test ELISA fueron considerados como reactores).

**Tabla 26.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% (IC) de las *odds ratio* (OR) para los rebaños positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en rebaños de pequeños rumiantes (n = 145) de la Comunidad de Madrid en 2011, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. NA = no aplica.

**Tabla 27.** Estimaciones puntuales e intervalos de confianza al 95% (IC) de las *odds ratio* (OR) para los pequeños rumiantes positivos al test ELISA frente a *C. burnetii* en rebaños de pequeños rumiantes (n = 145) de la Comunidad de Madrid en 2011, empleando una interpretación sensible de los resultados serológicos. NA = no aplica.



La fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial y tradicionalmente considerada como una enfermedad desatendida, causada por la bacteria *Coxiella burnetii*. Sus principales reservorios y fuente de infección para el hombre son los rumiantes domésticos, en los que la infección se manifiesta principalmente en forma de alteraciones reproductivas. En personas, *C. burnetii* suele producir un alto porcentaje de infecciones autolimitantes, si bien las complicaciones de ciertas manifestaciones clínicas pueden llegar a producir la muerte. Además, en los últimos años este patógeno ha demostrado ser capaz de producir importantes brotes en rumiantes domésticos, que han llegado a afectar a miles de personas. Sin embargo, determinados aspectos de la epidemiología de la fiebre Q no están bien caracterizados y con frecuencia sus niveles de seroprevalencia en rumiantes están subestimados. España se considera un país endémico de fiebre Q tanto en animales como en personas, habiéndose descrito numerosos casos humanos en toda la geografía nacional. No obstante, la información referente a esta enfermedad en rumiantes domésticos en determinadas regiones es muy limitada.



En este contexto, el objetivo del presente trabajo ha sido determinar la situación epidemiológica de la fiebre Q en el ganado ovino de Castilla y León (estudio 1) y en el ganado bovino, ovino y caprino de la Comunidad de Madrid (estudios 2 y 3), regiones en las que se han descrito casos humanos y donde la producción de estas especies posee un papel relevante. Así, se han evaluado los niveles de seroprevalencia, la distribución espacial y los posibles factores de riesgo asociados, habiéndose puesto de manifiesto la amplia exposición a *C. burnetii* en las especies evaluadas en las dos regiones estudiadas e identificándose determinados patrones espaciales y factores de riesgo, tales como la aptitud y el manejo productivos, el tamaño de las explotaciones y la edad de los animales. La información obtenida podría servir de base para el desarrollo de futuros planes de vigilancia, así como de control de brotes, llegado el caso.