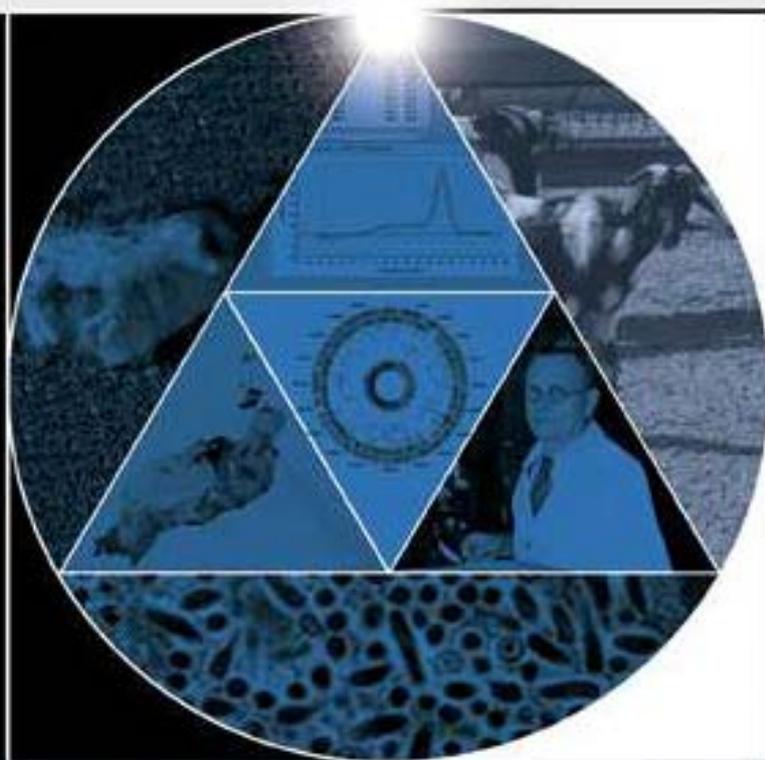


Contribución al estudio de la fiebre Q en el ganado caprino de las Islas Canarias



Juan Luis Fleitas Ramón

Año 2012.

Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva.
Facultad de Veterinaria de la U.L.P.G.C. .
Instituto Universitario de Sanidad Animal (I.U.S.A.).

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	
1.1. Introducción, justificación y objetivos	1
2. Revisión Bibliográfica	
2.1. Historia y distribución geográfica de la Fiebre Q	7
2.2. Bacteriología	13
2.2.1. Taxonomía y filogenia	13
2.2.2. Características generales	17
2.2.3. Genoma	19
2.2.4. Variación de fase y de lipopolisacárido	30
2.3. Ciclo evolutivo de <i>Coxiella burnetii</i>	33
2.3.1. Células susceptibles de ser infectadas	33
2.3.2. Ciclo intracelular y proceso similar a la creación de endosporas	34
2.3.3. Mecanismos de <i>Coxiella burnetii</i> para entrar en las células eucariotas	36
2.3.4. Localización intracelular y replicación bacteriana	39
2.4. Fisiopatología de la fiebre Q	43
2.4.1. Inmunomodulación, capacidad de infección e inmunidad	43
2.4.1.1. Inmunomodulación en la fiebre Q aguda	43
2.4.1.2. Inmunomodulación en la fiebre Q crónica	45
2.4.1.3. Capacidad infectante e inmunidad humoral	48
2.4.2. Fisiopatología de la fiebre Q humana	49
2.4.3. Fisiopatología de la fiebre Q en animales infectados de manera natural	53
2.4.4. Fisiopatología de la fiebre Q en los animales de experimentación	55
2.4.4.1. Fisiopatología de la fiebre Q aguda en los animales de experimentación	55
2.4.4.1.1. Fisiopatología de la fiebre Q aguda en ratones	56
2.4.4.1.2. Fisiopatología de la fiebre Q aguda en cobayas	57
2.4.4.1.3. Fisiopatología y lesiones de la fiebre Q aguda en otros animales experimentales	58
2.4.4.2. Inoculaciones en embriones de pollo	59
2.4.4.3. Fisiopatología y lesiones de la fiebre Q crónica en animales de experimentación	59

2.5.	Diagnóstico de la fiebre Q y su aplicación epidemiológica	61
2.5.1.	Diagnóstico clínico	61
2.5.2.	Diagnóstico anatomopatológico	61
2.5.3.	Diagnóstico mediante cultivo de <i>Coxiella burnetii</i>	62
2.5.4.	Diagnóstico serológico	63
2.5.5.	Diagnóstico mediante reacción en cadena de la polimerasa	68
2.5.6.	Sensibilidad y especificidad de las PCRs y aplicaciones	72
2.6.	Epidemiología descriptiva de la fiebre Q	75
2.6.1.	Reservorios de la enfermedad	75
2.6.1.1.	Rumiantes domésticos	75
2.6.1.2.	Mascotas: perros y gatos	76
2.6.1.3.	Otros animales	76
2.6.1.4.	Garrapatas	77
2.6.2.	Factores del hospedador	78
2.6.2.1.	Factores del hospedador en las poblaciones humanas	78
2.6.2.2.	Factores del hospedador en las poblaciones animales	81
2.6.3.	Inmunidad de las poblaciones	85
2.6.3.1.	Inmunidad de las poblaciones humanas	85
2.6.3.2.	Inmunidad de las poblaciones animales	88
2.6.4.	Factores asociados al agente causal (<i>Coxiella burnetii</i>)	90
2.6.5.	Factores ambientales y elementos bióticos (garrapatas)	98
2.6.6.	Factores temporales. Presentación de la enfermedad en tiempo absoluto. Interrelaciones edad-tiempo	101
2.7.	Epidemiología aplicada de la fiebre Q: medicina preventiva y estudios ecológicos	105
2.7.1.	Influencias y repercusiones de la fiebre Q en la sanidad animal y pública. Importancia económica de la enfermedad	105
2.7.2.	La fiebre Q en Canarias en los ámbitos de salud pública y sanidad animal	110
2.7.3.	Transmisión y ecología de la fiebre Q	113
2.7.4.	Estrategias de control de la fiebre Q. Medicina preventiva y tratamiento	121

3. Material y métodos

3.1. Estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Trans-qPCR) para la detección de <i>Coxiella burnetii</i>	127
3.1.1. Evaluación del ADN control positivo de <i>Coxiella burnetii</i>	127
3.1.2. Cebadores	128
3.1.3. Trans-PCR a tiempo final	128
3.1.4. Trans-PCR a tiempo real (Trans-qPCR)	130
3.1.5. Curva patrón (relación entre ciclo umbral y concentración de <i>Coxiella burnetii</i> en la muestra)	131
3.1.6. Cálculo del índice de correlación entre el ciclo umbral observado y el esperado	132
3.1.6. Análisis de la temperatura de fusión	133
3.1.7. Comparación de la Trans-PCR a tiempo real y final	133
3.2. Estudio epidemiológico de la presencia de <i>Coxiella burnetii</i> en la leche de cabra en la isla de Lanzarote	135
3.2.1. Análisis previo del censo ganadero caprino de la isla de Lanzarote	135
3.2.2. Muestreo	136
3.2.3. Obtención y remisión de muestras al laboratorio	136
3.2.4. Extracción de ADN de las muestras de leche remitidas	137
3.2.4.1. Material necesario para el proceso de extracción de ADN mediante la utilización de una matriz de sílice	137
3.2.4.2. Protocolo seguido para la extracción de ADN de las muestras de leche	140
3.2.5. Análisis mediante la Trans-PCR a tiempo real de las muestras de campo	141
3.2.6. Encuesta epidemiológica	142
3.2.7. Análisis matemático de los datos obtenidos	143
3.2.7.1. Primer estudio inferencial partiendo del total de granjas muestreadas para el análisis de las muestras de leche mediante la Trans-qPCR para la detección de <i>Coxiella burnetii</i>	143
3.2.7.2. Epidemiología descriptiva y analítica a partir de los datos obtenidos en la encuesta epidemiológica. Segundo estudio inferencial	149
3.3. Diseño de un método matemático para calcular la sensibilidad de la Trans-PCR a tiempo real en la detección de <i>Coxiella burnetii</i> en muestras de leche de ganado caprino	155

4. Resultados

4.1. Estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Trans-qPCR) para la detección de <i>Coxiella burnetii</i>	161
4.1.1. Evaluación del control positivo de <i>Coxiella burnetii</i>	161

4.1.2. Cebadores y Trans-PCR a tiempo final	161
4.1.3. Trans-PCR a tiempo real y curva patrón	161
4.1.4. Análisis de temperatura de fusión de las muestras	164
4.1.5. Comparación de la Trans-PCR a tiempo real y final	165
4.2. Estudio epidemiológico de la presencia de <i>Coxiella burnetii</i> en leche de cabra en la isla de Lanzarote	167
4.2.1. Análisis previo del censo ganadero caprino de la isla de Lanzarote	167
4.2.1.1. Estudio del censo por municipios (población diana)	168
4.2.1.2. Estudio del censo en la isla de Lanzarote (población total y diana)	171
4.2.2. Tasas de presencia de <i>Coxiella burnetii</i> en leche de cabra detectadas tras el análisis de las muestras mediante Trans-PCR a tiempo real (isla de Lanzarote)	173
4.2.3. Análisis matemático de los resultados obtenidos	180
4.2.3.1. Primer estudio inferencial partiendo del total de granjas muestreadas para el análisis de las muestras de leche mediante la Trans-qPCR para la detección de <i>Coxiella burnetii</i>	180
4.2.3.2. Epidemiología descriptiva y analítica a partir de los datos obtenidos en la encuesta epidemiológica. Segundo estudio inferencial	183
4.3. Método matemático propuesto para calcular la sensibilidad de la Trans-PCR a tiempo real tras su aplicación para la detección de <i>Coxiella burnetii</i> en muestras clínicas de leche de cabra en la isla Lanzarote	199

5. Discusión

5.1. Estandarización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (Trans-qPCR) para la detección de <i>Coxiella burnetii</i>	207
5.1.1. Evaluación del control positivo de <i>Coxiella burnetii</i> .	207
5.1.2. Cebadores y trans-PCR a tiempo final	207
5.1.3. Análisis de la temperatura de fusión. Sensibilidad obtenida en ambos tipos de Trans-PCR (de punto final y a tiempo real)	207
5.2. Estudio epidemiológico de la presencia de <i>Coxiella burnetii</i> en leche de cabra en la isla de Lanzarote	211
5.2.1. Evolución de los censos de las poblaciones humana y caprina y de la presencia de fiebre Q en la isla de Lanzarote	212

5.2.2. Primer estudio inferencial. Estacionalidad de la eliminación por la leche de <i>Coxiella burnetii</i> en el ganado caprino de Lanzarote (Islas Canarias). Aportaciones de cara a la salud pública	216
5.2.3. Epidemiología descriptiva y analítica a partir de los datos obtenidos en la encuesta epidemiológica. Segundo estudio inferencial	235
5.3. Método matemático propuesto para calcular la sensibilidad de la Trans-PCR a tiempo real tras su aplicación para la detección de <i>Coxiella burnetii</i> en muestras clínicas de leche de cabra en la isla Lanzarote	253
6. Conclusiones	265
7. Resumen	267
8. Summary	269
9. Bibliografía	271
10. Anexo	299

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA	Pág.
Figura 1. Dendograma de <i>C. burnetii</i> (Cooper y cols, 2007).	15
Figura 2. Dendograma de <i>C. burnetii</i> (Jasinskas y cols., 2007).	17
Figura 3. Dendograma de <i>C. burnetii</i> atendiendo a los diversos grupos genómicos y a la dotación de plásmidos de diversos aislamientos realizados en distintas regiones (Glazunova y cols., 2005).	25
Figura 4. Código R empleado para realizar los cálculos de ajuste de los datos experimentales a un modelo de Poisson que explique la estacionalidad de la presencia de <i>C. burnetii</i> en la leche de cabra en Lanzarote.	145
Figura 5. Código R empleado para realizar los cálculos de ajuste de los datos experimentales sobre ciclo umbral de las muestras positivas a curvas de probabilidad conocidas, estimación de tasa de falsos negativos y la realización de los distintos gráficos.	157
Figura 6. Gráfico de la emisión de fluorescencia obtenidos durante el ensayo para obtener la curva patrón de la TransPCR a tiempo real. Diluciones seriadas (de izquierda a derecha, y con concentraciones en células de Coxiella/ml): $8,01 \cdot 10^9$ (B3); $8,01 \cdot 10^8$ (B4); $8,01 \cdot 10^7$ (B5); $8,01 \cdot 10^6$ (B6); $8,01 \cdot 10^5$ (B7); $8,01 \cdot 10^4$ (B8); $8,01 \cdot 10^3$ (B9).	162
Figura 7. Curva estándar obtenida al comparar el ciclo umbral de los valores positivos de las diferentes diluciones del control positivo y la concentración bacteriana.	162
Figura 8. Gráfico de temperatura de fusión enfrente a la emisión de fluorescencia obtenido durante el ensayo para obtener la curva patrón de la TransPCR a tiempo real. Diluciones seriadas (con concentraciones en células de Coxiella/ml): $8,01 \cdot 10^9$ (B3); $8,01 \cdot 10^8$ (B4); $8,01 \cdot 10^7$ (B5); $8,01 \cdot 10^6$ (B6); $8,01 \cdot 10^5$ (B7); $8,01 \cdot 10^4$ (B8); $8,01 \cdot 10^3$ (B9). Temperatura de fusión de 88,5 °C para todos los positivos.	164
Figura 9. Gráficos de temperatura de melting. Dímeros (A11, D3), controles positivo (D11) y negativo (D12), muestra positiva de campo (A5) y muestra negativa de campo (A1).	165
Figura 10. Imagen de los resultados de la Trans-PCR de producto final.	165
Figura 11. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Arrecife.	168
Figura 12. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Haría.	168
Figura 13. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de San Bartolomé.	169
Figura 14. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Teguiuse.	169

Figura 15. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Tías.	169
Figura 16. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Tinajo.	170
Figura 17. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Yaiza.	170
Figura 18. Distribución de la población diana por estratos.	171
Figura 19. Gráfico del censo total de ganado caprino de la isla de Lanzarote distribuido por estratos.	172
Figura 20. Gráfico de la población diana distribuida por zonas.	173
Figura 21. Relación entre lo observado y lo pronosticado por el modelo de Poisson en cuanto a la presencia de <i>C. burnetii</i> se refiere.	18
Figura 22. Distribución mensual de partos en las ganaderías encuestadas.	194
Figura 23. Distribución anual de partos (serie azul) y tasa de presencia de <i>C. burnetii</i> en muestras de leche (serie roja) en Lanzarote. Datos expresados en porcentaje.	195
Figura 24. Distribución mensual de partos en las ganaderías encuestadas por zonas.	195
Figura 25. Supuesto A. Gráficos obtenidos para cada tipo de distribución de probabilidad en el ajuste. Ciclo umbral máximo observado 43.2.	201
Figura 26. Supuesto B. Gráficos obtenidos para cada tipo de distribución de probabilidad en el ajuste. Ciclo umbral máximo observado 41.0.	204

INDICE DE TABLAS.

TABLA	Pág.
Tabla 1. Tabla comparativa donde se muestran las características diferenciales de los géneros anteriormente clasificados en la tribu <i>Rickettsia</i> adaptada de Weiss y Moulder, 1984 y Baca y Paretsky, 1983.	13
Tabla 2. Clasificación taxonómica actual de <i>C. burnetii</i> .	14
Tabla 3. Relación de especies de Coxiella endosimbiontes y sus huéspedes.	16
Tabla 4. Características generales del genoma de <i>C. burnetii</i> Nine Mile (Seshadri y cols., 2003).	21
Tabla 5. Relación entre la dotación genómica de diferentes aislamientos de <i>C. burnetii</i> y las manifestaciones clínicas halladas (Pascual, 1994).	23
Tabla 6. Vías de eliminación de <i>C. burnetii</i> al medio por parte de diferentes hospedadores potenciales.	116
Tabla 7. Cálculo de la curva patrón: Concentración bacteriana enfrente a valores de ciclo umbral observado y esperado.	163
Tabla 8. Densidades poblacionales del ganado caprino y de la población humana en 2005 en las diferentes zonas según la zonificación establecida por Pascual (1994).	173
Tabla 9. Cuadro sobre la tasa de presencia de <i>C. burnetii</i> encontrada tras el análisis de las muestras de leche de cabra de Lanzarote, año 2005.	174
Tabla 10. Tasas de presencia de <i>C. burnetii</i> en leche de las granjas muestreadas en la estación de mayor riesgo.	176
Tabla 11. Resultados de presencia de <i>C. burnetii</i> en leche encontrados para el estrato 1.	177
Tabla 12. Resultados de presencia de <i>C. burnetii</i> en leche encontrados para el estrato 2.	178
Tabla 13. Resultados de presencia de <i>C. burnetii</i> en leche encontrados para el estrato 3.	178
Tabla 14. Resultados de tasas de presencia para los diferentes estratos.	179
Tabla 15. Distribución territorial de los datos de presencia obtenidos.	180
Tabla 16. Resumen sobre frecuencias absolutas y relativas observadas, y los resultados del test exacto de Fisher para los factores de riesgo potenciales estudiados en la primera parte del análisis inferencial.	181
Tabla 17. Estimación del modelo de Poisson.	182

Tabla 18. Intervalos de confianza para las variables relacionadas con la densidad poblacional animal y el dimensionamiento de las explotaciones ganaderas de caprino.	183
Tabla 19. Variables relacionadas con el dimensionamiento de las explotaciones ganaderas encuestadas.	184
Tabla 20. Variables relacionadas con la orografía y la climatología.	185
Tabla 21. Intervalos de confianza para las variables tasa de reposición, tasa hembra/macho y vida útil de los machos.	186
Tabla 22. Variables relacionadas con el manejo de la reposición en las explotaciones ganaderas encuestadas.	186
Tabla 23. Variables relacionadas con el origen de la reposición en las explotaciones ganaderas encuestadas.	186
Tabla 24. Variables relacionadas con el mantenimiento y la limpieza de la máquina de ordeño en las explotaciones ganaderas encuestadas.	187
Tabla 25. Variables relacionadas con el entorno de las explotaciones ganaderas encuestadas.	188
Tabla 26. Variables relacionadas con las tareas de limpieza, desinfección y desinsectación de las explotaciones ganaderas encuestadas.	189
Tabla 27. Intervalos de confianza para las variables tasa de abortos en baifas (o animales primerizos), tasa de abortos en adultas (o cabras de dos o más partos) y tasa de infertilidad.	192
Tabla 28. Variables relacionadas con el manejo reproductivo en las explotaciones ganaderas encuestadas.	193
Tabla 29. Presencia de artrópodos frente a orografía y a situación geográfica de las ganaderías encuestadas.	196
Tabla 30. Presencia de garrapatas en las explotaciones ganaderas encuestadas.	196
Tabla 31. Variables relacionadas con el racionamiento en las explotaciones ganaderas encuestadas.	197
Tabla 32. (Supuesto A) Estudio del ajuste estadístico de los datos observados a distribuciones de probabilidad conocidas teniendo en cuenta todos los datos, siendo el ciclo umbral máximo observado 43.2.	200
Tabla 33. (Supuesto B) Estudio del ajuste estadístico de los datos observados a distribuciones de probabilidad conocidas teniendo en cuenta todos los datos, siendo el ciclo umbral máximo observado 41.0.	203
Tabla 34. Tasa presencia en leche (año 2005) frente a seroprevalencia diagnosticada en el año 1992 por Pascual (1994).	215

Introducción

1. INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

“Soy en verdad un viajero solitario, y los ideales que han iluminado mi camino y han proporcionado una y otra vez nuevo valor para afrontar la vida han sido: la belleza, la bondad y la verdad”

Albert Einstein

Desde el florecimiento de la epidemiología moderna en el siglo XIX esta disciplina ha aportado soluciones a multitud de problemas sanitarios que afectaban tanto a las poblaciones vegetales y animales como a las humanas. Esto contribuyó al control en algunos casos y erradicación en otros, de enfermedades, sobre todo infectocontagiosas, si bien a lo largo de la evolución de esta disciplina el área de estudio se extendió a enfermedades de muy diversas etiologías (Martin y cols., 1997).

En los países desarrollados, poco a poco se ha logrado dar soluciones a la presencia de las pestes y de otras enfermedades que, sin llegar a tener esta gravedad, ocasionan importantes pérdidas económicas y suponen un riesgo importante de cara a la salud pública. El concepto de ir priorizando enfermedades en función de lo devastador de sus efectos, fue asumido por la **Organización Mundial de Sanidad Animal (O.I.E.)** en la 51 Asamblea General del Comité Internacional celebrada en 1983, creando las consabidas listas oficiales A y B de enfermedades que entraron en vigor en 1984. La fiebre Q se incluyó en la lista B al igual que otras enfermedades que aquejan a los pequeños rumiantes como la brucelosis ovina (causada por *Brucella ovis*) o la brucelosis ovina y caprina (causada por *Brucella mellitensis*) (Blaha y cols., 1995).

Posteriormente, y ante la complejidad creciente del comercio internacional de materias primas y el transporte de animales, unido a fenómenos como el cambio climático global y la situación actual de emergencia de muchas enfermedades infectocontagiosas y parasitarias, la O.I.E. ha optado por unificar la lista de enfermedades de declaración obligatoria en una única lista. Además, este organismo ha realizado una serie de recomendaciones concretas para cada una de las enfermedades incluidas en la misma a las autoridades competentes de los diferentes países miembros para su consideración en base al comercio y transporte internacional de materias primas y animales. La fiebre Q figura en la última actualización de la mencionada lista única de la OIE realizada en enero de 2012,

concretamente, en el apartado de enfermedades comunes a varias especies (Enfermedades de la lista de la OIE, 2012).

Las Islas Canarias están oficialmente consideradas territorio libre de brucelosis ovina y de brucelosis ovina y caprina (Directiva 91/68/CEE del Consejo; Real Decreto 1941/2004). Sin duda, este estatus sanitario les confiere a los productores de queso artesanal de Canarias una oportunidad estratégica de cara a diferenciar sus productos en los mercados. Este hecho debería fomentar la inversión de más recursos al estudio de enfermedades con importantes tasas de presencia en Canarias y a las que organismos como la O.I.E. consideran con una repercusión importante en el plano económico y de salud pública comparables a la de enfermedades como la brucelosis. De entre estas patologías, una de las más destacadas es, sin duda, la fiebre Q (Pascual, 1994; Bolaños y cols., 2003; Bolaños y cols., 2004; Rodríguez y cols., 2010; Maurin y Raoult, 1999; Marrie, 1990a; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

Como se verá en el desarrollo del capítulo de revisión bibliográfica de esta tesis doctoral, la incidencia anual en Canarias de casos de fiebre Q clínica en la especie humana, es comparable a la de países como Australia, donde las autoridades sanitarias han aplicado un plan de lucha y control contra la enfermedad basado en la vacunación de profesionales de riesgo (personal de mataderos y ganaderos principalmente) que, como se verá, ha redundado en la mejora de la salud de estos colectivos (Pascual, 1994; Bolaños y cols., 2003; Gidding y cols., 2009).

Por otro lado, existen estudios serológicos que demuestran que el agente causal de la fiebre Q está presente en los rebaños de ganado caprino, ovino y bovino de Canarias, siendo los niveles de seroprevalencia detectados en el ganado caprino de Gran Canaria elevados (Pascual, 1994; Rodríguez y cols., 2010). A parte, el estudio de Berri y colaboradores (2007), relaciona datos de seroprevalencia con los efectos adversos de la fiebre Q en los índices reproductivos en el ganado caprino. Uniendo estos datos a la valoración que se realiza por parte del Instituto Canario de Estadística (ISTAC) sobre las producciones de leche y carne de los rumiantes domésticos de Canarias en general y, prestando especial atención a las producciones del subsector caprino, principal especie productora en esta región, se llega a la conclusión, como se verá en el capítulo de epidemiología aplicada, de que es muy probable que las pérdidas anuales causadas por la fiebre Q en el sector ganadero de este archipiélago se puedan valorar en millones de euros (Berri y cols., 2007; estadísticas del sector primario del ISTAC). Estos datos justifican la necesidad de

implantar planes de lucha y control contra la fiebre Q en las poblaciones animales como el desarrollado con éxito en Eslovenia (Serbezov y cols., 1999).

A ello añadimos que Canarias cuenta con un elevado censo de mascotas (perros y gatos), especies que pueden actuar como nexo entre las poblaciones de los rumiantes domésticos (principal reservorio de *Coxiella (C.) burnetii*) y las poblaciones humanas (base de datos de ZOOCAN; Marrie, 1990b; Kocianová, 1993). Cada vez están más de moda determinadas actividades de ocio o el fenómeno de la especulación inmobiliaria, que acercan a las poblaciones humanas urbanas, con baja inmunidad poblacional frente a la fiebre Q, al entorno rural, el cual cuenta con un grado de contaminación ambiental por *C. burnetii* mayor que el entorno urbano (Hellenbrand y cols., 2001; Escudero Nieto y cols., 2006). La intensificación de muchas explotaciones ganaderas (sobre todo de ganado caprino) acaecida en el archipiélago durante los últimos 30 años (Tarasevich, 1987; Capuano y cols., 2001; Martinov, 2007; Kennerman y cols., 2010), la alta densidad poblacional registrada, sobre todo en las islas capitalinas, unido a fenómenos climatológicos como la calima o la formación de neblinas por parte de los vientos alisios en las islas de mayor relieve, también pueden favorecer la transmisión de enfermedades como la fiebre Q, cuyo mecanismo de transmisión principal es la vía aerógena (Babudieri, 1959; Alayo Arrugaeta, 1986; García y cols., 2001; Tissot-Dupont y cols., 2004; Gelado y cols., 2005; Alonso-Pérez y cols., 2007). Por último, añadimos la masiva afluencia de turistas, muchos de ellos provenientes también de zonas urbanas con escaso contacto con el agente causal de la fiebre Q (Jensenius y cols., 1997), lo cual hace que no sea difícil imaginar que podemos tener todos los ingredientes necesarios para lograr un fenómeno de emergencia de la fiebre Q en el Archipiélago Canario.

De la lectura de esta breve introducción, se desprende la importancia de la aplicación de planes de lucha y control contra la fiebre Q que contribuyan a reducir las pérdidas originadas por esta enfermedad en las explotaciones ganaderas afectadas, a la vez que contribuyen a disminuir la contaminación ambiental por *C. burnetii* de las zonas rurales. Todo ello contribuirá muy probablemente a disminuir la incidencia de casos de fiebre Q clínica en las poblaciones humanas de estas zonas, las cuales, son las más afectadas por la infección por *C. burnetii* en Canarias (Pascual, 1994; Bolaños y cols., 2003).

En este escenario, el contar con herramientas de diagnóstico eficaces y de fácil aplicación, que permitan un análisis rápido y eficaz de un número importante de muestras, no sólo son necesarias para poder realizar estudios de la situación

epidemiológica actual, sino que además, son necesarias para evaluar la eficacia de los planes de lucha y control contra la fiebre Q, una vez éstos sean instaurados. Técnicas serológicas como la Inmunofluorescencia Indirecta (I.F.I.) o el enzimoimmunoensayo (ELISA) han sido utilizadas con éxito hasta ahora en Canarias con el fin de detectar anticuerpos contra la enfermedad en estudios epidemiológicos realizados en poblaciones animales y humanas y, para confirmar la sospecha de fiebre Q clínica en la especie humana (Pascual, 1994; Bolaños y cols., 2003; Bolaños y cols., 2004; Rodríguez y cols., 2010).

Las técnicas serológicas diseñadas hasta ahora no permiten diferenciar anticuerpos vacunales de los anticuerpos producidos tras la infección natural. Por tanto, se precisa de una técnica diagnóstica que permita su utilización antes y durante la aplicación de un plan de lucha y control contra la enfermedad que incluya la posibilidad de vacunar contra la fiebre Q, ya que la correcta inmunización del ganado afectado ha demostrado que contribuye a disminuir la eliminación de *C. burnetii* al medio por parte de los animales infectados portadores eliminadores de la bacteria. Su utilización produce una importante interrupción del ciclo evolutivo de *C. burnetii* en un momento crucial en el mismo, por lo que se rompe la estrategia principal de este microorganismo de cara a su transmisión, que no es otra que la capacidad de permanecer durante un amplio periodo de tiempo, de forma masiva y en determinadas épocas del año en el medio externo al hospedador (Arricau-Bouveri y cols., 2003; Guatteo y cols., 2008).

Por tanto, las técnicas que permitan la detección del grado de eliminación de *C. burnetii* al medioambiente mediante la detección de portadores excretores de la bacteria al medio, o incluso, mediante el establecimiento de índices de correlación entre el número de portadores y la presencia de *C. burnetii* en muestras extraídas del tanque de refrigeración de la leche en las granjas problema, pueden ser de gran utilidad para determinar la eficacia de los planes de lucha y control contra la fiebre Q. Es aquí donde la trans-PCR a tiempo real, una técnica basada en la amplificación de una región de transposición repetitiva específica del genoma de *C. burnetii*, se muestra como una técnica muy específica y sensible que, además, es fácil de aplicar en el análisis de un número elevado de muestras de campo, lo que la convierte en una técnica de elección para estudios epidemiológicos (Berri y cols., 2000; Arricau-Bouveri y cols., 2003; Klee y cols., 2006; Barlow y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007; Guatteo y cols., 2008).

Por todo lo expuesto, en el presente estudio epidemiológico nos hemos propuesto poner a punto y ver las posibilidades de la trans-PCR a tiempo real, utilizando unos cebadores diseñados para su utilización en PCR convencional.

Entendemos que la técnica de la trans-PCR utilizada según la metodología expuesta en el presente estudio puede aportar resultados interesantes de cara a la aplicación de la misma en estudios de carácter epidemiológico. Por ello, propusimos los siguientes objetivos:

- 1.** Detectar la presencia de portadores excretores de *C. burnetii* mediante una Trans-PCR a tiempo real entre las cabras de un número representativo de las ganaderías de más de 100 cabezas existentes en la isla de Lanzarote, así como establecer si existe un patrón estacional en la eliminación de esta bacteria en la leche.
- 2.** Diseñar un método matemático que permita calcular la sensibilidad de la Trans-PCR a tiempo-real en su aplicación con muestras de campo mediante el ajuste de los datos de ciclo-umbral detectados para las muestras positivas a un modelo de distribución de probabilidad conocida, para proceder posteriormente a calcular la probabilidad de que una muestra con presencia de *C. burnetii* no sea detectada (o lo que es lo mismo, cálculo de la tasa de falsos negativos).
- 3.** Detectar posibles factores de riesgo asociados a la presencia de *C. burnetii* en muestras de leche de ganado caprino en Lanzarote mediante la realización de una encuesta epidemiológica.

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA FIEBRE Q

“La diferencia entre el pasado, el presente y el futuro es sólo una ilusión persistente”

Albert Einstein

El término de fiebre Q proviene del inglés “Q fever o Question fever” y fue propuesto en 1937 por Edward H. K. Derrick para describir una enfermedad febril de causa desconocida que se presentaba en los trabajadores del matadero de Brisbane, Queensland, Australia (Derrick, 1937). En el año 1935, siendo Derrick director del laboratorio de Microbiología y Patología del Departamento de Salud Pública de Brisbane fue invitado a investigar un brote epidémico de una enfermedad febril que se desarrolló entre los trabajadores de un matadero de la zona. Al finalizar el brote, se decidió a seguir estudiando los casos que seguían ocurriendo con cierta regularidad con el fin de estudiar la presentación clínica de la enfermedad. Intentó sin éxito el aislamiento del agente causal de la enfermedad, realizando inoculaciones en cobayas a partir de muestras obtenidas de pacientes aquejados de la misma. Por este motivo, llegó a la conclusión de que podría tratarse de una enfermedad vírica (Amano y Williams, 1984a).

Posteriormente, Burnet y su colaborador, Freeman, a los que Derrick había enviado una serie de muestras para su análisis, hipotetizaron sobre la posibilidad de que la enfermedad fuera ocasionada por microorganismos del género *Rickettsia*. Estos investigadores lograron reproducir la enfermedad en cobayas, ratones y monos. Examinando cortes de bazo teñidos con hematoxilina-eosina de ratones infectados experimentalmente, lograron ver al microscopio, vacuolas intracelulares con material granular en su interior. Al teñir los cortes con el método de Castañeda o Giemsa lograron visualizar numerosas formas bacilares que recordaban a las rickettsias (Burnet y Freeman, 1937). Con estos resultados, Derrick y colaboradores (1959) estudiaron la epidemiología de la enfermedad. Sus conclusiones finales fueron que los animales salvajes eran los reservorios naturales de la infección, mientras que los animales domésticos se comportaban como reservorios secundarios y que la enfermedad podía ser transmitida por garrapatas.

En 1935, Davis, investigador del laboratorio de las Montañas Rocosas (Rocky Mountain Laboratory), Estados Unidos, estudiando la ecología de la fiebre

exantemática de las Montañas Rocosas se encontró con que al alimentar garrapatas obtenidas en Nine Mile, Montana, con cobayas, alguno de estos animales experimentaban un cuadro febril, el cual, no se correspondía con el cuadro típico de la fiebre exantemática de las Montañas Rocosas en estos animales (Davis y Cox, 1938). Por otra parte, observaron que la enfermedad podía transmitirse a otros animales sanos mediante la inoculación intraperitoneal de sangre extraída de los animales infectados, y que el agente productor de esta enfermedad no podía crecer en medios de cultivo axénicos.

Tanto Burnet y Freeman como Cox y Davis, demostraron que el agente causal Nine Mile era filtrable y tenía propiedades típicas de los virus y las rickettsias (Cox, 1938; Davis y Cox, 1938). Poco después, en 1938, Cox logró replicar este agente en huevos embrionados de gallina (Cox y Bell, 1939). En el mismo año, 1938, tuvo lugar un acontecimiento decisivo en el estudio de la fiebre Q y de su agente causal. Dyer, director del Instituto Nacional de Salud de Australia, realizó una estancia en Hamilton con el fin de comprobar las técnicas que permitían replicar el agente Nine Mile. Tras su visita, volvió con una infección adquirida en el laboratorio de Montana debido a las manipulaciones del agente Nine Mile. Tras inocular experimentalmente a cobayas con su sangre infectada, se produjo un cuadro febril en dichos animales, identificándose posteriormente, a las supuestas rickettsias a partir de cortes histopatológicos de bazo de los animales infectados. Asimismo, se demostró la existencia de inmunidad cruzada entre el agente aislado de la sangre de Dyer y el agente Nine Mile (Cox, 1938; Davis y Cox, 1938; Cox y Bell, 1939).

Ahora sólo faltaba establecer el vínculo definitivo entre el agente Nine Mile y el agente de la fiebre Q en Australia. Para ello, Burnet le envió algunas muestras de bazo de ratones infectados con el agente productor de la fiebre Q australiana. Dyer, tras inocular dicho agente en cobayas, demostró que aquellos animales que habían padecido la enfermedad tras ser inoculados con su sangre (contaminada con el agente Nine Mile) estaban protegidos contra el agente productor de la fiebre Q. Por tanto, se llegó a la conclusión de que el agente productor de la fiebre Q, el agente aislado de la sangre de Dyer y el agente Nine Mile eran el mismo microorganismo (Cox, 1938; Davis y Cox, 1938; Cox y Bell, 1939). Este agente etiológico recibió inicialmente el nombre científico de *Rickettsia burnetii*, para posteriormente, renombrarse como *Coxiella burnetii* (Skerman y cols., 1980).

Durante la segunda Guerra Mundial, en diversos países europeos de la franja mediterránea (Italia, Francia (Córcega) y Grecia, entre ellos), se produjeron brotes

epidémicos de fiebre Q tanto en las tropas alemanas, como posteriormente en las de los aliados. En este caso, la enfermedad se presentaba en forma de un cuadro febril ocasionalmente neumónico. Curiosamente, las poblaciones de residentes de las regiones donde surgían estos brotes epidémicos parecían resistir la enfermedad. De hecho, estas poblaciones residentes contaban con una importante inmunidad poblacional caracterizada por una fuerte tasa de anticuerpos residuales contra la infección por *C. burnetii*. Estos datos sugerían que esta enfermedad era endémica en la cuenca mediterránea (Robbins, 1946; Wenworth, 1955).

En la década de 1950, las técnicas más utilizadas para obtener un diagnóstico definitivo de la fiebre Q, dada la inespecificidad de sus síntomas, eran el aislamiento y posterior identificación del agente causal mediante tinción y/o serología en animales inoculados experimentalmente (ratones o cobayas), la fijación del complemento, el test de la aglutinación, el test intradérmico, el test de sensibilización ante las antiglobulinas y el test mediante opsonización (Babudieri, 1953; Kaplan y Bertagna, 1955). En 1955, la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) publicó un informe que indicaba que la fiebre Q estaba presente en 51 países de los cinco continentes (Kaplan y Bertagna, 1955).

De estos estudios, llamaba la atención cómo esta enfermedad no era detectada en países como Holanda (Wolff y Kouwenaar, 1954), en los países escandinavos como Dinamarca, Suecia, Finlandia y Noruega (Rislakki y Aminoff, 1953), ni en Nueva Zelanda, quien sin embargo, importaba ganado de otros países bajo la exigencia de una certificación de estar libre de infección mediante determinación serológica (Salisbury, 1953). Todo ello, a pesar de haberse realizado una intensa búsqueda de la misma.

Sin embargo, la distribución geográfica de la fiebre Q en estos países considerados libres de la enfermedad ha evolucionado desde la década de los 50 hasta los tiempos actuales. En Holanda se empezaron a detectar sueros positivos contra *C. burnetii* en 1968, si bien los primeros casos clínicos de la enfermedad no se describen hasta 1979. Por tanto, se estima que la enfermedad pudo haber sido introducida en el país en algún momento entre 1958 y 1968. Desde entonces, se ha observado que la enfermedad está ampliamente distribuida entre las poblaciones humanas y de rumiantes del país, caracterizándose la enfermedad en las poblaciones humanas por presentarse en etapas tempranas de la vida (Richardus y cols., 1987). Asimismo, en este país se ha detectado el brote epidémico con más casos de fiebre Q humana de la historia del estudio de esta enfermedad (con un total de 808 casos).

Dicho brote tuvo lugar en una localidad holandesa donde existe un número importante de explotaciones intensivas de ganado caprino, las cuales se consideraron que fueron la fuente principal de infección, debido fundamentalmente, a la utilización del estiércol contaminado de estos animales (Delsing y Kullberg, 2008).

En cuanto a los Países Escandinavos se refiere, se ha demostrado la presencia de la enfermedad en estos países, no sólo en forma de casos de fiebre Q humana contraída por ciudadanos durante sus vacaciones o estancias en otros países donde la enfermedad es endémica, como ha ocurrido en países como Finlandia y Noruega, sino que además, estudios más recientes realizados en Dinamarca y Suecia, han puesto de manifiesto que la enfermedad está presente tanto en las poblaciones humanas, como en las poblaciones de rumiantes domésticos y de animales salvajes (Lumio y cols., 1981; Akesson y cols., 1991; Macellaro y cols., 1993; Werner y cols., 2003; Bosnjak, 2009; Agger y cols., 2010; Koch y cols., 2010).

Estos cambios en la distribución mundial de la fiebre Q se pueden deber a diferentes factores. La mejora de la sensibilidad de las técnicas serológicas de diagnóstico de la fiebre Q con la aparición de técnicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en los años 60 y el enzimoimmunoensayo o ELISA en torno a la década de los 80s (Lesso y Brezina, 1964; Brezina y Kováčová, 1966; Field y cols., 1983; Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999), no parece explicar por sí sola el aumento en la seroprevalencia en estos países considerados previamente libres de la enfermedad. Muy probablemente, han influido los cambios experimentados en los últimos 60 años en cuanto a la movilidad de personas, animales y mercancías, unido a fenómenos como el cambio climático, el cual, ha desembocado en procesos como el calentamiento global, con efectos en la distribución mundial de artrópodos como las garrapatas (principal reservorio de la fiebre Q en la naturaleza), que han logrado colonizar territorios más septentrionales y de mayor altura en el transcurso de las últimas décadas, según las conclusiones obtenidas en la conferencia internacional sobre ganadería y cambio climático global de mayo de 2008 (Vourc'h y Vial, 2008).

El único país que continúa con el estatus de país libre de la enfermedad es Nueva Zelanda. Hilbink y cols. (1993) demostraron con un estudio seroepidemiológico que no existían indicios de presencia de fiebre Q en el mismo. La importación de ganado en este país sigue estando sujeta a la presentación de un certificado que demuestre seronegatividad frente a esta enfermedad.

En materia de Medicina Preventiva, existen publicaciones sobre el diseño y

prueba de diferentes tipos de vacunas de aplicación en animales desde finales de la década de los 80, diseñándose también con posterioridad vacunas de aplicación en medicina humana (Kazar y Rehacek, 1987; Aitken, 1989; Williams y cols., 1993). Las pérdidas económicas provocadas por la fiebre Q entre profesionales de riesgo (ganaderos y trabajadores de matadero) han sido evaluadas en Australia, llevando a las autoridades sanitarias de este país a la puesta en marcha de un plan de prevención basado en la vacunación contra la enfermedad en estos colectivos de riesgo desde el año 2002, con resultados positivos espectaculares (Gidding y cols., 2009). Otro ejemplo de resultados satisfactorios tras la instauración, esta vez, de un plan de control integral de la fiebre Q, con medidas de prevención aplicadas al campo de la Sanidad Animal, lo tenemos en el plan de control de la fiebre Q llevado a cabo en Eslovaquia (Serbezov y cols., 1999).

En la mayoría de los países, la fiebre Q no está incluida en la lista nacional de enfermedades de declaración obligatoria, con lo cual, en muchas ocasiones la información obtenida sobre la epidemiología de esta enfermedad parte de la investigación de diversos brotes epidémicos detectados de la misma, de estudios seroepidemiológicos realizados en poblaciones humanas y animales de determinadas áreas, o a través de los datos obtenidos en sus estudios de los laboratorios de salud pública o bien de los centros de referencia en el estudio de las enfermedades rickettsiales (Maurin y Raoult, 1999).

En España, la primera evidencia que se tuvo de la existencia de la fiebre Q fue el aislamiento de *C. burnetii* a partir de tres especies diferentes de garrapatas (*Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus sanguineus*) recogidas de animales de Sevilla y Madrid en el año 1949 (Pérez Gallardo y cols., 1949), siendo diagnosticada por primera vez en la especie humana en el año 1950 en Salamanca (Prada y cols., 1950). Desde entonces, ha sido detectada en múltiples regiones de nuestro país, si bien, quizás donde ha habido una mayor continuidad en la labor investigadora sobre esta enfermedad ha sido en el País Vasco, donde la fiebre Q es endémica y cuya presentación clínica aguda más frecuente en humana es la neumónica (Montejo y cols., 1985; Téllez y cols., 1988; Sanzo y cols., 1993).

En Canarias, se tenía conocimiento de la presencia de fiebre Q desde los años 70 tras el estudio de una serie de casos de fiebre Q de ciudadanos finlandeses que habían contraído la enfermedad durante su estancia en el Archipiélago Canario y en otros lugares donde la enfermedad era endémica (Palosuo y cols., 1974). El primer estudio seroepidemiológico sobre fiebre Q humana en Canarias se realizó en

Lanzarote en el año 1986 utilizando la fijación del complemento (FC) (Pascual y cols., 1992), siendo el primero de una serie de tres estudios realizados en esta isla entre 1986 y 1991. En el último estudio de esta serie, se detectó una seroprevalencia en la especie humana del 10,9% mediante FC y del 18,7% mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI). Además, verificó en una muestra representativa de la ganadería de caprino de la isla (principal producción de rumiantes de la región), que el 32,7% de las ganaderías analizadas fueron positivas por IFI (Pascual, 1994).

Trece años después, se publicó el primer estudio epidemiológico de fiebre Q humana en la totalidad del Archipiélago Canario, el cual se realizó mediante IFI y arrojó una seroprevalencia de entre el 21,5% al 35,8% (Bolaños y cols., 2004). En este año, otro estudio serológico basado en la aplicación del ELISA en el que se estudiaba una muestra representativa de los ganados caprino, ovino y bovino de la isla de Gran Canaria, arrojó unos valores de seroprevalencia de 60,4%, 31,7% y 12,2% respectivamente para las mencionadas especies (Rodríguez y cols., 2010). Asimismo, decir que en Canarias se han publicado varias revisiones de casos de fiebre Q clínica en la especie humana, de entre las cuales, la más reciente se realizó sobre la población del sureste de Gran Canaria (Bolaños, 2003).

Desde el descubrimiento de la enfermedad por Derrick en el año 1937, se han detectado múltiples brotes epidémicos que han afectado a poblaciones humanas y animales de diferentes países donde la enfermedad es endémica. Además, en algunos de estos países se han realizado estudios seroepidemiológicos orientados a establecer datos seroprevalenciales tanto en las poblaciones humanas como en las animales. En el caso concreto de la medicina humana, en muchos países donde se estudia la fiebre Q se han establecido datos de incidencia anual de casos de fiebre Q aguda y se han obtenido datos importantes sobre las tasas de presencia de la fiebre Q crónica (Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

2.2. BACTERIOLOGÍA (*Coxiella burnetii*)

“Si lo que persigues es describir la verdad, hazlo de manera clara y sencilla, y deja la elegancia para el sastre”

Albert Einstein

2.2.1. TAXONOMÍA Y FILOGENIA

La ubicación taxonómica del género *Coxiella* ha sido muy debatida (Drancourt y Raoult, 1994). Clásicamente, se había incluido a esta bacteria en el orden *Rickettsiales*, en la familia *Richettsiaceae*, y, dentro de ésta, en la tribu *Rickettsiae*, conjuntamente con los géneros *Richettsia* y *Rochalimea* (Weiss y Moulder, 1984), en base a sus propiedades de tinción, dependencia de las células del hospedador para su crecimiento y una asociación natural cercana con los hospedadores vertebrados y artrópodos. La única especie dentro del género *Coxiella* que se ha descrito era *Coxiella (C.) burnetii*.

Tabla 1. Tabla comparativa donde se muestran las características diferenciales de los géneros anteriormente clasificados en la tribu *Rickettsiae* adaptada de Weiss y Moulder (1984) y Baca y Paretsky (1983).

	<i>Coxiella</i>	<i>Richettsia</i>	<i>Rochalimea</i>
Capacidad de tinción con el Gram	+ ó -	-	-
Pasa filtros de bacteriología	+	-	-
Se puede cultivar en ausencia de células hospedadoras	-	-	+
Crece en el citoplasma o núcleo de la célula hospedadora	-	+	-
Crece en el fagolisosoma de la célula hospedadora	+	-	-
Crece en la superficie de la célula hospedadora	-	-	+
Presencia de una forma similar a endosporas	+	-	-
Precisa de un artrópodo como vector	-	+	+
Alta resistencia a agentes químicos y elevadas temperaturas	+	-	-
Óptimo Ph	4,5	7,0	7,0
Variación de fase	+	-	-
G+C Mol%	43	29-33	39

En la actualidad, determinados hallazgos filogenéticos así como estudios de secuenciación del genoma de la cepa Nine Mile en fase I (Seshadri y cols., 2003) demuestran que *C. burnetii* pertenece al subgrupo gamma de las proteobacterias, en tanto los demás microorganismos de la familia *Rickettsiae* se encuadrarían en el grupo alfa. Es más, dentro del subgrupo gamma de las proteobacterias, *C. burnetii* ha mostrado tener grandes analogías filogenéticas con el orden *Legionellales*, y

dentro de este orden, parece ser que *C. burnetii* tendría una estrecha relación con *Legionella pneumophila* (un patógeno intracelular facultativo humano) y con *Rickettsiella grylli* (un patógeno intracelular de artrópodos). Dichos estudios se apoyan en el análisis de la secuencia del gen que codifica el ARNr 16S (Weisburg y cols., 1989) y en el análisis del genoma en cuanto al tipo de proteínas se obtienen tras su transcripción y, concretamente, al estudio filogenético de un grupo de 20 proteínas que cuentan con un gran valor conservativo (Roux y cols., 1997).

Esquema de la clasificación taxonómica del Orden *Legionellales*:

- Orden *Legionellales*
 - Familia *Coxiellaceae*
 - *Aquicella*
 - *Coxiella*
 - *Rickettsiella*
 - Familia *Legionellaceae*
 - *Fluoribacter*
 - *Legionella*
 - *Tatlockia*

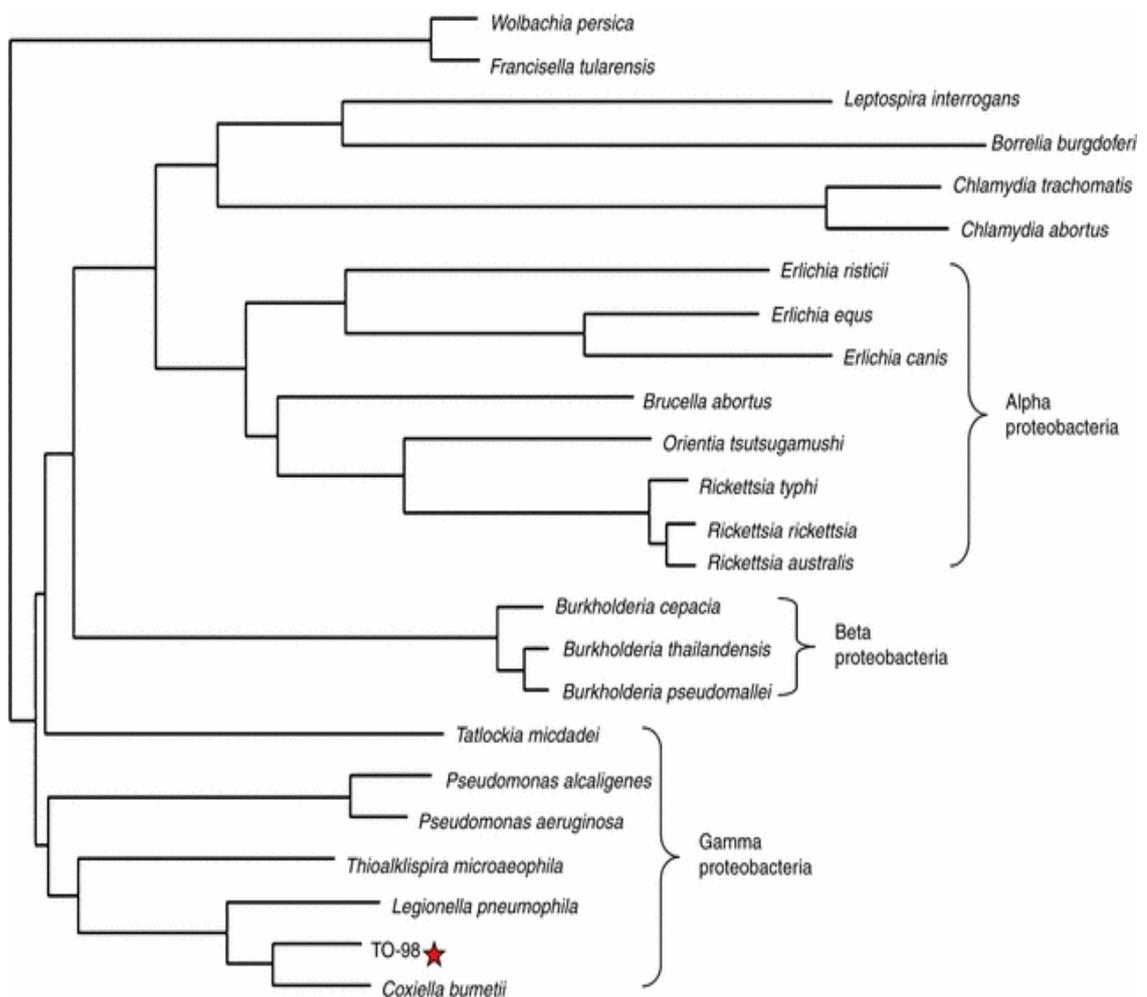
Tabla 2. Clasificación taxonómica actual de *C. burnetii*.

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA de <i>Coxiella burnetii</i>	
Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	<i>Legionellales</i>
Familia:	<i>Coxiellaceae</i>
Género:	<i>Coxiella</i>
Especie:	<i>C. burnetii</i>

Actualmente, se considera que el género *Coxiella* incluye a una única especie, *C. burnetii*. Sin embargo, en el año 2000, Tan y Owens aislaron de cangrejos de río infectados de una enfermedad que produjo una alta mortalidad, microorganismos cuyo gen 16S ARNr tiene un 95,6% de homología con *C. burnetii* y propusieron nombrarla *C. cheraxi*. De igual forma Woc-Colburn y cols. (2008) detectaron en loros de cabeza azul con signos clínicos, microorganismos del Género *Coxiella* y después de analizar los resultados creen que se trata de una nueva especie.

En la siguiente figura (Fig. 1) se muestra un árbol filogenético construido utilizando secuencias del gen 16S ARNr mostrando la relación del microorganismo TO-98, nombrado provisionalmente como *C. cheraxi* (Tan y Owens, 2000) con otros miembros de las Proteobacterias, Spirochaetes (*Leptospira interrogans* y *Borrelia burgdorferi*) y Chlamydiae (*Chlamydia trachomatis* y *Chlamydia abortus*) (Cooper y cols., 2007).

Figura 1. Dendograma de *C. burnetii* (Cooper y cols, 2007).



Por otro lado, se ha detectado la presencia de microorganismos simbiotes en garrapatas, cuya secuencia del gen 16S del ARNr está también muy relacionada con la de *C. burnetii*. La forma vegetativa de *C. burnetii* es estructuralmente similar a la de los simbiotes, por lo que es difícil su diferenciación en base a la morfología (Noda y cols., 1997). Los simbiotes que tienen una asociación con sus hospedadores tan

íntima que se considera que es beneficiosa para ambos, se conocen como endosimbiontes. En la mayoría de las garrapatas se han encontrado estos microorganismos que se transmiten transováricamente (Noda y cols., 1997). Noda y cols. (1997) consideraron a *Coxiella* sp. como una forma de *C. burnetii* que evolucionó a endosimbionte de garrapata. Este paso se lleva a cabo entre otras cosas mediante la reducción de su genoma (Gil y cols., 2004), siendo el genoma reducido una característica común a los endosimbiontes obligados de invertebrados (Moran y Wernegreen, 2000). También se ha especulado que los endosimbiontes eran originalmente patógenos de animales adquiridos por las garrapatas durante su alimentación sobre un hospedador bacteriémico y consideran que el potencial de los endosimbiontes de garrapatas de emerger (o reemerger) bajo condiciones naturales queda por ser determinada (Noda y cols., 1997).

Tabla 3. Relación de especies de *Coxiella* endosimbiontes y sus huéspedes.

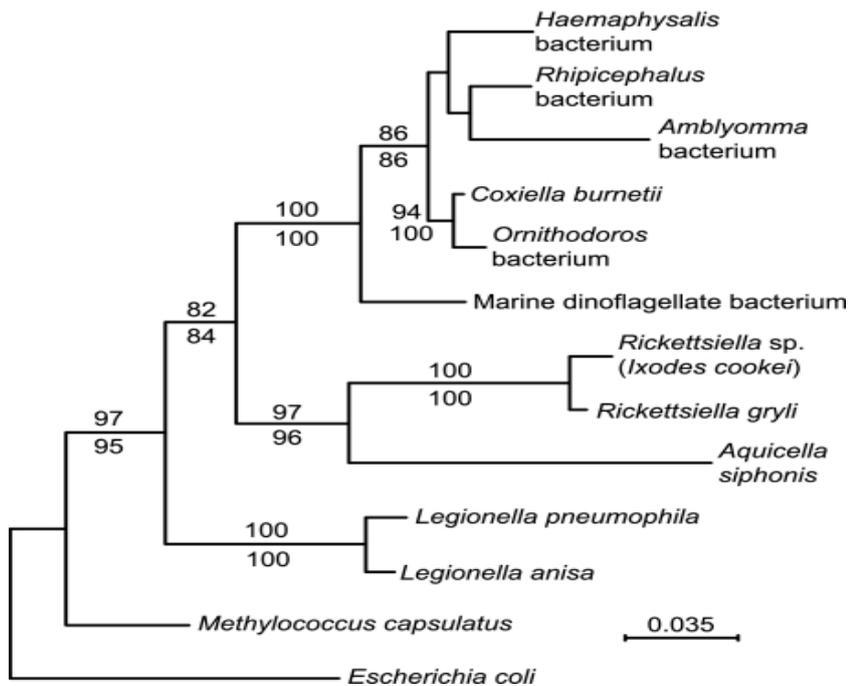
Coxiella	Hospedador	Referencia
<i>Coxiella</i> sp.	Garrapatas (<i>Ornithodoros moubata</i>) (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>) (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	Noda y cols., 1997
<i>Coxiella</i> sp.	Garrapata de perro (<i>Rhipicephalus sanguineus</i>) (<i>Rhipicephalus turanicus</i>)	Bernasconi y cols., 2002
<i>Coxiella</i> sp. "cenerentola"	Garrapata (<i>Haemaphysalis concinnae</i>)	Mediannikov y cols., 2003
<i>Coxiella</i> sp.	Garrapata (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	Lee y cols., 2004
<i>Coxiella</i> sp.	Garrapata de pelícano (<i>Carios capensis</i>)	Reeves y cols., 2005
<i>Coxiella</i> sp.	Garrapata (<i>Amblyomma americanum</i>)	Jasinskas y cols., 2007
<i>Coxiella</i> sp.*	Garrapata de aves (<i>Argas monolakensis</i>)	Reeves, 2008

* queda por determinar si se trata de un endosimbionte (Reeves, 2008).

La siguiente figura (Fig. 2) ha sido obtenida del artículo de Jasinskas y cols. (2007) y muestra un dendograma de las secuencias parciales del gen 16S de ARNr de *Amblyomma americanum* endosimbionte y otras γ -proteobacterias seleccionadas: *C. burnetii*, *Haemaphysalis longicornis* endosimbionte, *Rhipicephalus sanguineus*

endosimbionte, *Ornithodoros moubata* endosimbionte, un dinoflagelado marino endosimbionte, *Rickettsiella grylli*, *Rickettsiella* sp. de *Ixodes woodi*, un endosimbionte de protozoo *Aquicella siphonis*, *Legionella pneumophila*, *Legionella anisa*, *Methylococcus capsulatus*, y *Escherichia coli* K-12.

Figura 2. Dendograma de *C. burnetii* (Jasinskas y cols., 2007).



2.2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El nombre de *C. burnetii* (Skerman y cols., 1980), fue puesto en honor a los científicos Cox y Burnet por su contribución al conocimiento de la fiebre Q. Se trata de una pequeña bacteria, parásito intracelular obligado, no capsulada, inmóvil y muy pleomórfica. Su aspecto varía entre coco y bacilar, y sus dimensiones oscilan entre 0,4 y 1 micra de largo, y 0,2 y 0,4 micras de ancho (Baca y Paretsky, 1983; Weiss y Moulder, 1984).

Ha desarrollado una estrategia única que le permite la multiplicación y supervivencia en los fagolisosomas de las células hospedadoras eucariotas (Seshadri y Samuel, 2001), normalmente fagocitos (Moore y cols., 1991). Dentro de éstos la célula hospedadora más usual son los macrófagos (Tissot-Dupont y Raoult, 2008). Para ello, su metabolismo está adaptado para crecer en el interior de estos orgánulos y prolifera en ellos hasta formar vacuolas que se expanden y acaban desplazando periféricamente al núcleo de la célula huésped (Baca y Paretsky, 1983).

El ciclo de vida de *C. burnetii* no está completamente caracterizado, pero tiene al menos dos participantes distintos que varían tanto morfológica como fisiológicamente (Seshadri y Samuel, 2001), similar a lo que ocurre en la Familia *Chlamydiae* (Hackstadt, 1998). Éstas serían las variantes celulares grandes (LCV) y las pequeñas (SCV), considerándose éstas últimas una especie de endospora (Weiss y Moulder, 1984). Por otro lado, Seshadri y Samuel (2001) propusieron un modelo del desarrollo de *C. burnetii* donde se especula que la LCV y la SCV funcionan como una fase logarítmica y estacionaria, respectivamente. También se ha descrito una tercera variante conocida como la variante celular pequeña y densa (SDC) (McCaul y cols., 1981; La Scola y Raoult, 2001).

Además, *C. burnetii* sufre variación de fase similar a la variación lisa/rugosa de algunas bacterias Gram negativas (Weiss y Moulder, 1984). En la naturaleza y en los animales de laboratorio, *C. burnetii* existe mayoritariamente con un fenotipo denominado fase I. La fase II es una forma relativamente avirulenta que se puede obtener en pureza tras repetidos pases de los microorganismos por huevos embrionados o cultivo celular. Esta variación está relacionada con cambios en la capa de lipopolisacáridos (LPS) (Woldehiwet, 2004). Este fenómeno será explicado más adelante en mayor profundidad.

La replicación de *C. burnetii* se realiza por fisión binaria, a juzgar por los estudios ultraestructurales realizados. Ocasionalmente, se ha podido apreciar esta bacteria formando cadenas, lo cual es una evidencia adicional de la existencia de este tipo de replicación (Baca y Paretsky, 1983).

Este microorganismo se puede teñir con los métodos de Giemsa, Machiavello, Giménez y Stamp (Alayo Arrugaeta, 1986). En cuanto a la tinción de Gram, puede comportarse como un germen Gram-positivo o Gram-negativo en función de la técnica empleada. Así, si se utiliza como mordiente el alcohol etílico/yodo puede aparecer como gram-positiva (Gimenez, 1965). No obstante, estudios ultraestructurales evidencian, como veremos más adelante, que esta bacteria es morfológicamente más cercana a los microorganismos gram-negativos (Burton y cols., 1975). Otros métodos de visualización son la inmunofluorescencia y la técnica de la inmunoperoxidasa (Baumgärtner y cols., 1988; Drancourt y Raoult, 1994).

C. burnetii posee una pared celular que se asemeja a la que presentan las bacterias Gram negativas (Burton y cols., 1975; Baca y Paretsky, 1983), con dos membranas, una interior y otra exterior, y una tercera capa electrodensa en el

medio, adherida a la cara interna de la membrana exterior. Esta capa electrodensa está compuesta por peptidoglicanos, aunque en el caso de esta bacteria parece ser resistente a la acción de la lisozima (Burton y cols., 1975). En la membrana exterior estarían emplazados los determinantes antigénicos condicionantes de la variación de fase de este microorganismo. Aparte, posee ribosomas similares a los de un procariota convencional y puede sintetizar proteínas (Baca y Paretsky, 1983).

2.2.3. GENOMA

El genoma de *C. burnetii* tiene un peso molecular medio de unos $1,04 \times 10^9$ daltons (Myers y cols., 1980) y está compuesto por una media de 1600 kilo pares de bases (kpb) (Mallavia, 1991), similar al de las bacterias pertenecientes a la familia *Rickettsiae*, pero con una proporción citosina/guanina en su ADN diferente a la presente en el genoma de los microorganismos pertenecientes a la citada familia. Asimismo, hay que decir que existen variaciones en el tamaño del genoma de los diferentes aislamientos realizados hasta al momento con respecto a *C. burnetii*. Así por ejemplo, el tamaño de la cepa Nine Mile en fase I es de aproximadamente 2,1 Mpb (el genoma cromosómico contaría con 1.195.275 pb y el genoma del plásmido **QpH1** tendría unos 37.393 pb), pero en general, el genoma de las diferentes cepas pertenecientes a este género tienen un tamaño situado entre 1,5 y 2,4 Mpb.

El genoma de *C. burnetii*, al contrario de lo que se pensaba tras una serie de estudios iniciales, no es lineal (como proponían Willen y cols., 1998) sino circular (Seshadri y cols., 2003). Además, tras la secuenciación del genoma del aislamiento Nine Mile RSA493, se sabe que este genoma codifica un número aproximado de 2.134 genes, de los cuales, 719 (el 33,7%) corresponden a proteínas hipotéticas que no tienen similitud con ninguna proteína secuenciada hasta el momento, lo cual significa una alta proporción de genoma no viable para la transducción si lo comparamos con otras bacterias pertenecientes al grupo de las gamma-proteobacterias (Seshadri y cols., 2003).

Además de la secuenciación completa de la cepa Nine Mile RSA493, se ha realizado secuenciaciones completas de los genomas de las cepas K (Q154) y G (Q212) aisladas a partir de casos de endocarditis por fiebre Q crónica en humana y de la cepa atenuada Dugway (5J108-111), aislada a partir de un roedor (Beare y cols., 2008). En la comparación que se establece en dicho estudio con el genoma previamente secuenciado de la cepa Nine Mile RSA493, se llega a la conclusión de

que características del genoma de las diferentes cepas de *Coxiella burnetii* secuenciadas hasta ahora como la presencia de numerosas secuencias de inserción, de reordenamientos en el genoma o la presencia de pseudogenes coinciden con una estructura del genoma típica de otras especies de bacterias patógenas que han emergido a partir de especies bacterianas no patógenas que contaban con una amplia distribución en la naturaleza, ocupando un alta variedad de nichos (Beare y cols., 2006).

Por otra parte, se ha identificado una endonucleasa en el genoma de la cepa Nine Mile de *C. burnetii* cuyo funcionamiento es muy similar a las endonucleasas intron asociadas al ARNr encontradas para determinados orgánulos de organismos eucariotas unicelulares, no habiendo sido encontrado este tipo de endonucleasas en el genoma de la mayor parte del resto de organismos procariotas ni en el genoma nuclear de las células eucariotas. Esto hace pensar que un antecesor común de *C. burnetii* (gamma-proteobacteria), de las mitocondrias (alfa-proteobacterias) y de los cloroplastos (cyanobacteria) tuviera codificada este tipo de endonucleasa en su genoma y que tras numerosas generaciones este gen se perdió. Otra posibilidad, menos probable, consiste en la hipótesis de que alguno de estos linajes recibió dicho gen mediante un fenómeno de transferencia horizontal. Esta última hipótesis se sustenta en el hecho de que dicho gen está situado en una región móvil o susceptible de ser transferida lateralmente, pero en la actualidad no se tienen datos que demuestren esta posibilidad (Afseth y Mallavia, 1995; Belfort y Roberts, 1997).

En principio y a la luz de las primeras investigaciones basadas en la realización de pruebas de hibridación ADN-ADN a diferentes aislamientos de *C. burnetii* obtenidos de diferentes localizaciones geográficas, se pensaba que existía un grado de heterogeneidad bajo (Vodkin y cols., 1986). En este sentido, cuando 38 aislamientos de *C. burnetii* fueron sometidos a análisis de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) se creó una clasificación que contaba con 6 grupos genómicos (del I al VI) (Hendrix y cols., 1991). Análisis genómicos posteriores utilizando las enzimas de restricción específicas *NotI* y *SfiI* y sometiendo a los fragmentos de restricción resultantes a la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), dieron como resultado la existencia de 4 grupos genómicos que se correspondían con los grupos I, IV, V y VI anteriormente citados (Heinzen y cols., 1990). Finalmente, y tras el análisis de un total de 80 aislamientos de *C. burnetii* realizados en diferentes regiones del mundo utilizando la enzima *NotI* y la técnica PFGE, fueron observados 16 grupos de restricción adicionales (Thiele y cols., 1993; Willems y cols., 1996).

Tabla 4. Características generales del genoma de *C. burnetii* Nine Mile RSA493 (Seshadri y cols., 2003).

		CROMOSOMA	PLÁSMIDO QpH1
Tamaño (pb)		1.995.275	37.393
Contenido G + C (%)		42,6	39,3
Genes que codifican proteínas (expresado en número):	Similares a proteínas conocidas	1.022	11
	Similares a proteínas conocidas secuenciadas previamente a las que no se han atribuido función	179	5
	Hipotéticas proteínas conservativas*	200	1
	Proteínas hipotéticas**	693	23
	Suma total	2.094	40
	Media del tamaño de los OFR (pb)	849	736
	Secuenciado (%)	89,10	78,80
ARN	ARNr	3	0
	ARNt	42	0

*Poseen secuencias similares a la transducción de otros OFR conocidos, pero no cuentan con una evidencia experimental de expresión proteica.

**Proteínas hipotéticas que no cuentan con similitud alguna con otras proteínas secuenciadas.

Posteriormente se desarrolló otra clasificación, basada en el uso de esta metodología (NotI y PFGE), que incluye aislamientos de diferentes orígenes, incluyendo cabras, ovejas y humanos con fiebre Q aguda y crónica. La clasificación resultante muestra que la mayoría de los aislamientos realizados en Francia forman una agrupación separada de los aislamientos realizados en Rusia. El resto de aislamientos analizados forman parte de una agrupación mayor, que se caracteriza por las largas distancias genéticas existentes. De este modo, se logró observar un alto grado de heterogeneidad entre la totalidad de los patrones genómicos derivados de la RFLP obtenidos para *C. burnetii*, un resultado insospechado por otra parte. Las redistribuciones observadas en estos fragmentos de restricción se corresponden con reordenamientos significativos del cromosoma como translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones (Thiele y cols., 1993; Willems y cols., 1996).

Muchas cepas de *C. burnetii* cuentan con plásmidos y las cepas que no los poseen, tienen secuencias homólogas de ADN integradas en su genoma, por lo que se supone que los plásmidos o estas secuencias integradas son imprescindibles para la supervivencia de este microorganismo (Mallavia, 1991). Dichos plásmidos tendrían un tamaño aproximado comprendido entre 36 y 42 kb, y sus funciones son actualmente desconocidas. El primer plásmido que se describió fue el denominado

QpH1 (de 36 kb, del cual se suelen encontrar entre 1 y 3 copias por célula) (Samuel y cols., 1983). La secuencia nucleotídica de este plásmido ya ha sido determinada (Thiele y Willems, 1994). Y ha sido identificado en el genoma de las cepas de *Coxiella* que integran los grupos I, II y III. Posteriormente, se halló la presencia de un nuevo tipo de plásmido presente en el grupo genómico IV (Mallavia, 1991). A este plásmido se le conoce como **QpRS**, y fue encontrado en la cepa *C. burnetii* Priscilla, aislada de muestras que provenían de fetos abortados de ganado caprino. El mismo plásmido fue encontrado a su vez, en muestras aisladas de casos de endocarditis por fiebre Q en la especie humana, siendo todas las cepas aisladas en este caso también pertenecientes al grupo IV. Un tercer plásmido, de 42 kb, al que se conoce como **QpDG**, fue hallado posteriormente en aislamientos de *C. burnetii* pertenecientes al grupo VI, que provenían de roedores salvajes (Mallavia, 1991). No obstante, en aislamientos de cepas de *C. burnetii* que carecían de plásmidos se pudo observar que poseían secuencias homólogas al plásmido **QpRS** en su ADN cromosómico (Savinelli y Mallavia, 1990). Estas secuencias homólogas integradas en el cromosoma de estas bacterias han sido también secuenciadas y clonadas (Willems y cols., 1996). Dichas secuencias fueron halladas en bacterias pertenecientes al grupo V. Más recientemente, se demostró la existencia de un nuevo plásmido de 33 kb en un aislamiento realizado en Francia a partir de un caso de endocarditis humana, y fue nombrado por Valkova y Kazar (1995) como **QpDV**. Todos estos plásmidos tienen una región de 30 kb (Mallavia y cols., 1991), que es específica para cada tipo de plásmido y que ya han sido caracterizadas (Minnick y cols., 1990; Minnick y cols., 1990b).

Parece ser que estas diferencias en el genoma existentes entre los aislamientos de los diferentes grupos genómicos citados, estarían relacionadas con la patogenicidad de esta bacteria, lo cual, a su vez, podría venir determinado por la posesión de diferentes plásmidos. Así, los grupos genómicos I, II, III, aislados de garrapatas y animales, y que poseen el plásmido **QpH1**, causarían fiebre Q aguda en humanos, en tanto que las cepas englobadas en los grupos IV y V, corresponderían a casos asociados a endocarditis y abortos en ovino y caprino. El grupo VI ha sido encontrado en roedores silvestres del estado de Utah (E.E.U.U.) y por ahora se desconoce su virulencia (Heinzen y cols., 1990; Hendrix y cols., 1991). Reuniendo estos datos se ha planteado una clasificación por grupos genómicos de las diferentes cepas de *C. burnetii*, vinculándolas, provisionalmente, a formas específicas de enfermedad humana según la diversa dotación plasmídica. Esta clasificación se expone en la siguiente tabla.

Tabla 5. Relación entre la dotación genómica de diferentes aislamientos de *C. burnetii* y las manifestaciones clínicas encontradas (Pascual, 1994).

GRUPO GENÓMICO	NOMBRE DEL GRUPO	CEPA DE REFERENCIA	ENFERMEDAD HUMANA	PLÁSMIDO	
				NOMBRE	Kb
I	HAMILTON	Nine Mile	AGUDA	QpH1	36
II	VACCA	Henzerling	AGUDA	QpH1	36
III	RASCHE	Koka	AGUDA	QpH1	36
IV	BIOTZERE	Priscila	CRÓNICA	QpRS	39
V	CORAZON	S, Ko	CRÓNICA	-	-
VI	DOD	-	-	QpDG	51
VII	-	-	CRÓNICA	QpDV	33

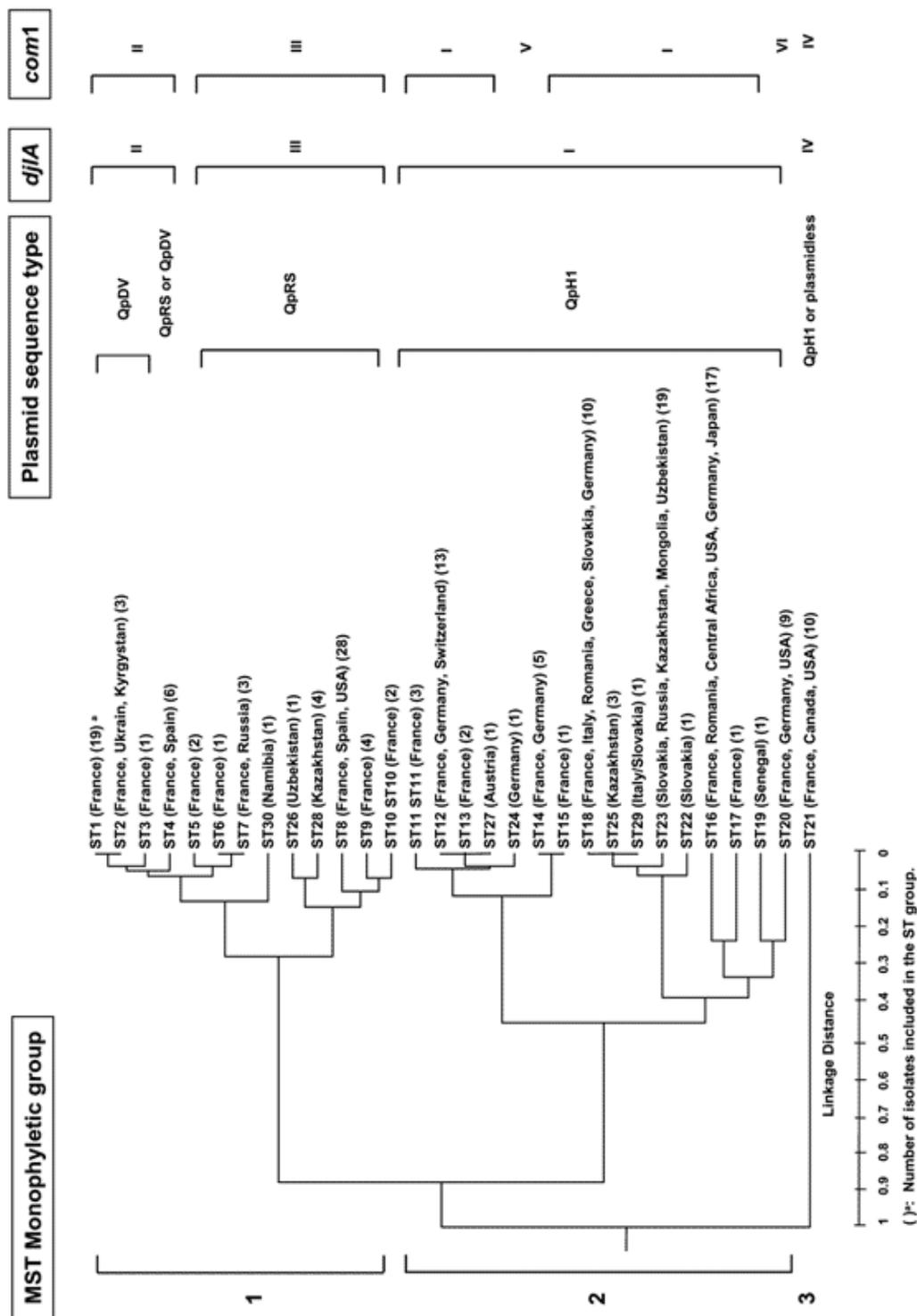
Si bien, esta teoría que insinúa la existencia de una relación entre la patogenia y la dotación genómica de las diferentes cepas de *Coxiella burnetii* ha sido puesta en duda en varios trabajos (Stein y Raoult, 1993; Thiele y Willems, 1994). De hecho, hay investigaciones que sugieren que los factores de predisposición a la enfermedad por parte de los hospedadores serían de mayor importancia que la variabilidad genética existente entre los diferentes aislamientos de *C. burnetii* a la hora de producir cuadros de fiebre Q aguda o crónica en humanos. Estudios recientes basados en experimentación animal con roedores relacionan la variación del LPS y la variación plasmídica existente entre diferentes cepas con las diferencias en las manifestaciones clínicas presentes durante la infección aguda (Glazunova y cols., 2005; Stein y cols., 2005; Beare y cols., 2006).

En un análisis comparativo con otros patógenos intracelulares, *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Mycobacterium leprae*, se puede apreciar que éstos comparten determinadas características como son un reducido metabolismo, así como una reducida capacidad de transporte de sustancias y la ausencia de elementos móviles en el genoma. A pesar de que *C. burnetii* presenta un ciclo vital y unas estrategias parasitarias similares, en parte, a estas bacterias, su genoma difiere considerablemente. Particularmente, difiere en la presencia de elementos móviles en el genoma, en la extensión de regiones del genoma susceptibles de reducción, además de diferir en las capacidades metabólicas y de transporte de sustancias. Lógicamente, el nicho donde *C. burnetii* realiza gran parte de su ciclo vital (el interior de los fagolisosomas) es diferente al medio donde se desarrollan las otras bacterias nombradas anteriormente. Esto hace que el genoma de *C. burnetii* presente una serie de diferencias claras con respecto a dichas bacterias:

A. Secuencias de inserción: El genoma de otros parásitos intracelulares se caracteriza por la escasa presencia de secuencias de inserción (Stephens y cols., 1998; Tamas y cols., 2002). Esto puede ser debido a la escasa posibilidad de estas bacterias de realizar procesos de transferencia de genes y contrasta con el genoma de *C. burnetii*, el cual cuenta con 29 secuencias de inserción de las cuales 21 pertenecen a un único tipo de secuencia de inserción **IS1111** (Houver, 1992), cinco a la **IS30** y tres son de la familia de elementos **ISAs1**. Por otra parte, cuenta con tres genes de transposición degenerados de linaje desconocido. Los genes de transposición cuentan con una secuencia de ADN idéntica en más de un 99 % a la totalidad del grupo, lo cual sugiere la reciente introducción y extensión de cada uno de estos elementos de inserción en el genoma o una homogenización de los genomas del grupo debido a una evolución concertada como ocurre en el caso de los genes relacionados con el ARNr (Liao, 2000).

En *C. burnetii*, estas secuencias de inserción están dispersas por el genoma y no se encuentran en regiones próximas o relacionadas entre sí, ni tampoco se pueden encontrar en los plásmidos. Aunque esto es una evidencia de que las mismas pueden haber sido recientemente introducidas en su genoma, en algunos casos elementos idénticos de inserción rodean grupos de genes que conforman las denominadas "islas de patogenicidad" (Hacker y cols., 1997). Estas islas de patogenicidad potenciales estarían flanqueadas por las secuencias de inserción **IS1111** (concretamente, las secuencias **CBU1208** y **CBU1186**). Esta región incluye una secuencia que codifica para una supuesta proteína que transportaría múltiples sustancias (secuencia **CBU1208**), otra que codificaría para una reductasa de esteroides (**CBU1206**), y otras secuencias que codifican para multitud de proteínas hipotéticas.

Figura 3. Dendrograma de *C. burnetii* atendiendo a los diversos grupos genómicos y a la dotación de plásmidos de diversos aislamientos de distintas regiones (Glazunova y cols., 2005).



B. Regiones del genoma susceptibles de sufrir un proceso de reducción: El análisis del genoma de *C. burnetii* muestra la presencia de 83 "pseudogenes" (genes interrumpidos por una o más translocaciones y/o mutaciones puntuales o, en algunos casos, fragmentos truncados) que sugieren la posibilidad de reducción del genoma en determinadas regiones. La evolución hacia la reducción del genoma es un fenómeno común en muchos parásitos intracelulares. Este proceso consiste en que genes que tienen funciones importantes para la supervivencia del microorganismo acumulan mutaciones y desaparecen eventualmente de la población bacteriana debido a que no sufren una presión selectiva importante en el medio en el que se desarrollan (por ejemplo, el nicho del organismo en el que se desarrollan ha cambiado y es más permisivo) o bien porque un fenómeno ligado a nivel de población de estos microorganismos conduce a inhabilitar el mantenimiento de determinados genes ante un proceso de selección débil (como lo sugerido en el modelo de Müller sobre las ventajas evolutivas de la recombinación) (Haigh, 1978). Como muchos de los pseudogenes son interrumpidos por una simple translocación, esto hace pensar que son de origen reciente (como se ha sugerido para microorganismos como *Salmonella typhimurium*) (McClelland y cols., 2001). Además, si comparamos el genoma de *C. burnetii* con el de otras bacterias que poseen amplias regiones susceptibles de reducción, tales como *Rickettsia prowazekii* y *Mycobacterium leprae*, vemos que el porcentaje del genoma de *C. burnetii* que tiene capacidad para codificar correctamente es del 89,1 % frente a aproximadamente el 76 % de estos otros microorganismos, lo cual hace pensar que el proceso de reducción genómica es un fenómeno reciente en la evolución de este microorganismo o bien que no es tan certero como ocurre en otras especies.

Los pseudogenes están siempre presentes en determinadas características y roles de la bacteria (por ejemplo, en la producción de toxinas y capacidad de resistencia, transporte de sustancias, etc...), sugiriendo que la eliminación de las funciones de la bacteria ligadas a dichas regiones del genoma no revisten gran importancia para el desarrollo de su ciclo vital en determinadas condiciones. Cabe resaltar la existencia de translocaciones en regiones relacionadas con determinadas β -lactamasas, relacionadas éstas a su vez con la resistencia a antibióticos β -lactámicos. En el caso concreto del aislamiento Nine Mile de *C. burnetii* se ha podido apreciar que es sensible a muchos antibióticos, existiendo otros aislamientos relacionados con casos crónicos de fiebre Q que presentan una mayor resistencia a estas drogas (Yeaman y Baca, 1990).

C. Transporte de sustancias y metabolismo. El contenido en información genética relativa a transportadores de sustancias, refleja ampliamente el nicho extremo en el que se desarrolla *C. burnetii* durante su ciclo intracelular en el interior de los fagolisosomas. Se han encontrado secuencias que posibilitan la síntesis de cuatro transportadores intercambiadores ión sodio-protón (CBU1590, CBU1259, CBU0459 y CBU 1582-CBU1588) que, probablemente, jueguen un papel importante en el control del pH necesario para preservar la homeostasis y la supervivencia en el interior de los fagolisosomas, donde hay que convivir con un pH ácido extremo. Igualmente, se han podido identificar las secuencias que codifican para tres canales mecanosensitivos de iones y de tres transportadores necesarios para proteger a esta bacteria del fuerte estrés osmótico. Más de una cuarta parte de los transportadores en *C. burnetii* son sistemas orientados al transporte de este tipo de sustancias. Una de las funciones de estas bombas para el flujo de sustancias sería la de actuar como un mecanismo de defensa ante la producción de antimicrobianos por parte del hospedador en el interior de los fagolisosomas y una amplia proporción de los mismos son comunes para muchas proteobacterias. También pueden tener una función asociada a la excreción de metabolitos secundarios, ya que, la mayoría de los genes que son necesarios para la biosíntesis de estos metabolitos están codificados en el genoma de *C. burnetii*; más, muchos de estos genes son pseudogenes (Seshadri y cols., 2003).

C. burnetii posee una mayor capacidad de transporte para nutrientes orgánicos que otras bacterias como las chlamydias y rickettsias. Estas capacidades están limitadas si las comparamos con aquellas que puede mostrar la bacteria cuando se encuentra desarrollando su ciclo vital fuera del hospedador. Curiosamente, tan solo dos sistemas de transporte de azúcares han sido identificados: sistemas protón-controlados para la xilosa (CBU0347) y para la glucosa (CBU0265). La presencia de 15 transportadores de aminoácidos y de tres para péptidos sugiere que ésta puede ser la vía dominante para la entrada de compuestos orgánicos para *C. burnetii*, estando esto en concordancia con lo que exige el medio interno de los fagolisosomas. Otra diferencia entre *C. burnetii* y las bacterias pertenecientes a especies de rickettsias y chlamydias es que *C. burnetii* no tiene ningún sistema intercambiador de ATP/ADP que funcione como un mecanismo que le permita a esta bacteria obtener energía en forma de ATP a partir de su hospedador (Zomorodipour y Andersson, 1999), hallazgo confirmado por los resultados de ensayos experimentales sobre este tema que se habían desarrollado con anterioridad (Miller y Thompson, 2002).

Asimismo, esta bacteria posee una mayor capacidad de biosíntesis que otras bacterias de ciclo intracelular, que han reducido esta capacidad como resultado de una adaptación y ello se acompaña, por tanto, de un incremento de la dependencia con respecto a los sustratos obtenidos del hospedador (Andersson y Kurland, 1998). *C. burnetii* posee las enzimas para la glucólisis, la ruta de Entner-Doudoroff, el transporte electrónico, la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, la gluconeogénesis, la ruta de la fosfato-pentosa y el ciclo del ácido tricarbóxico (ATC). Por el contrario, el ciclo del glioxilato (presente en bacterias como *E. coli*) no lo encontramos entre las capacidades metabólicas de *C. burnetii*, siendo probablemente debido a la capacidad bien desarrollada de esta bacteria para adquirir aminoácidos del medio (Seshadri y cols., 2003).

Por su parte, las rutas para la síntesis de purinas y pirimidinas, así como las necesarias para la creación de los fosfolípidos, los ácidos grasos y los cofactores (como la biotina y el ácido fólico) han sido también encontradas para *C. burnetii*. La ruta del gliceraldehído-3-fosfato (GAP) piruvato para la síntesis de isopentil difosfato (IPP) descrita para la mayoría de las bacterias Gram-negativas no la encontramos en el caso de *C. burnetii*, lo que sugiere que la síntesis de IPP es llevada a cabo por esta bacteria utilizando únicamente la ruta del mevalonato como es típico en las bacterias Gram-positivas y las arqueas (Seshadri y cols., 2003).

Las características anabólicas de *C. burnetii* no están del todo claras ya que, como se ha estudiado previamente, deberían ser auxótrofas para 11 aminoácidos. No obstante, estudiando el genoma se ha encontrado que varias de las rutas precisas para la síntesis de estos aminoácidos están ausentes en su totalidad y en el resto de rutas, faltan las secuencias necesarias para codificar determinados enzimas claves para las mismas. Se cree que, probablemente, la presencia de transportadores de aminoácidos compense estas deficiencias, logrando adquirir estos aminoácidos del hospedador (Seshadri y cols., 2003).

Resulta de interés la supuesta convergencia evolutiva de *C. burnetii* y, de especies de clamidia y de rickettsias en cuanto a la reducción parcial de determinados pasos enzimáticos en la biosíntesis del triptófano y la lisina, lo que sugiere que *C. burnetii* es auxótrofa para la lisina. El triptófano es sintetizado a partir de metabolitos intermediarios obtenidos a partir del hospedador, como ocurre en el caso de la familia *Chlamidiae* (Fehlner-Gardner y cols., 2002; Xie y cols., 2002). La capacidad de las clamidias para adquirir estos metabolitos intermedios a partir del hospedador (liberando estos metabolitos aprovechando la degradación del triptófano

inducida por el sistema de defensa γ -interferón del hospedador) y la subsecuente reutilización de estos metabolitos para la síntesis de triptófano está considerada como una estrategia evolutiva que aumenta la virulencia de este tipo de patógenos (Xie y cols., 2002).

El análisis del genoma de *C. burnetii* revela la existencia de rutas para la utilización de algunos azúcares (glucosa, galactosa y xilosa) y glicerol (no habiéndose identificado ningún transportador para importar glicerol desde el medio externo). El contenido de las vacuolas parasitadas por esta bacteria no está bien definido: como es lógico, se sabe que en los fagolisosomas existen varios enzimas que intervienen en la degradación de los polisacáridos (Barret, 1984), y como consecuencia de esto, el medio interno de los fagolisosomas es rico en azúcares libres. A su vez, no se entiende muy bien como *C. burnetii*, siendo una bacteria con una fuerte habilidad para sobrevivir en el medio extracelular (por largos periodos de tiempo), no dispone de rutas metabólicas para la síntesis de sustancias de almacenamiento como el glucógeno, la trealosa o el polihidroxitirato (Seshadri y cols., 2003).

C. burnetii posee en su genoma cierto número de genes que son similares a determinados genes eucariotas, que sin embargo, no han podido ser identificados en otros genomas procariotas ya secuenciados, como es el caso del gen que codifica para una desaturasa (CBU0920) que ha de jugar un papel importante en la síntesis de diversos ácidos grasos saturados e insaturados. También se han podido identificar los genes que secuencian para dos esterol reductasas (CBU1206 y CBU1158) relacionadas con la síntesis del colesterol en organismos eucariotas. De hecho, en un estudio reciente (Moliner y cols., 2009), se ha logrado secuenciar un gen que codifica para una esterol reductasa (la delta-7-reductasa) a partir del genoma de la para una esterol reductasa (la delta-7-reductasa) a partir del genoma de la *Legionella (L.) drancourtii* (una especie descubierta recientemente y que parasita amebas). Los autores de este trabajo han hipotetizado sobre la posibilidad de que dicho gen, de origen eucariota, haya sido transmitido horizontalmente, siendo la hipótesis evolutiva más lógica, que el primer procariota en adquirirlo fuera un ancestro de las clamidias (parásito vegetal) que, posteriormente, lo transmitiría a las amebas y éstas a su vez, lo transmitirían horizontalmente a bacterias parásitas de amebas como *L. drancourtii* o a *C. burnetii* (Moliner y cols., 2009).

Sin embargo, la ausencia de otros enzimas relacionados con la síntesis del colesterol hace pensar que los mencionados enzimas no participan en la síntesis de esta molécula. Es más probable, sin embargo, que estas esterol reductasas

participen en la conversión de metabolitos tomados del medio externo, concretamente del hospedador, siendo razonable que participen en el tropismo que tiene esta bacteria por la placenta y el tejido del aparato reproductor (Baumgartner y Bachmann, 1992; Maurin y Raoult, 1999). De hecho, se ha demostrado la existencia de una correlación entre los niveles hormonales de las hembras preñadas y el grado de infección por *C. burnetii* (Biberstein y cols., 1974; Rose y cols., 1994).

2.2.4. VARIACIÓN DE FASE Y LIPOPOLISÁRIDO

Como ya hemos mencionado anteriormente, en *C. burnetii* se da un fenómeno de variación antigénica similar al existente en la familia *Enterobacteriaceae* (variación liso/rugoso). Esta variación está relacionada con la existencia de mutaciones que afectan a la síntesis del LPS de cubierta (Hackstadt y cols., 1985; Hackstadt, 1988) y se trata de un fenómeno detectable mediante técnicas serológicas (Stocker y Fiset, 1956; Brezina, 1958).

No existen diferencias morfológicas entre las dos fases de *C. burnetii*, y las dos poseen los mismos plásmidos. Sin embargo, la fase I es patógena, en tanto que la fase II es apatógena en animales inmunocompetentes o poco virulenta. El LPS de la fase I es mucho más complejo que el de la fase II y presenta cadenas laterales largas de azúcares (galactosaminorunil-alfa-1-6-glucosamina, virenosa y dihidroxiestreptosa) que no existen en la fase II (Amano y cols., 1984). Éste es el principal antígeno de *C. burnetii*, que en fase I está ligado al LPS complejo que posee y que además, es determinante de cara a la virulencia de este microorganismo (Schramek y Mayer, 1982). El LPS de la fase II de la bacteria es bioquímica e inmunológicamente diferente. La diferencia estructural parece radicar en la pérdida de los azúcares de las cadenas laterales, lo que daría lugar a un LPS truncado en la fase II (Schramek y Mayer, 1982). Este cambio permitiría que las proteínas de la envoltura, previamente ocultas por el LPS en fase I, queden expuestas. Dichas proteínas constituyen los determinantes antigénicos de la fase II (Hackstadt, 1988).

Determinados estudios muestran que si se realiza un número suficientemente elevado de pases por huevos embrionados, todos los gérmenes pueden pasar de fase I a fase II. Clásicamente, se ha afirmado que si el microorganismo en fase II es reinoculado a un animal, vuelve de nuevo a la fase I. Sin embargo, si esta cepa de coxiella pura en fase II se reinocula a un animal de experimentación, el microorganismo es destruido por fagocitosis inespecífica y ya no se puede recuperar. Por el contrario, si el número de pases por los cultivos celulares es limitado, de modo

que no todas las bacterias hayan variado de fase I a fase II, es posible la recuperación de *C. burnetii* en fase I tras la reinoculación animal (Maurin y Raoult, 1999).

La reversibilidad de fase dependería, por tanto, de que se mantuvieran, poblaciones bacterianas mixtas compuestas de microorganismos en fase II y una pequeña población de microorganismos en fase I, más resistente a la acción del sistema inmune del hospedador, a partir de la cual se restablecería la fase I de la cepa (Maurin y Raoult, 1999).

Por tanto, se piensa que el cambio de fase es, en sí mismo, un proceso irreversible, y vendría condicionado por la existencia de importantes delecciones cromosómicas que afectarían, paulatinamente, a varios pasos de la síntesis de LPS de la cubierta del microorganismo cuando éste prolifera en un ambiente no hostil (Shramek y Mayer, 1982; Ormsbee y cols., 1985; Vodkin y Williams, 1986). Es precisamente este LPS el componente que varía, mientras que la composición proteica de la pared no sufre variación (Shramek y Mayer, 1982).

Desde el punto de vista del trabajo en el laboratorio, el tratamiento de células en fase I mediante ácido tricloroacético extrae el LPS de la envoltura y desenmascara los epítomos antigénicos de la fase II (Hackstadt, 1988). Así se consigue obtener bacterias en fase II de una forma artificial, lo cual es muy útil para disponer de cantidades suficientes de antígeno con fines diagnósticos y, también permite la elaboración de una quimiovacuna.

Existe una analogía entre las fases I y II de *C. burnetii* y la variación lisa/rugosa de la cubierta celular de las enterobacterias, de manera que el LPS de fase I (virulenta), equivaldría al LPS liso y LPS de la fase II (apatógena), equivaldría al rugoso (Baca y Paretsky, 1983; Hackstadt y cols., 1985; Woldehiwet, 2004). Sin embargo, el LPS de cualquiera de las fases de *C. burnetii* muestra mucha menor actividad endotóxica que el de las enterobacterias (entre 100 y 1000 veces menos tóxico que el de *Escherichia coli* o el de *Salmonella typhimurium*) (Amano y cols., 1987; Hackstadt y cols., 1985). En este sentido, existe un estudio en el que se demostró la existencia de un fragmento de restricción (tras la aplicación de la enzima de restricción *NotI*) que ha sido clonado y secuenciado, que es común a todos aislamientos de *C. burnetii* (Willems y cols., 1996). Una región leída de este fragmento muestra una importante analogía con el gen *algC* que codifica para la fosfomanomutasa (PPM) en *Pseudomonas (P.) aeruginosa*. En determinadas especies, esta enzima se ha visto

que está involucrada en la síntesis del LPS y del polisacárido de alginato de superficie (Zielinski y cols., 1991). En el caso de *P. aeruginosa*, si tiene actividad la PPM se corresponde con el fenotipo liso, mientras que si la PPM no tiene actividad debido a la existencia de mutaciones en el gen *algC*, se corresponde con el fenotipo rugoso (Zielinski y cols., 1991; Willems y cols., 1996; Maurin y Raoult, 1999).

Se ha observado que existen diferencias estructurales y antigénicas entre los LPS de distintas cepas de *C. burnetii* en fase I. Como en el caso de los plásmidos, se ha intentado vincular estas diferencias con la presencia de las formas agudas o crónicas de la enfermedad (Hackstadt, 1986; Stein y cols., 2005; Beare y cols., 2006).

Por último, se han comparado las regiones del genoma de diferentes aislamientos de referencia que codifican para el antígeno O (el polisacárido verinosa) del LPS de cubierta de *C. burnetii* mediante PCR. En dicho estudio se incluyeron 5 aislamientos en fase I (Nine Mile clone 7, KAV, Ohio, Henzerling RSA 343, Q173), en cuyos genomas no se observaron deleciones en las regiones que codifican para este antígeno. En otros dos aislamientos en los que no se identificó la fase evolutiva en la que se encontraban (Scottish, WAV) tampoco se logró identificar deleción alguna en las mencionadas regiones genómicas. Sin embargo, en el aislamiento RSA 514 (con fase evolutiva desconocida) y otros tres aislamientos más en fase II (Nine Mile clone 4, Nine Mile clon 1 y en Nine Mile Baca) se observó la presencia de grandes deleciones en dichas regiones genómicas. Una selección de ORFs de los genomas de los aislamientos australianos QD y M44 fue secuenciada con el fin de detectar posibles mutaciones, pero no se observaron diferencias significativas. Asimismo, al citado aislamiento QD le fueron analizados mediante PCR-transcriptasa específica 4 fragmentos operones de restricción u OFRs que hipotéticamente codifican para el antígeno O, para el que este aislamiento se había mostrado deficitario, como es el caso de uno de estos OFRs que codificaba para parte del sistema de transporte para el antígeno O. Todos los genes analizados eran expresados por el aislamiento en cuestión (Denison y cols., 2007a).

2.3. CICLO EVOLUTIVO DE *Coxiella burnetii*

“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir”

Albert Einstein

2.3.1. CÉLULAS SUSCEPTIBLES DE SER INFECTADAS

C. burnetii tiene la capacidad de crecer en el interior de numerosos tipos de células de entre las cuales estarían diferentes líneas de macrófagos de ratón (incluidas las líneas celulares P388D1 y J774), fibroblastos (incluyendo la línea L929) y las células Vero (Baca y cols. 1981; Hackstadt y Williams, 1981; Akporiaye y cols., 1983; Baca y cols. 1985; Maurin y cols., 1992; Maurin y Raoult, 1999). Los huevos embrionados y diversos animales de laboratorio tales como cobayas y líneas de ratones de experimentación han sido ampliamente utilizados para la multiplicación de estos microorganismos *in vivo*.

Cuando la infección tiene lugar por vía respiratoria, se supone que las primeras células en ser infectadas durante la fase aguda de la enfermedad son los macrófagos alveolares (Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Las células hepáticas de Kupffer son susceptibles de ser parasitadas por vía sanguínea, especulándose también, que la fuente de infección de estas células pueda provenir de la vía digestiva. Esta última afirmación se basa, por un lado, en estudios de experimentación animal en los que la inoculación de *C. burnetii* vía intraperitoneal ha conducido a la formación de cuadros hepáticos, mientras que la infección vía aerógena conducía a la formación de cuadros neumónicos con más frecuencia, si bien, también se producían cuadros hepáticos en los animales inoculados por esta última vía (Marrie y cols., 1996; La Scola y cols., 1997). Por otro lado, hay estudios observacionales que relacionan la presencia de casos clínicos de fiebre Q y la aparición de brotes epidémicos de la enfermedad asociados a la ingesta de leche y productos lácteos (quesos) no sometidos a pasterización (Benson y cols., 1963; Krumbiegel y Wisniewski, 1970; Fishbein y Raoult, 1992; Maltezou y cols., 2004).

Sin embargo, ha de tenerse en cuenta que la vía de inoculación intraperitoneal difiere mucho de la vía oral. En la primera, no se sobrepasa la barrera gástrica, ni el patógeno inoculado ha de competir con las bacterias que conforman la población saprófita del animal y no existen peristaltismos ni otras barreras defensivas como las placas de Peyer, que sí están presentes en el aparato digestivo. Además, hay que

tener en cuenta que en la cavidad peritoneal la respuesta inmune está mediada por las células B1 o monocitos que migran a dicha cavidad para hacer frente a reacciones inflamatorias inespecíficas. Dichas células, se han mostrado más susceptibles a la infección por *C. burnetii* y se caracterizan por su mayor producción de IL-10, mecanismo que favorece al desarrollo de la infección por *C. burnetii* (Popi y cols., 2009).

De hecho, un ejemplo de la dificultad de reproducir la enfermedad por vía oral, la tenemos en un estudio experimental realizado con pollos de engorde libres de patógenos específicos (SPF). En este trabajo, se evaluó la aplicación de piensos líquidos acidificados mediante fermentación como preventivo de la colonización e infección intestinal y del contagio de *Salmonella (S.) enteritidis* (patógeno intestinal cuyo lipopolisacárido de cubierta tiene una capacidad patogénica muy superior al de *C. burnetii*). Se observó que la eficacia de esta estrategia se veía limitada, ya que estos animales no se contagiaban vía oral, sino que lo hacían por vía aerógena, con lo que, *S. enteritidis* llegaba al ciego vía sistémica. Este hecho hacía que los animales se convirtieran en portadores excretores de esta bacteria en heces, con lo cual, la estrategia de acidificación de los piensos no lograba actuar en estos animales como preventivo de cara a la transmisión de la enfermedad vía oral (Amano y cols., 1987; Heres y cols., 2003).

2.3.2. CICLO INTRACELULAR Y PROCESO SIMILAR A LA CREACIÓN DE ENDOSPORAS

C. burnetii desarrolla un complejo ciclo intracelular que se caracteriza por la formación de estructuras que recuerdan a las endosporas presentes en algunas bacterias Gram positivas (McCaul, 1991). Estas fases evolutivas características de *C. burnetii* han sido observadas tanto en las células hospedadoras como tras su purificación y se han clasificado en tres tipos de variantes morfológicas: "large-cell variant" (LCV); "small-cell variant" (SCV); "small-dense cell variant" (SDC). Las primeras observaciones sobre este fenómeno fueron realizadas mediante el examen por microscopía electrónica (McCaul y cols., 1991). Las variantes LCV y SCV se pueden apreciar en cultivos celulares donde la infección es persistente (Nermut y cols., 1968; Canonico y cols., 1972; Wiebe y cols., 1972; Wachter y cols., 1975).

Las mencionadas formas de *C. burnetii* se corresponden a diferentes fases de desarrollo de esta bacteria durante su ciclo intracelular (McCaul y cols., 1991) y

pueden ser diferenciadas por su morfología, tamaño, contenido en peptidoglicano, y su resistencia a la presión osmótica. Las LCVs miden más de 2 μm de largo y presentan determinadas características similares a las bacterias Gram-negativas, son más pleomórficas, redondeadas, granulares y, en algunas ocasiones, presentan un citoplasma fibrilar con un nucleoide disperso y filamentoso. También se caracterizan por tener una cromatina difusa, por distinguirse una membrana externa y otra citoplasmática y por presentar de manera visible el lipopolisacárido en la superficie de la membrana externa. Por otra parte, las LCV son menos electrodenudas que las otras dos variantes (McCaul y cols., 1981; McCaul y Williams, 1981; Amano y cols., 1987; Heinzen y cols., 1999).

Las SCVs y las SDCs tienen un tamaño aproximado de 204–450 nm y su forma es coco bacilar, con unas paredes que se tiñen fuertemente y nucleoides electrodenudos. Ambas variantes se parecen morfológicamente pero la SDC se distingue por su mayor estabilidad física (McCaul y cols., 1981; Amano y cols., 1984). Las SDCs se han podido detectar en el interior de las LCVs como estructuras que recuerdan a las endosporas de los microorganismos Gram positivos y probablemente sean liberadas al medio por un proceso de lisis de la LCV o bien por un proceso de fisión binaria transversal acompañado de una división celular desigual (McCaul y cols., 1981). Otra característica de las SDC es que nunca han podido ser aisladas ni purificadas mediante cultivo celular, con lo cual, para su estudio se ha tenido que recurrir a un modelo experimental que simula la parasitación por *C. burnetii* de las amebas en la naturaleza, con lo cual, se cree que éste pueda ser un nicho importante para el mantenimiento de esta bacteria en la naturaleza (La Scola y Raoult, 2001). La fisión binaria transversal ha sido observada tanto para las SCVs como para las LCVs en cultivos celulares.

A las SCVs y las SDCs se las considera como las formas de resistencia tanto dentro del hospedador como en el medio externo. De hecho, se ha observado que resisten ampliamente a la radiación ultravioleta, al calor, a la sonicación, a la presión y al estrés osmótico y oxidativo (Amano y Williams, 1984b). Esta capacidad de resistencia le confiere a *C. burnetii* el mantenerse con capacidad infectante en el medio externo al menos 150 días, si bien como se verá más adelante, en determinadas condiciones este periodo de tiempo puede ser mayor (Welsh y cols., 1957).

El proceso de diferenciación de *C. burnetii* en las citadas variantes no se ha podido dilucidar completamente aún debido a que no se han podido identificar a

determinados marcadores específicos involucrados en estos procesos. En este sentido, el proceso que media en la transformación de la SCV a LCV en el hospedador parece estar bien documentado (Howe y Mallavia, 2000), pero el estrés que origina la formación de las SCVs y las SDCs no ha sido clarificado. Por tanto, aun se desconoce qué marcadores externos y celulares influyen en este proceso de transformación. Por otra parte, se desconoce la variante en la que la bacteria es eliminada al medio en la leche, las heces o en las placentas. La forma en la que es excretada al medio *C. burnetii* es fundamental a la hora de aplicar medidas de lucha y control contra la fiebre Q (Arricau-Boiuveri y Rodolakis, 2005).

2.3.3. MECANISMOS DE *Coxiella burnetii* PARA ENTRAR EN LAS CÉLULAS EUCARIOTAS

Las estrategias de adhesión e invasión de la célula hospedadora son críticas para el éxito de la colonización en los estadios iniciales de la infección. Tras la secuenciación del genoma de *C. burnetii*, se ha determinado que este microorganismo carece de los genes involucrados en la síntesis de las típicas estructuras diseñadas para la adhesión existentes en otras bacterias, como es el caso del pili y otras adhesinas. En su lugar, el genoma de *C. burnetii* cuenta con 13 tipos de anquirinas o proteínas que logran que el citoesqueleto de la membrana externa interactúe con la membrana plasmática. De igual modo, se han identificado dominios para las anquirinas en algunos reguladores de transcripción que pueden tener un rol en la alteración de la expresión génica, tal y como ha sido sugerido para las especies de *Ehrlichia*. Es más, un número de dominios para las anquirinas tan grande como el detectado para *C. burnetii* no se había detectado nunca en ninguno de los genomas bacterianos secuenciados hasta ahora (Caturegli y cols., 2000; Seshadri y cols., 2003).

Los reordenamientos de las anquirinas deben desempeñar un papel importante en el proceso de internalización de *C. burnetii* en la célula hospedadora. Dichos reordenamientos pueden ser mediados por la acción de una tirosin-GTPasa fosforilada (CBU08884) que puede actuar como reguladora análoga al sistema BipA presente en las cepas de *E. coli* enteropatógenas, sistema que actúa como activador de los reordenamientos del citoesqueleto en dichas bacterias (Farris y cols., 1998; Seshadri y cols., 2003).

Los parásitos intracelulares en general utilizan receptores específicos de las células eucariotas, como es el caso de las integrinas, para invadir a las células

hospedadoras. Algunos de estos agentes, incluidos *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium tuberculosis*, usan el CR3 como receptor de entrada para los fagocitos, como es el caso también de la fase II de *C. burnetii*, además de las integrinas (Mege y cols., 1997; Meconi y cols., 1998; Capo y cols., 1999).

Sin embargo, la fase I o fase virulenta de *C. burnetii* bloquea el sistema de entrada basado en el receptor CR3 de los monocitos humanos y obliga a los mismos a utilizar la vía del complejo de integrinas fomentadoras de la respuesta de los leucocitos y del complejo de proteínas asociadas a las integrinas. La entrada a los monocitos y macrófagos por parte de la fase I de *C. burnetii* es escasa, pero estas bacterias son capaces de sobrevivir en el interior de las mencionadas células hospedadoras. Sin embargo, la entrada en los monocitos y macrófagos por parte de *C. burnetii* en fase II es importante, pero estas bacterias son exterminadas rápidamente por el sistema fagolisosomal de estas células. Por ello, es muy probable que el sistema de entrada a las células hospedadoras utilizado por parte de las diferentes fases de *C. burnetii* tenga que ver con la supervivencia en el interior de la célula hospedadora. Esta estrategia no se ha observado hasta ahora en ningún otro microorganismo parásito intracelular (Mege y cols., 1997; Meconi y cols., 1998; Capo y cols., 1999).

Un estudio ha demostrado la importancia del lipopolisacárido de cubierta de *C. burnetii* en el proceso de internalización mediante fagocitosis, mostrando que la internalización en la célula hospedadora de la fase I o virulenta de *C. burnetii* está relacionada con la presencia de receptores TLR-4. Este proceso no se produce con la fase II de *C. burnetii*. Por otra parte, parece ser que estos receptores intervienen en una reorganización de los filamentos de actina de la membrana de los macrófagos, no influyendo dichos receptores en el proceso evolutivo del fagolisoma. Por otra parte, se demostró *in vivo* que en los ratones deficitarios de estos receptores, la formación de granulomas en el hígado (indicador de reacción inmune ante *C. burnetii*) fue menor que la detectada en ratones no manipulados genéticamente, con lo cual, estos receptores deben de estar también involucrados en el aumento en la producción de linfoquinas (Honstetter y cols., 2004).

Sin embargo, en otro estudio de características similares, se demostró que los receptores TLR-2 no influyen tanto en el proceso de internalización, pero sí lo hacen en el proceso inmune, lo cual ha sido constatado porque los ratones no manipulados genéticamente mostraban una mayor formación de granulomas hepáticos que los ratones deficitarios en dicho receptor (Meghari y cols. 2005).

Por otra parte, se ha observado en experimentos con modelos *in vivo* e *in vitro* que la presencia en el medio de agonistas de los receptores tipo Toll (TLR) promueven la fagocitosis de *C. burnetii* en fase II. Concretamente, la presencia en el medio del lipopolisacárido de cubierta (agonista, como se ha visto, del TLR4) y del lipopéptido fibroblasto-estimulante1 (agonista de los receptores FSL1 y del TLR2) inducen, *in vitro*, la activación de los macrófagos y la fagocitosis y aniquilación de *C. burnetii* en fase II. Dicha activación inmune se produce también *in vivo* tras la estimulación del receptor FSL1 al igual que para los otros dos receptores. También se ha observado que en presencia de securinina, un antagonista del receptor del ácido gamma-aminobutírico tipo A, se induce una activación de los macrófagos independiente de los receptores TLR que provoca la secreción de IL-8, una disminución en la regulación de la L-selectina, y un aumento en la regulación de los antígenos CD11b (componente de varias integrinas) y del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, lo que conduce al aumento de la fagocitosis y de destrucción de la fase II de *C. burnetii* tanto *in vivo* como *in vitro*, al igual que ocurría con la presencia de los agonistas de los receptores TLR (Lubick y cols., 2007).

Muchos de los procesos relacionados con los receptores tipo Toll y la interiorización en la célula hospedadora por parte de *C. burnetii* citados anteriormente en el presente apartado encuentran su explicación en que la activación de las células del sistema inmune por parte del lipopolisacárido de cubierta de las bacterias Gram-negativas depende de la conservación de la estructura primaria del lípido A que forma parte de dicha molécula. En este sentido, se ha observado que la capacidad para inducir la producción de citoquinas en los monocitos humanos es significativamente menor en el caso de la infección por *C. burnetii* si se compara con la infección por otras enterobacterias o con la presentación del lípido A (Toman y cols., 2004). Esto concuerda con lo observado en cuanto a la importancia que el receptor TLR 4 tiene en la fagocitosis, la producción de citoquinas y en la formación de granulomas en experiencias *in vivo*, pero sin embargo, estos mecanismos se han mostrado, por sí solos, incapaces para controlar la infección por *C. burnetii* (Honstetter y cols., 2004). De hecho, el antígeno de la fase I debe tener un efecto enmascarador que protege a la bacteria del reconocimiento por parte de la célula hospedadora, haciendo uso de los receptores TLR2 (Shannon y cols., 2005).

Los receptores tipo Toll no son específicos de determinadas células de los mamíferos, sino que también se han encontrado en diferentes especies de insectos. Este fenómeno puede explicar el éxito de *C. burnetii* en su capacidad para habitar en

un amplio espectro de hospedadores en la naturaleza (Vasselon y Detmers, 2002; Janssens y Beyaert, 2003).

Además de estos mecanismos de internalización en la célula hospedadora, *C. burnetii* cuenta en su genoma con una serie de secuencias homólogas a las detectadas en *L. pneumophila* como los genes *EnhA*, *EnhB* y *EnhC* que se ha observado que están relacionados con la expresión fenotípica en el proceso de internalización de *Coxiella* en la célula hospedadora interactuando con señales provenientes del medio externo en forma de péptidos creados por las células del hospedador (Cirillo y cols., 2000; Seshadri y cols., 2003).

2.3.4. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR Y REPLICACIÓN BACTERIANA

Tras su entrada en la célula hospedadora, *C. burnetii* resulta capturada por los fagosomas, los cuales, se unen rápidamente a los lisosomas, formando los fagolisosomas. Estos fagolisosomas se unen rápidamente entre ellos. Esta fusión progresiva de los fagolisosomas conduce a la formación de una gran y única vacuola en el interior de la célula hospedadora (Hackstadt y Williams, 1981).

C. burnetii se ha adaptado para sobrevivir al medio hostil de los fagolisosomas de las células eucariotas (Heinzen y cols., 1996), logrando replicarse en vacuolas de medio interno ácido (con pH entre 4,7 y 5,2). Es una bacteria acidófila cuyo metabolismo se ve claramente incrementado en condiciones de pH ácido. De hecho, se puede detener su replicación variando el pH fagolisosomal utilizando sustancias con tropismo lisosomal como la cloroquina (Akporiaye y cols., 1983; Raoult y cols., 1990c). En cultivos celulares con fibroblastos L929 con acidez estable la cepa Nine Mile ha logrado mantener la infección más de 6 meses (Maurin y cols., 1992).

Como se ha comentado anteriormente, la acidez del medio es necesaria para que *C. burnetii* asimile numerosos nutrientes que son necesarios para su metabolismo, incluido los necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos (Chen y cols., 1990) y de aminoácidos (Hackstadt y Williams, 1983; Zuerner y Thompson, 1983; Hendrix y Mallavia, 1984). No obstante, se ha observado que uno de los mecanismos esenciales para el control de la infección por *C. burnetii* por parte del hospedador está mediado por una activación de los monocitos/macrófagos mediante citoquinas que generan, a su vez, la producción de intermediarios de nitrógeno reactivo y de oxígeno reactivo que poseen un gran potencial microbicida. De hecho, se ha observado que la inhibición de la producción de intermediarios reactivos como

el óxido nítrico o el peróxido de hidrógeno por parte de los macrófagos estimulados con interferón- γ , provocaba una menor eficiencia en el control de la infección por *C. burnetii* (Brennan y cols., 2004).

En un estudio cuyo objetivo era examinar las características de las vacuolas formadas por *C. burnetii* en el interior de las células hospedadoras, las vacuolas formadas por *Coxiella* interactúan con el proceso de la autofagia (Berón y cols., 2002). En un estudio posterior, se pudo observar que los fagosomas con *C. burnetii* adquieren proteínas Rab (moléculas que coordinan las vesículas de transporte dentro de las células) secuencialmente durante la infección de la célula. Por otra parte, se ha observado que en las vacuolas formadas por *C. burnetii*, las proteínas LC3 se pueden detectar a los cinco minutos post-infección mediante un proceso mediado por la propia bacteria. Además, *C. burnetii* produce una disminución de la llegada de la catepsina D a las mencionadas vacuolas. Por tanto, *C. burnetii* entra en la célula hospedadora mediante la ruta endofagocitaria normal, si bien, esta internalización va acompañada de una interacción activa temprana de la bacteria con los autofagosomas. Esta interacción se traduce en una alteración de la autofagia basada en una disminución de la actividad lisosomal que permite la diferenciación y supervivencia de la bacteria en el interior de los fagolisosomas (Romano y cols., 2007).

Adicionalmente, las distintas variantes del ciclo evolutivo de *C. burnetii* le brindan a esta bacteria una eficaz estrategia de cara a su supervivencia en el medio externo y en las vacuolas autofágicas originadas por estos parásitos intracelulares. Estas variantes expresan diferentes proteínas en el desarrollo de su ciclo vital, que a su vez, se presentan con diferentes grados de expresión en algunos casos o son específicas en otros para cada variante en concreto, y que pueden detectarse mediante serología durante la infección por *C. burnetii* (Heinzen y cols., 1996; Heinzen y Hackstadt, 1996; Heinzen y cols., 1999; Seshadri y cols., 1999). Estas proteínas se cree que puedan estar involucradas en diferentes mecanismos orientados a evadir la respuesta inmune por parte del hospedador ante los antígenos de superficie y a facilitar la supervivencia en el interior de las vacuolas.

Ejemplos de estos mecanismos basados en la expresión de determinadas regiones del genoma de *Coxiella*, en función de la actividad de distintos mecanismos enzimáticos que actúan como reguladores de expresión de las mencionadas secuencias genómicas en momentos concretos de la infección de *C. burnetii* y en función de las exigencias físico-químicas del medio externo a la bacteria, serían el

gen que codifica para la proteína P1, la expresión del factor sigma alternativo ó *rpoS* y el gen que codifica para la proteína Hq1. Estos sistemas son activados en las fases tempranas de la infección, siendo esencial el papel que desarrollan las proteínas P1 en la adquisición de nutrientes en el medio ácido existente en el fagolisosoma (Wahl y cols., 2001; Samuel y cols., 2003).

La proteína P1 tiene la capacidad de formar un poro que une las dos capas de la membrana bacteriana con el fin de permitir la entrada selectiva de aniones en el interior de la célula. Esta porina se encuentra abierta predominantemente a un PH de 7.4 (neutral), lo cual, probablemente informa a la bacteria de que se encuentra en el exterior de la célula hospedadora. En cambio, a un pH 4.6, que es similar al que se alcanza en los fagolisosomas, la actividad de esta porina cambia y puede cerrarse. Cuando la P1 se abre a estos valores de pH ácido, el pH en el interior de la bacteria es estabilizado mediante la acción del glutamato, cuya síntesis, curiosamente, forma una pieza fundamental del metabolismo de *C. burnetii*. Esta proteína se expresa de manera importante en las LCVs, se expresa mucho menos en las SCVs y no se expresa en las SDCs (McCaul y cols., 1991; Clifton y cols., 1998; Varghees y cols., 2002; Samuel y cols., 2003).

En el caso de la *rpoS* (sigma-S), se trata de una subunidad sigma que promueve la transcripción específica de genes que son expresados durante la fase estacionaria de la mayoría de las bacterias. Este mecanismo promueve la resistencia bacteriana en situaciones de estrés celular, fomentando cambios morfológicos y alteraciones fisiológicas. En este sentido, se ha observado que las SCV no cuentan con una cantidad significativa de *ropS*, mientras que en las LCV la expresión de *RopS* es importante (Seshadri y Samuel, 2001).

Este factor sigma debe regular la expresión de múltiples genes involucrados en la resistencia al estrés metabólico por parte de las LCVs (Melnicakova y cols., 2003). Sin embargo, las SCVs disponen de mecanismos para interactuar con la vacuola en las fases tempranas de internalización, como ya se ha visto, con el fin de reducir la capacidad fagolisosomal, lo cual permite la transformación de las SCVs en LCVs, proceso que tiene lugar en el endosoma a un pH 5.5 (Howe y Mallavia, 2000). De hecho, la mayor parte de la replicación de *C. burnetii* en el interior de la célula hospedadora se produce una vez se han unido los endosomas a los lisosomas (Howe y cols., 2003a; Howe y cols., 2003b).

La *ropS* no es el único ejemplo de expresión génica diferenciada relacionada

con el estrés que se conoce en *C. burnetii*. Otros ejemplos los tenemos en los factores EF-Ts (*tsf*) y EF-Tu (*tufB*), los cuales han sido identificados como elementos traslacionales que se expresan específicamente en las LCVs (Dellacasagrande y cols., 2000).

Sin embargo, la expresión del gen *hcbA*, el cual codifica para la proteína Hq1, se da específicamente en las SCVs. Se trata de una proteína similar a la proteína Hc1 presente en las especies de *Chlamydia*, que se caracteriza por ser semejante a las histonas de las células eucariotas (Weinberg, 2000). Parece ser que la Hq1 juega un papel importante en la condensación del nucleoide durante la diferenciación de la LCV a SCV, similar al que juega esta proteína en las clamidias (Howe y Mallavia, 1999).

La existencia de secuencias homólogas en el sistema de secreción IV para *C. burnetii* y *Legionella* y, la similitud de las proteínas IcmQ de *Coxiella* y la IcmR de *Legionella*, hacen pensar que *C. burnetii* posee un sistema de secreción similar al de ambos mecanismos de secreción detectados para *Legionella* y que este jugaría un papel fundamental en la formación de las vacuolas que permiten la replicación de *C. burnetii* en el interior de la célula hospedadora (Seshadri y cols., 2003; Zamboni y cols., 2003; Zusman y cols., 2003; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

2.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA FIEBRE Q

“No consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

2.4.1. INMUNOMODULACIÓN, CAPACIDAD DE INFECCIÓN E INMUNIDAD

2.4.1.1. INMUNOMODULACIÓN EN LA FIEBRE Q AGUDA

La inmunidad por parte de las células T en una respuesta de tipo Th1 se muestra como efectiva y necesaria en el control de la fiebre Q. Aunque en muchos casos, no logra erradicar totalmente a la bacteria del organismo, quedando la posibilidad de que la enfermedad se mantenga latente y pueda recidivar en determinadas condiciones. Puede suceder que la infección se cronifique. Por tanto, la supervivencia intracelular de *C. burnetii* y el establecimiento de una infección persistente se debe, probablemente, a una desestabilización de las funciones microbicidas de los macrófagos en conjunción con el deterioro de la acción del sistema inmune en relación con las células T (Mege y cols., 1997).

Pero no solo las células de *C. burnetii* viables son capaces de persistir en pacientes crónicos de fiebre Q. De hecho, en humanos, se ha observado la persistencia de determinados antígenos no biodegradados, como ciertos componentes celulares y el lipopolisacárido de cubierta específico (llamado complejo inmunomodulatorio o “CIM”), además de trazas de ADN de *C. burnetii* que persisten en algunos pacientes que han sobrepasado la enfermedad a lo largo de los años. Los CIMs detectados en pacientes que han sobrepasado la enfermedad hace 12 años tienen la capacidad de provocar un efecto depresor en la regulación de la capacidad de biodegradación de los macrófagos tras varios pases en cultivo, si bien se ha detectado que muestras de estos pacientes inoculadas en ratones SCID (deficientes en células T CD4+ y CD8+) no desencadenan la producción de infecciones de las que se puedan obtener células de *C. burnetii* viables (Marmion y cols., 2009; Sukocheva y cols., 2010). Este mecanismo fisiopatológico podría explicar numerosos casos de síndrome de fatiga crónica y otras afecciones crónicas en humanos en los que no se logran aislar células de *C. burnetii* viables.

Experimentos *in vitro* han demostrado que la fase I natural de *C. burnetii* es

capaz de soportar la acción microbiocida de los macrófagos-monocitos (Mege y cols., 1997). Por un lado, resiste al oxígeno activo mediante la acción de captadores de oxígeno como la superóxidodismutasa y la catalasa (Akporiaye y Baca, 1983). Por otro lado, *C. burnetii* no promueve la liberación de intermediarios del oxígeno activo por parte de los macrófagos y de los monocitos *in vitro* (Mege y cols., 1997), mecanismo importante en el control de la infección por parte de la célula hospedadora (Brennan y cols., 2004).

Otro aspecto de la fisiopatología de la fiebre Q, que se ha estudiado recientemente, es el papel que desempeñan las células CD4+ y CD8+ en la respuesta inmune por parte del hospedador ante la infección pulmonar por *C. burnetii*. En este sentido, se ha podido apreciar que los ratones manipulados genéticamente SCID sucumbían a la infección vía aerógena con *C. burnetii* Nine Mile en fase I, mientras que las líneas de ratón no manipuladas genéticamente sobrepasaban la enfermedad en 24 días. Cuando el sistema inmune de los ratones SCID era reconstituido con células T CD4+ y CD8+, se observó que estos ratones eran capaces de controlar la infección en los pulmones en su estado inicial sin la necesidad de la actuación de los linfocitos B. Incluso, cuando a los ratones no manipulados genéticamente se les privaba de la acción de uno de los dos tipos de células T, seguían siendo capaces de controlar la infección a nivel pulmonar, si bien, estos ratones se volvían muy susceptibles a la enfermedad cuando se les privaba de la acción de ambos tipos de células T (Read y cols., 2010).

Otro aspecto llamativo es que la fase I (virulenta) de *C. burnetii* se ha demostrado que estimula de forma importante la síntesis del factor de necrosis tumoral (FNT) por parte de los monocitos humanos (Capo y cols., 1996a). Este factor suele incrementar el potencial microbiocida de los monocitos infectados y, por tanto, debe de ralentizar el crecimiento de *C. burnetii*. La producción de FNT- α debe mejorar la inclusión de la fase I, que como se ha dicho anteriormente, es pobremente internalizada en los macrófagos-monocitos, regulando la adhesión de la bacteria a los receptores específicos de estas células.

La baja modulación de la respuesta de los macrófagos a las linfoquinas puede ser otro mecanismo que permita la supervivencia de *C. burnetii* en el interior de estas células (Mege y cols., 1997). Se ha podido observar que el cebado de las funciones microbicidas de los fibroblastos de ratón mediante la utilización del gamma interferón (IFN- γ) *in vitro*, limita la multiplicación intracelular de *C. burnetii* (Turco y cols., 1984). Los monocitos infectados con *C. burnetii* no pueden ser cebados por el

IFN- γ mediante el metabolismo oxidativo (Mege y cols., 1997). Estudios posteriores demostraron que el IFN- γ promovía la eliminación de *C. burnetii* por parte de los monocitos tipo THP-1 mediante un mecanismo apoptótico mediado en parte por el FNT (Dellacasagrande y cols., 1999).

La línea de ratones deficitarios en el sistema cebador de la citotoxicidad mediado por el IFN- γ , se han mostrado muy susceptibles a la infección por *C. burnetii* (Scott y cols., 1987). De hecho, la importancia de la variabilidad de diversos determinantes genéticos que codifican para la producción de diferentes citoquinas en la severidad de la presentación de la enfermedad aguda ha sido estudiada para *C. burnetii* y otros agentes infecciosos. Se observó que la detección de polimorfismos en las regiones génicas que codifican para el IFN- γ y para la IL-10 afectan significativamente a la severidad de los síntomas durante la fase aguda de la enfermedad. Alteran los niveles de citoquinas producidas tras la infección y prolongan el curso de la enfermedad. Estos resultados sugieren que modificaciones genéticas en estas regiones son determinantes en la respuesta inflamatoria inicial y en la severidad de la enfermedad aguda, afectando al periodo de recuperación de la infección (Helbig y cols., 2005).

Una visión global de la fisiopatología en la infección aguda por *C. burnetii* tanto en fase I como en fase II la tendríamos en un estudio en el que se utilizaron un gran número de líneas de ratones modificados genéticamente con el fin estudiar la importancia de diferentes factores presentes en la reacción inmune contra la infección por este agente causal mediante la comparación de la acción del mismo en los diferentes tipos de animales utilizados. Los resultados sugirieron que las células T son cruciales para la eliminación de *C. burnetii* en las fases I y II, mientras que el FNT- α y el IFN- γ son esenciales para el control temprano de la infección, siendo la reacción de las células B importantes para la prevención del daño tisular (Andoh y cols., 2009).

2.4.1.2. INMUNOMODULACIÓN EN LA FIEBRE Q CRÓNICA

En humanos, los pacientes de fiebre Q crónica presentan leucopenia de las células T-CD4⁺ que afecta preferentemente a los linfocitos no cebados (Sabatier y cols., 1997). Los linfocitos periféricos de la sangre (LPerS) de pacientes convalecientes de la fiebre Q aguda o de aquellos pacientes que aún la padecen, muestran una fuerte proliferación cuando se cultivan *in vitro* con antígenos de *C. burnetii* (Koster y cols., 1985). También se ha observado una respuesta linfoproliferativa tras la vacunación con *C. burnetii* inactivada con formalina (Ascher

y cols., 1983; Izzo y cols., 1988). Por el contrario, los LPerS de enfermos de endocarditis por fiebre Q no proliferan en presencia de antígenos de *C. burnetii*, mientras que sí lo hacen en presencia de *Candida albicans* o de mitógenos (Koster y cols., 1985b).

Uno de los mecanismos que parece influir en la cronificación de la infección por *C. burnetii* es la sobreexpresión de la IL-10. Este fenómeno se ha observado que influye en la susceptibilidad del hospedador ante los microorganismos y está relacionada con la infección persistente por parte de diversos patógenos intracelulares, incluido *C. burnetii*. En los animales transgénicos, que expresaban IL-10 continuamente, al ser inoculados intraperitonealmente, se detectaron un escaso número de granulomas en el bazo y el hígado, como ocurre en los enfermos de fiebre Q crónica. Los macrófagos de estos animales fueron incapaces de aniquilar a *C. burnetii*, caracterizándose por mostrar una programación sin efecto microbicida, en contraste con los macrófagos de los animales no manipulados genéticamente. Por tanto, la sobreexpresión de la IL-10 en los macrófagos del hospedador disminuye la competencia inmune del mismo, incluyendo la capacidad de provocar la respuesta granulomatosa y las diferentes vías de acción microbicida en los tejidos (Meghari y cols., 2008).

En la línea de lo expuesto en el párrafo anterior estarían los resultados de un estudio anterior en el que se observaba una relación entre la desregulación en la producción de IL-10 y el FNT en la evolución de los casos de fiebre Q aguda a crónica en humanos. Concretamente, la sobreproducción de FNT se asoció de una manera significativa a la evolución del cuadro agudo a una endocarditis por fiebre Q. Estos resultados nuevamente indican que la sobreproducción de determinadas citoquinas es un factor de riesgo a tener en cuenta en la fiebre Q crónica (Honstetter y cols., 2003). Citoquinas tales como el factor de crecimiento β transformante y la IL-10 son producidas en exceso por las células mononucleares periféricas de la sangre y los monocitos de pacientes con endocarditis por fiebre Q. De hecho, el incremento de la producción de IL-10 está asociado con la aparición de fiebre Q recidivante (Capo y cols., 1996b).

Otro mecanismo fisiopatológico que se ha observado en pacientes humanos con endocarditis asociada a fiebre Q crónica es el incremento de células apoptóticas circulantes, las cuales, favorecen la replicación de *C. burnetii*, en conjunción con la presencia de valvulopatía previa en estos pacientes. Estos pacientes con valvulopatías experimentan un incremento en los niveles de leucocitos apoptóticos

circulantes. Este incremento en el número puede influir en la disminución de la capacidad inmune de los mismos contra *C. burnetii* durante el curso de la endocarditis producida por la fiebre Q crónica. Asimismo, se ha detectado que los linfocitos apoptóticos (LA) incrementan la replicación de *C. burnetii* en el interior de los monocitos y de los macrófagos que derivan de éstos mediante un proceso dependiente del contacto celular. La producción de LA conduce a la instauración de un programa M2 en los monocitos y macrófagos estimulados por *C. burnetii*, siendo este programa diferente para ambos tipos de leucocitos. De esta manera, mientras los monocitos ligados a los LA producen altos niveles de IL-10 y de IL-6, bajos niveles de FNT e incrementan la expresión de las CD14, los macrófagos ligados a LA producen altos niveles del factor de crecimiento transformante beta 1 (FCT- β_1) y expresan el receptor de manosa. La neutralización de la IL-10 y del FCT- β_1 previenen la replicación de *C. burnetii* gracias a la acción de los LA ligados, lo cual sugiere que este mecanismo es crítico en la replicación de *C. burnetii* en este escenario. Por otra parte, cuando células necróticas se ligan a los monocitos y macrófagos producen la muerte de *C. burnetii* y la producción de una polarización tipo 1 (Benoit y cols., 2008).

Finalmente, el IFN- γ corrige la desviación producida en el curso de la respuesta inmune provocada por las células apoptóticas, previniendo la replicación bacteriana y redirigiendo la respuesta de los monocitos y macrófagos hacia un programa de tipo 1, lo que resulta más perjudicial para *C. burnetii*. Por tanto, estos resultados sugieren que la apoptosis de los leucocitos asociada a la presencia de valvulopatía puede ser un mecanismo fisiopatológico crucial en la patogénesis de la endocarditis por fiebre Q mediante la desactivación de la inmunidad celular, lo que crea un medio propicio para la persistencia de esta bacteria (Benoit y cols., 2008).

Las prostaglandinas pueden suprimir la inmunidad mediada por las células T frente a *C. burnetii* en el caso de los pacientes con fiebre Q crónica. Cantidades grandes de prostaglandina E₂ son producidas en respuesta a la presencia de *C. burnetii* por las células mononucleares periféricas de la sangre (Capo y cols., 1996a).

La inducción de mediadores supresivos por parte de los monocitos puede ser provocada por la acción de ciertos determinantes bacterianos. Los monocitos y las células T de individuos vacunados con la fase I de *C. burnetii* presentan una producción residual de IFN- γ , mientras que la fase II o la fase I pretratada (con el fin de producir una fase II artificial) logran una fuerte estimulación de la producción de IFN- γ (Izzo y Marmion, 1993). Por lo que se ha hipotetizado que el lipopolisacárido

de la cubierta de *C. burnetii* probablemente promueva la supresión de la producción de IFN- γ y de los linfocitos periféricos de la sangre en pacientes con fiebre Q crónica debido a un enmascaramiento de ciertos determinantes bacterianos de crucial importancia para la producción de las citadas linfoquinas (Mege y cols., 1997).

2.4.1.3. CAPACIDAD INFECTANTE E INMUNIDAD HUMORAL

C. burnetii es un microorganismo con una fuerte capacidad de infección. En experimentaciones animales con cobayas, se ha demostrado que una sola bacteria es capaz de producir infección y se cree que en humanos puede ocurrir lo mismo (Aguirre y cols., 1984; Cowley y cols., 1992). No obstante, la infectividad de *C. burnetii* depende de diversos factores, unos dependientes del propio microorganismo y los otros del huésped. Entre los factores propios del microorganismo que han sido estudiados, destaca el del tamaño del inóculo, a la vez que el tiempo de inoculación (Cowley y cols., 1992).

La respuesta inmunitaria específica del huésped frente a *C. burnetii*, tanto la inmunidad celular como la humoral, juegan un papel importante en la eliminación de *Coxiella* de los animales de experimentación, pero parece que la primera es la responsable definitiva de ese cometido, en tanto que los anticuerpos ejercen tan sólo un papel facilitador (Bell y cols., 1964). La importancia preponderante de la inmunidad celular queda demostrada por Kazar y colaboradores (1983). Según estos autores, la resistencia de los animales previamente inmunizados con diferentes preparaciones antigénicas de *C. burnetii* y expuestos a cepas virulentas de esta bacteria, se correlaciona mejor con una respuesta celular que con una respuesta humoral.

De todos modos, aunque el efecto protector de los anticuerpos frente a la fase I de *C. burnetii* se conoce desde hace años, dicho efecto protector sólo se manifiesta en los animales de experimentación cuando el suero inmune se administra simultáneamente con el microorganismo ó 24 horas antes, pero no 24 horas después ni cuando se trata de un animal atímico (Kazar y cols., 1983). Los anticuerpos que se producen en la respuesta a la infección por *C. burnetii*, tienen capacidad opsonizante, incrementando su fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Este hecho, podría tener un efecto teóricamente perjudicial para el huésped, dado que estamos hablando de una bacteria que es capaz de sobrevivir en los fagolisosomas celulares, con lo que la infección tendería a mantenerse en el tiempo. Aunque en cobayas se ha demostrado que la proliferación de *C. burnetii* en el interior

de los fagocitos se suprime cuando estos son expuestos a linfocitos T sensibilizados o a las linfoquinas producidas por éstos (Kazar y cols., 1983).

Otro hallazgo en cuanto a la respuesta humoral provocada por la infección de *C. burnetii* es la independencia de dicho tipo de respuesta de los receptores para la fijación del complemento (FC) y de la producción del complemento (Shannon y cols., 2009). Curiosamente, la técnica diagnóstica basada en la fijación del complemento, ampliamente utilizada en el diagnóstico de la fiebre Q, se ha mostrado menos precoz en la detección y menos sensible que técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta y el enzimoimmunoensayo.

En resumen, parece ser que la respuesta protectora de los anticuerpos específicos se manifiesta solo en presencia de macrófagos y linfocitos T activados. Así pues, la acción combinada de los mecanismos de la inmunidad celular y humoral podría finalmente conducir a la eliminación del microorganismo.

Sin embargo, pese a ello, la inmunidad frente a *Coxiella* no parece ser totalmente suficiente, de modo que el microorganismo en sí y/o determinados antígenos del mismo y trazas de su ADN genómico pueden persistir en el suero sanguíneo o en el interior de las células fagocíticas y de otras células cuando la infección aguda aparentemente ha sido controlada. Esta situación implicaría un estado de equilibrio entre el huésped y el parásito que podría romperse en determinadas circunstancias como tras la aplicación de tratamientos inmunosupresores, la aparición de enfermedades debilitantes o durante la gestación (Kazar y cols., 1983; Marmion y cols., 2009; Sukocheva y cols., 2010). Esta persistencia intracelular de la bacteria, en combinación con la infección de determinados tipos de aislamientos de esta bacteria poseedoras del plásmido QpRS o de secuencias homólogas a él integradas en el genoma (Chen y cols., 1990), o de determinado tipo de LPS (Capo y cols., 1996a), podrían ser algunos de los factores determinantes en la génesis de las formas crónicas de fiebre Q en algunos enfermos predispuestos (Kazar y cols., 1983; Helbig y cols., 2005; Russel-Lodrigue y cols., 2006).

2.4.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA FIEBRE Q HUMANA

Como se verá en otro apartado, la ruta aerógena se ha descrito tradicionalmente como la vía de transmisión más frecuente en la especie humana (Babudieri, 1959).

El periodo de incubación de la fiebre Q aguda varía entre 1 y 3 semanas, dependiendo de la dosis infectante a la que haya sido sujeto el paciente (Marrie, 1990c). En la mayoría de los casos, la enfermedad en su fase aguda resulta ser inaparente o bien presenta una sintomatología inespecífica. Esto conduce a que la fiebre Q sea una enfermedad de difícil diagnóstico clínico y que probablemente, estemos ante una enfermedad infradiagnosticada (Marrie, 1990c).

La mayoría de los pacientes infectados muestran una fase de bacteriemia que normalmente se hace perceptible en las fases tardías del periodo de incubación. En cualquier caso e independientemente de la ruta de infección, la presencia de *C. burnetii* en la sangre puede involucrar a otros órganos tales como el hígado, el bazo, los pulmones, la médula ósea y el tracto genital femenino. Es más, se pueden presentar determinadas complicaciones que pueden amenazar la vida de los pacientes entre las que se incluyen la meningoencefalitis, la miocarditis o la pericarditis.

Como se ha visto, la infección por *C. burnetii* es controlada comúnmente mediante la respuesta inmune modulada por las células T. Por otro lado, es también frecuente que esta respuesta inmune celular no logre erradicar totalmente la infección por *C. burnetii* del hospedador. Es entonces cuando cabe la posibilidad de que vuelva a recidivar la fiebre Q, tal y como se ha descrito, en pacientes aquejados de síndromes de inmunodeficiencia adquirida, entre los que se incluyen los causados por diferentes tipos de cáncer, linfomas o infección por el VIH o bien, en mujeres en estado de preñez (Raoult, 1990; Raoult y cols., 1992; Raoult y cols., 1993; Raoult y cols., 1994; Stein y Raoult, 1998).

En pacientes con valvulopatía previa (Raoult y cols., 1990b), y en menor medida, en mujeres embarazadas (Stein y Raoult, 1998) y en pacientes inmunocomprometidos, (Heard y cols., 1985; Raoult, 1990; Raoult y cols., 1993), la fiebre Q puede cronificar y convertirse en una enfermedad de curso fatal para el paciente. De este modo, la fiebre Q crónica se define como aquel proceso provocado por la infección de *C. burnetii* que se extiende en el tiempo más de seis meses y que se caracteriza por la presencia de IgA e IgG contra antígenos de la fase I de *C. burnetii* (Peacock y cols., 1983).

La endocarditis es la manifestación clínica y patológica más frecuente de la fiebre Q crónica en las poblaciones humanas. También, en esta cronificación de la

enfermedad es frecuente un proceso multiorgánico que puede incluir una hepatitis crónica. Con menor frecuencia, se pueden producir infecciones crónicas de aneurismas y/o prótesis vasculares (Ellis y cols., 1983; Fergusson y cols., 1985; Brouqui y cols., 1994; Raoult y Marrie, 1995; Fournier y cols., 1998b), osteomielitis crónica (Ellis y cols., 1983; Piquet y cols., 1994; Cottalorda y cols. 1995) y osteoartritis (Raoult y cols., 1989; Pérez y cols., 1992), e inducen la formación de pseudotumores pulmonares (Janigan y Marrie, 1983; Lipton y cols., 1987), fibrosis pulmonar (Aitken y cols., 1987), hepatitis crónica sin endocarditis asociada (Aitken y cols., 1987). Recientemente se ha descrito un caso curioso de infección por *C. burnetii* de un injerto vascular en la aorta asociado a un proceso de artrosis por erosión en varias vértebras del paciente (O'Donnell y cols., 2007).

Las lesiones patológicas de la fiebre Q en humanos han sido descritas a partir del análisis de muestras de biopsias y de muestras extraídas tras la realización de autopsias (Marrie, 1990b). Las biopsias de hígado suelen obtenerse de pacientes con síntomas de hepatitis. En el caso de los cuadros neumónicos de la enfermedad y debido a que estos cuadros no suelen ser fatales, no se suelen realizar biopsias a los pacientes afectados. Esto se traduce en un escaso estudio patológico *in vivo* de este tipo de neumonías. En cualquier caso, el diagnóstico de la fiebre Q mediante el análisis patológico de biopsias no es frecuente ya que esta enfermedad puede ser detectada mediante serología con mayor precisión y facilidad.

Las lesiones histopatológicas pulmonares típicas de la fiebre Q que cursa con neumonía incluyen consolidaciones groseras, signos microscópicos de neumonía intersticial y exudados alveolares (Lillie y Perrin, 1941; Perin, 1949; Whittick, 1950). Los infiltrados intersticiales están compuestos mayoritariamente por macrófagos o linfocitos y, en menor medida, están presentes leucocitos polimorfonucleares (Perin, 1949; Janigan y Marrie, 1983). Fibrina y eritrocitos junto con células mononucleares componen los exudados alveolares. Debido a que estas lesiones no son específicas de la fiebre Q y son frecuentes en otras patologías que cursan con neumonías atípicas tales como las producidas por *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*, se hace necesaria la utilización de técnicas inmunohistoquímicas que revelen la existencia de *C. burnetii* en el interior de los macrófagos alveolares.

Debido a que la manifestación patológica de la infección por *C. burnetii* aguda cuando afecta al hígado es la hepatitis granulomatosa (Gerstl y cols., 1956; Berstein y cols., 1965; Dupont y cols., 1971; Delaney y Roberts, 1975; Voigt y cols., 1983; Weir y cols., 1984), la fiebre Q es confundida a menudo con la tuberculosis. Otras

lesiones menos específicas en la forma hepática de esta enfermedad incluyen la hiperplasia de las células de Kupffer y la degeneración grasa moderada. Las células de Kupffer están consideradas como células diana de *C. burnetii* cuando se produce la infección del tejido hepático. Esta circunstancia hace que se inicie una inflamación local y la formación de los granulomas.

El examen microscópico de cortes histopatológicos de hígados afectados muestran la existencia de necrosis hepatocelular focal y de infiltrados celulares compuestos por linfocitos y leucocitos polimorfonucleares. Macrófagos con una morfología epiteliode, células gigantes multinucleadas y fibrina también pueden estar presentes. Un rasgo característico de los granulomas hepáticos originados por *C. burnetii* es la formación de estructuras con forma de rosquilla, es decir, con una zona central menos densa rodeada de una zona periférica más densa compuesta por fibrina, denominadas granulomas con forma de donuts o de rosquilla (Dupont y cols., 1971; Qizilbash, 1983; Greiner y cols., 1992). Si bien este tipo de lesión se puede encontrar ocasionalmente en otras enfermedades tales como la enfermedad de Hodgkin, la fiebre tifoidea, la infección por citomegalovirus, la mononucleosis o la hipersensibilidad al halopurinol, en el caso de la fiebre Q, esta lesión es característica de la forma hepática de la enfermedad. Por otra parte, *C. burnetii* no se detecta siempre a partir del hígado aun existiendo un cuadro hepático, por lo que, su aislamiento y su detección mediante inmunohistoquímica ocurre ocasionalmente.

Es de resaltar que, aunque la hepatitis se suele describir conjuntamente con la endocarditis crónica producida por la fiebre Q, los granulomas hepáticos rara vez han sido descritos en pacientes con fiebre Q crónica, y el granuloma típico con forma de rosquilla no se ha descrito nunca en este tipo de pacientes (Westlake y cols., 1987; Raoult y cols., 1990b). El cuadro histopatológico hepático predominante en la fiebre Q crónica se caracteriza por mostrarse como una hepatitis reactiva, no específica, con infiltración linfocitaria acompañada de necrosis granular focal. La ausencia de una respuesta inmune por parte del sistema de células T en pacientes crónicos puede explicar la ausencia del granuloma típico en la fase crónica de la fiebre Q.

Las lesiones en la médula ósea se suelen corresponder con la formación de unos granulomas similares a los que nos encontramos en los cuadros hepáticos de la fiebre Q (Delsol y cols., 1978; Constans y cols., 1987; Raoult, 1990). Los típicos granulomas vistos en el cuadro hepático, con morfología de rosquilla y con la misma composición, están presentes también en la médula ósea cuando ésta es infectada por *C. burnetii* (Voigt y cols., 1983; Silver y McLeish, 1984).

La endocarditis causada por la fiebre Q suele afectar a las válvulas aórtica y mitral, habiéndose descrito un incremento de riesgo en los pacientes que poseen prótesis valvulares (Fernández Guerrero y cols., 1988; Siegman-Igra y cols., 1997). La típica vegetación originada por la infección es pequeña y de difícil visualización cuando se utiliza la ecocardiografía transtorácica. Un estudio concienzudo de las válvulas cardíacas puede revelar la existencia de la vegetación de origen infeccioso con una destrucción variable del tejido que compone a la válvula afectada. Han sido descritas también la perforación de cúspides valvulares y del seno de Valsalva, así como la formación de aneurismas localizados en los collares valvulares, la porción membranosa del septo intraventricular o en el miocardio subvalvular.

Los hallazgos histopatológicos encontrados habitualmente en el estudio de las válvulas cardíacas infectadas suelen ser de tipo inespecífico. Entre las lesiones encontradas comúnmente se aprecian la presencia de trombos compuestos por fibrina y plaquetas, necrosis y cúmulos celulares necróticos, focos de calcificación y/u osificación, y fibroblastos por los que se establece el colágeno (Andrews y Marmion, 1959; Turck y cols., 1976; Tobin y cols., 1982). Los infiltrados celulares están compuestos mayoritariamente por linfocitos, histiocitos y, ocasionalmente, por células plasmáticas. También se observan frecuentemente macrófagos.

Utilizando técnicas inmunohistoquímicas, se han encontrado microabscesos focales con presencia de *C. burnetii*. Esta bacteria se encuentra en el interior de las células infectadas con forma cocoide, enclaustradas en una única masa intracitoplasmática (un único fagolisosoma), infectado casi en exclusividad a macrófagos espumosos e histiocitos (Brouqui y cols., 1994).

Se pueden originar émbolos arteriales a partir de estas vegetaciones y éstos pueden producir infartos, especialmente en órganos como el bazo, riñones y en el cerebro. Además, la endocarditis por fiebre Q puede llevar aparejada la aparición de complicaciones inducidas por la formación de inmunocomplejos que pueden conducir a la aparición de cuadros como la glomerulonefritis por acumulación de los mismos a nivel de riñón (Maurin y Roullet, 1999).

2.4.3. FISIOPATOLOGÍA DE LA FIEBRE Q EN LOS ANIMALES INFECTADOS DE MANERA NATURAL

Los animales que se infectan de manera natural con *C. burnetii* no suelen

experimentar síntomas clínicos relacionados con la enfermedad. En la fase aguda de la infección, la presencia de fiebre Q puede ser demostrada mediante diferentes técnicas diagnósticas (cultivo, técnicas serológicas, inmunohistoquímica, PCR) a partir de muestras de sangre, pulmón, bazo e hígado. Aún así, la mayoría de los animales suelen mantenerse asintomáticos, sin mostrar siquiera un cuadro febril. A menudo, la infección por *C. burnetii* en estos animales se cronifica y se caracteriza por una excreción continua de la bacteria en heces y orina, con lo que, estos animales se convierten en portadores excretores del agente causal que, además, se caracterizan por ser portadores inaparentes. El útero y las glándulas mamarias son los principales órganos diana en la infección crónica por *C. burnetii* en estos animales, siendo esta cualidad de la infección en los animales, favorecedora de la dispersión de *C. burnetii* en el medioambiente durante y tras las épocas de parto. Las secreciones de parto y postparto y, las placentas, presentan una alta contaminación por parte de esta bacteria. También la leche de los animales afectados presenta una contaminación en los animales afectados (Babudieri, 1959; Barlow y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007).

Sin duda, de entre las lesiones causadas por la fiebre Q entre los rumiantes, las de más impacto en la sanidad de las explotaciones, y por tanto, las que provocan las mayores pérdidas económicas, son las relacionadas con el aparato reproductor. Metritis que se traducen en disminuciones de los índices de fertilidad, abortos, nacimientos prematuros acompañados de aumentos en la mortalidad neonatal y perinatal han sido descritas en los rumiantes domésticos (Lang, 1990; Arricau-bouveri y Rodolakis, 2005).

En el caso de los abortos, más frecuentes en el ganado caprino, y sobre todo en el ovino, los fetos abortados suelen tener una apariencia normal, mientras que las placentas de animales con un grado de infección considerable, muestran un engrosamiento de las áreas intercotiledonarias acompañado de exudados copiosos, de aspecto cremoso, de color amarillento o marrón decolorado. Microscópicamente se observa una severa placentitis hiperplásica necrotizante, con una presencia importante de trofoblastos contaminados intracitoplasmáticamente por *C. burnetii*. A la vez, tiene lugar una vasculitis placentaria que se caracteriza por mostrar infiltrados importantes de células mononucleares, neutrófilos y eosinófilos. Esta infiltración es la que se observa con más frecuencia en los órganos dianas de los fetos abortados. En el caso de las vacas, las lesiones observadas son más benignas o bien inexistentes, detectándose una contaminación por *Coxiella* muy inferior en los tejidos afectados (Palmer y cols., 1983; Zeman y cols., 1989; van Moll y cols., 1993; Masala y cols.,

2007).

En el caso concreto del ganado caprino, se ha observado que la infección por *C. burnetii* produce cuadros de aborto en el último tercio de la gestación. Pero a diferencia con la oveja, especie en la que el aborto es la principal manifestación clínica de la infección, en la cabra cobra más importancia relativa el nacimiento prematuro y el nacimiento a término de crías débiles, lo que se traduce en un aumento de la mortalidad neonatal y perinatal (Berri y cols., 2007; Wouda y Dercksen, 2007).

En la cabra, se han observado lesiones en el aparato reproductivo, en las glándulas mamarias, en el pulmón y en el hígado de las cabras preñadas infectadas. Las primeras células diana que son atacadas en la placenta son los trofoblastos de la membrana alantocorión. Tras la evolución de la infección y en las últimas semanas de la gestación, se detecta una multiplicación masiva de *C. burnetii* en la placenta que conduce a la formación de la ya citada placentitis necrótica y supurativa, la cual, es la causa de que se separen células trofoblásticas del feto del epitelio sincitial de la madre, observándose un proceso de vasculitis en el mesénquima fetal. Una fuerte respuesta inmune basada en la masiva afluencia de células T se ha observado en regiones situadas entre los placentomas, no observándose esta reacción en los placentomas en sí, en los que sólo se pudo apreciar la presencia de neutrófilos y de un pequeño número de macrófagos asociados a la infección. Parece ser, que en los animales que sobrepasan la infección y no se quedan como enfermos crónicos o como portadores-excretadores de la bacteria, no se observa ninguna lesión ni se puede detectar la presencia de *C. burnetii* mediante PCR transcurridos 120 días tras la infección (Sánchez y cols., 2007).

En el caso de la infección en ovejas preñadas, se ha observado además de la placentitis, una linfoproliferación observable en los órganos parenquimatosos y nódulos linfáticos de los corderos, trombosis y neumonía intersticial (Martinov y cols., 1989).

2.4.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA FIEBRE Q EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

2.4.4.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA FIEBRE Q AGUDA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La fiebre Q aguda se ha podido reproducir con éxito en numerosos animales de experimentación entre los que se incluyen ratones, conejos, cobayas y monos. La fase aguda de la fiebre Q en estos animales puede ser asintomática, inducir un cuadro febril y la formación de granulomas o, ser de curso fatal, especialmente, si el inóculo de *C. burnetii* utilizado para producir la infección es lo suficientemente importante. Veamos a continuación cómo se expresa la fase aguda de la fiebre Q en las diferentes especies citadas.

2.4.4.1.1. FISIOPATOLOGÍA DE LA FIEBRE Q AGUDA EN RATONES

Los ratones inoculados experimentalmente, ya sea por vía intranasal o intraperitoneal, se muestran asintomáticos y no muestran siquiera, un cuadro febril (Lang, 1990). Eso sí, estos animales muestran lesiones granulomatosas en las que se pueden apreciar células mononucleares en el bazo, hígado, riñones y en las glándulas adrenales (Burnet y Freeman, 1937; Perrin y Bengtson, 1942). Se pueden apreciar numerosas bacterias mediante el uso de la inmunohistoquímica en el hígado y en el bazo. Las lesiones granulomatosas persisten varias semanas e incluso meses.

Los ratones de experimentación, cuando se convierten en enfermos crónicos, se transforman en portadores que excretan la bacteria en heces y en orina. Además, en ratones blancos, se ha demostrado la posibilidad de que enfermedades latentes recidiven tras tratamientos con esteroides realizados tres meses después de la inoculación con *C. burnetii*. El mismo efecto se ha demostrado cuando se han hecho ensayos de irradiación en el cuerpo de ratones previamente inoculados (Sidwell y cols., 1964a y b).

El rol del sistema inmune en el desarrollo de la fiebre Q también ha sido evaluado en estos animales. De esta manera se ha podido constatar que los ratones que disponen de timo resisten la infección de la fase I de *C. burnetii*, mientras que los ratones atímicos se convierten en enfermos crónicos tras su inoculación (Kishimoto y cols., 1978).

La vía de inoculación de *C. burnetii* en los ratones puede determinar la existencia de varias manifestaciones patológicas. Se pudo observar esplenomegalia y hepatomegalia únicamente en los ratones inoculados por vía intraperitoneal. La formación de granulomas hepáticos se observó predominantemente en los animales inoculados intraperitonealmente aunque también, se pudo observar con menor frecuencia en los animales inoculados intranasalmente. Asimismo, la alveolitis

intersticial predominó entre los ratones infectados intranasalmente (Marrie y cols., 1996).

2.4.4.1.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA FIEBRE Q AGUDA EN COBAYAS

Los cobayas han sido utilizados con frecuencia para el aislamiento de *C. burnetii* antes de que se desarrollara la tecnología que permite realizar los cultivos celulares (Lang, 1990). Se prefería la inoculación de este animal a la del ratón de experimentación, con muestras de casos clínicos, debido a que este último se mostraba frecuentemente asintomático tras la inoculación. Se utilizaban frecuentemente cobayas adultas por presentar una respuesta uniforme ante la infección por *C. burnetii*. Pueden ser inoculadas tanto intranasal como intraperitonealmente.

La infección por *C. burnetii* se muestra en estos animales como una hipertermia (40 °C o más) 1 ó 2 semanas después de la inoculación. A menos que el inoculo inicial sea muy grande (mayor a 10^6 bacterias), los animales sobrepasan la infección tras dos o tres semanas sin que queden ningún tipo de secuelas. Se produce una bacteriemia tras la infección que dura unos 5 ó 7 días que cesa dando lugar a otra fase de la infección en la que se pueden detectar anticuerpos específicos contra el agente causal. Los anticuerpos contra la fase II de *C. burnetii* son detectables transcurridos 15 días tras la inoculación, mientras que para detectar anticuerpos frente a ambas fases de *C. burnetii* (fase I y II) es necesario esperar dos meses (Maurin y Raoult, 1999).

Se pueden apreciar lesiones en diferentes órganos transcurridos unos pocos días después de la infección y persisten 2 ó 3 semanas (Lillie, 1942). Tiene lugar el engrosamiento de nódulos linfáticos esplénicos y mesentéricos. El análisis microscópico de muestras de pulmón muestra la existencia de infiltrados de células mononucleares, mientras que el análisis de muestras de hígado, bazo y médula ósea, evidencian la existencia de granulomas. Este tipo de lesiones, como se dijo anteriormente, suelen pasar sin dejar secuelas durante la convalecencia.

Por otra parte, a menudo, los cobayas infectados siguen padeciendo infecciones latentes tras haber pasado el periodo de convalecencia de la fase aguda de la fiebre Q, de tal manera, que la enfermedad vuelve a recidivar en determinadas circunstancias (Sidwell y cols., 1964a y b; Atzopien y cols., 1994).

Por tanto, el curso de la infección de la fiebre Q aguda del cobaya se

corresponde con una enfermedad aguda que presenta un cuadro febril, con formación de granulomas en el hígado, bazo, médula ósea y otros órganos y, con una rápida regresión de los síntomas clínicos y de las lesiones granulomatosas. Luego, este tipo de modelo experimental es muy próximo al curso de la fiebre Q aguda en humanos, lo cual hace más interesante el estudio de la enfermedad en cobayas que en ratones de experimentación. (Maurin y Raoult, 1999).

También se ha realizado un estudio sobre la influencia que puede tener la vía de inoculación con respecto al cuadro de lesiones patológicas encontrado (La Scola y cols., 1997). En dicho estudio se observó que los infiltrados celulares en pulmón eran más frecuentes cuando se utilizaba la vía de inoculación intranasal en vez de la intraperitoneal, mientras que los granulomas se observaban con mayor frecuencia en cortes histológicos de hígados de cobayas inoculados intraperitonealmente. A su vez, se apreció que solo los animales inoculados con dosis superiores a 10^5 bacterias mostraron miocarditis. Estos resultados sugieren que la vía de inoculación y la dosis infectante pueden influir en el cuadro lesional provocado por la fiebre Q aguda en los cobayas.

2.4.4.1.3. FISIOPATOLOGÍA Y LESIONES DE LA FIEBRE Q AGUDA EN OTROS ANIMALES EXPERIMENTALES

Inoculación experimentales de *C. burnetii* han sido realizados menos frecuentemente en otras especies como hamsters, conejos y monos.

Los ensayos en hamsters han mostrado a este animal como perfecto para realizar aislamientos de *C. burnetii* a partir de la inoculación de muestras clínicas, ya que se pueden extraer fácilmente grandes cantidades de esta bacteria, sobre todo, del bazo de los animales infectados (Stoenner y Lackman, 1960). Los conejos también han sido utilizados con el fin de realizar aislamientos de *C. burnetii*. La inoculación de hembras preñadas produce, a menudo, muerte fetal (Maurin y Rault, 1999).

La patogénesis de la fiebre Q también ha sido estudiada en monos. Animales infectados por vía aerógena mostraron neumonía, tos y disnea a los 4 ó 7 días postinfección. La bacteriemia pudo ser detectada entre los 7 y 13 días después de realizar la inoculación y el examen patológico de las muestras de pulmón y de hígado revelaron la presencia de neumonía intersticial y de hepatitis subaguda. Igualmente, se demostró la presencia de *C. burnetii* en muestras histopatológicas de pulmón,

bazo, hígado, riñón, corazón y testículos. Anticuerpos específicos contra las fases I y II de *C. burnetii* fueron detectados mediante IFI los días 7 y 14, respectivamente (Gonder y cols., 1979).

2.4.4.2. INOCULACIONES DE EMBRIONES DE POLLO

Desde que Cox y Bell (1939) demostraron que *C. burnetii* podía crecer en el saco vitelino de los embriones de pollo. Este sistema de cultivo ha sido ampliamente usado para el aislamiento y para el mantenimiento y multiplicación de esta bacteria en los laboratorios especializados (Weiss y Pietryk, 1957; Ormsbee y cols., 1985). *C. burnetii* provoca la muerte del embrión de pollo en 14 días. Como es lógico, el inóculo realizado a partir de muestras clínicas obtenidas de los afectados por la fiebre Q tendrán la fase I de *C. burnetii*, mientras que tras sucesivos pases nos encontraremos con la fase II, siendo irreversible el proceso de cambio a fase I tras un número considerable de pases en los medios de cultivo.

2.4.4.3. FISIOPATOLOGÍA Y LESIONES DE LA FIEBRE Q CRÓNICA EN LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales infectados con *C. burnetii* nunca muestran endocarditis de manera espontánea, aún habiéndose cronificado la enfermedad y sea cual sea la cepa inoculada. El rol de la inmunidad en la prevención de la evolución de la enfermedad a una fase crónica de la misma ha sido demostrada en ratones y en cobayas. Por otra parte, se ha visto que los ratones atímicos evolucionan sistemáticamente hacia la fase crónica de la fiebre Q (Kishimoto y cols., 1974). A su vez, se ha demostrado que la infección crónica puede ser establecida en los cobayas tras la aplicación de esteroides (Sidwell y cols., 1964b) o tras la irradiación corporal (Sidwell y cols., 1964a).

2.5. DIAGNÓSTICO DE LA FIEBRE Q Y SU APLICACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

“En los momentos de crisis, sólo la imaginación es más importante que el conocimiento”

Albert Einstein

2.5.1. DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Existen estudios que relacionan a la fiebre Q con la producción de fiebre, debilidad, anorexia, rinitis, conjuntivitis, bronconeumonía, pérdida de peso, artritis y mamitis, además de haberse observado, el nacimiento de animales débiles que sobreviven al parto, con anemia, ataxia, emaciación y parálisis. En el caso concreto del ganado ovino, en hembras preñadas infectadas en el segundo y tercer tercio de gestación, los primeros signos clínicos se detectan entre los 5 y 12 días tras la infección, apareciendo en primer lugar, un proceso febril bifásico. A una perra parturienta, fuente de infección en un brote de neumonía por fiebre Q en varios miembros de una familia que estaban presentes en el parto del animal, se observó que una parte de los cachorros murieron poco después de nacer, muriendo el resto de cachorros antes de las 24 horas posparto (Martinov y cols., 1989; Damoser, 1993; Buhariwalla y cols., 1996; Barlow y cols., 2007). Sin duda, los signos clínicos observados en los rumiantes domésticos, al margen de la consabida importancia de esta enfermedad en los índices reproductivos de estos animales, deben tener repercusiones considerables en la productividad de los animales afectados no cuantificadas aún. Estos síntomas además, son asociables en diferentes tipos de cuadros cuya repercusión en la sanidad y producción animal han sido ampliamente estudiados, como es el caso de las neumonías, las mamitis subclínicas y las artritis (Buxadé y cols., 1996).

2.5.2. DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO

Como se ha visto en el apartado 2.4 sobre fisiopatología de la fiebre Q de la presente revisión bibliográfica, *C. burnetii* cuenta con una serie de órganos diana, los cuáles, pueden variar según la enfermedad sea aguda o crónica, o según la especie afectada por la enfermedad. La detección de dicho agente causal a partir de muestras de tejidos de dichos órganos es posible gracias a técnicas inmunológicas. En este sentido, las técnicas pueden aplicarse en tejidos frescos fijados con acetona o

bien tras fijarlos en formol y embeberlos en parafina (Raoult y cols., 1994). Las técnicas existentes serían la inmunoperoxidasa (Brouqui y cols., 1994), el sistema de captura de antígeno mediante ELISA/ELIFA (Thiele y cols., 1992) y la inmunofluorescencia a partir de anticuerpos monoclonales o policlonales, siendo aplicable esta última técnica únicamente en las muestras tratadas con parafina (McCaul y Williams, 1990; Thiele y cols., 1992; Muhlemann y cols., 1995). Estas técnicas son utilizadas rutinariamente en medicina humana con el fin de analizar los tejidos de las válvulas cardíacas en los pacientes de fiebre Q crónica, una vez estas han sido extraídas del paciente (Maurin y Raoult, 1999).

En medicina veterinaria, la principal aplicación de estas técnicas en animales vivos ha sido el análisis de placentas y, en menor medida, el de órganos diana en los fetos tras los abortos, ya que la *Coxiella* suele afectar de manera más importante a la placenta que al feto (Palmer y cols., 1983; Zeman y cols., 1989; van Moll y cols., 1993; Masala y cols., 2007; Sánchez y cols., 2007).

2.5.3. DIAGNÓSTICO MEDIANTE CULTIVO DE *Coxiella burnetii*

Esta técnica diagnóstica se utiliza más como una herramienta para poder replicar a esta bacteria para posteriores pruebas laboratoriales o ensayos experimentales que como técnica rutinaria de diagnóstico. Además, dado el fuerte riesgo de contagio para el hombre, el cultivo de *C. burnetii* precisa de ser llevado a cabo en instalaciones que cumplan las exigencias contempladas para el Grupo de Contención 3 (Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008). Cuando en el examen microscópico de las muestras se detecta un bajo nivel de contaminación por otras bacterias y un número importante de células de *C. burnetii*, es posible el aislamiento directo por inoculación de huevos de gallina embrionados o de cultivos celulares. El proceso de cultivo en los huevos de gallina embrionados es preferible realizarlo con huevos libres de patógenos específicos (SPF). El proceso dura entre 10 y 15 días y pueden ser necesarios varios pases para llegar a obtener un cultivo puro de *C. burnetii*. Adicionalmente, la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede utilizar conjuntamente para detectar la presencia de *C. burnetii* en el cultivo (Ho y cols., 1995).

Existe un método más seguro, que en principio se diseñó para el cultivo de virus y que posteriormente, se adaptó para el cultivo de bacterias estrictamente intracelulares, o intracelulares facultativas. Este es el método del vial cerrado de cultivo celular. Dicho método se ha probado con éxito para el cultivo de *C. burnetii*

(Raoult y cols., 1990a; Fournier y cols., 1998a). Básicamente, consiste en la inoculación de suspensiones de la muestra problema en fibroblastos de pulmón de embrión humano (células HEL) en el interior de un vial de bioseguridad cerrado. Este método permite, mediante una serie de pases, mantener el cultivo hasta 3 meses, para luego proceder a su cultivo definitivo en capas confluyentes de células Vero o de células L929 de fibroblastos de ratón en un recipiente de cultivo, con el fin de establecer un aislamiento definitivo de *C. burnetii* (Spyridaki y cols., 2002).

En el caso de muestras muy contaminadas con otras bacterias (placentas, descargas vaginales, heces, leche, etc.) puede ser necesario recurrir, previa al cultivo celular, a la inoculación en animales de experimentación. En este sentido, los animales más apropiados son los ratones y, preferiblemente debido a la facilidad con la que detectan los síntomas tras la inoculación, los cobayas (Scott y cols., 1987). Tras inocular intraperitonealmente a los animales con la muestra problema, se les controla la temperatura corporal y es aconsejable realizar chequeos serológicos y utilizar grupos de animales que sirvan de control, a los que también se vigilarán serológicamente. Una vez se detectan signos de enfermedad, principalmente fiebre, se sacrifican los animales inoculados y se les extrae el bazo con el fin de obtener muestras que serán cultivadas en embrión de pollo. Asimismo, la detección de *C. burnetii* en los bazos de los animales infectados se puede realizar mediante tinción de frotis, o bien, mediante PCR a los 7-9 días tras la inoculación (Arricau-Bouveri y cols., 2003).

Si bien la caracterización de los aislamientos resulta de interés para el estudio del variable comportamiento de la fiebre Q en las poblaciones humanas y animales de las diferentes localizaciones geográficas de la enfermedad, lo cierto es que el cultivo celular no permite la diferenciación de tipos. En este sentido, las técnicas moleculares orientadas a la tipificación genética resultan sumamente interesantes. No obstante, el cultivo de *C. burnetii* seguirá siendo necesario para, por ejemplo, estudiar la virulencia de los diferentes tipos genéticos detectados y los mecanismos fisiopatológicos, así como los factores asociados al agente que influyen en la virulencia de los mismos (Glazunova y cols., 2005; Klee y cols., 2006).

2.5.4. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

En medicina humana, las técnicas serológicas en conjunción con los hallazgos clínicos, han sido ampliamente utilizadas para confirmar el diagnóstico rutinario de la fiebre Q. A ello ha contribuido la sencillez, así como la sensibilidad y especificidad de

las mismas. Por otra parte, estas técnicas permiten diferenciar la enfermedad aguda de la crónica. Eso sí, es necesario esperar un mínimo de dos o tres semanas después de la infección para poder detectar la fase aguda de la enfermedad, produciéndose el pico máximo de producción de anticuerpos contra *C. burnetii*, en torno al mes y medio tras la infección (Maurin y Raoult, 1999).

Aunque en medicina veterinaria, la serología ha sido ampliamente utilizada en estudios serológicos sobre diferentes poblaciones animales con el fin de establecer las tasas de seroprevalencia de las mismas, su aplicación rutinaria orientada al diagnóstico individual de la enfermedad puede resultar compleja. La ausencia de signos clínicos en muchas ocasiones unido a que los animales infectados pueden permanecer seropositivos durante varios años tras la infección aguda o, pueden eliminar la bacteria al medio antes de desarrollar anticuerpos o también, pueden ser infectados sin expresar seroconversión, contribuye a la citada complejidad del diagnóstico serológico individual en los animales. Para interpretar los resultados en las poblaciones se precisan al menos de 10 animales (abortados o no), precisándose para establecer la presencia de infección, tanto la respuesta serológica cómo la evidencia de la existencia de *C. burnetii* mediante cultivo o técnicas como la PCR (Adesiyun y cols., 1985; Arricau-Bouveri y cols., 2001; Berri y cols., 2001).

En la actualidad no se utilizan rutinariamente las técnicas serológicas más antiguas: la técnica de la microaglutinación, la prueba de aglutinación capilar y la prueba de hemólisis indirecta. Sin embargo, una técnica basada en la aglutinación de partículas de alta densidad ha sido probada recientemente con éxito, mostrando mayor sensibilidad y especificidad que la microaglutinación (Nguyen y cols., 1996). Las técnicas más utilizadas hoy en día son, **la fijación del complemento (FC), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), y el método del enzimoimmunoensayo (ELISA).**

La fijación del complemento (FC) ha sido ampliamente utilizada en medicina humana, si bien la tendencia ha sido la de ser desplazada paulatinamente por técnicas como la IFI y el ELISA. El suero inactivado por calor puede someterse a la reacción de la FC contra las fases I y II de *C. burnetii*. Títulos de anticuerpos por la FC contra la fase II mayor o superiores a 1:40 son indicativos de fiebre Q aguda en humana, mientras que la presencia de títulos superiores a 1:200 contra la fase I son indicativos de fiebre Q crónica (Hendrix y cols., 1991; Guigno y cols., 1992; Peter y cols., 1992). La FC es una técnica serológica de alta especificidad, pero es menos sensible y precisa de más tiempo de ejecución que la IFI y el ELISA (Peter y cols., 1985). Por otra parte, se ha observado que la seroconversión es detectada por la FC

entre los 14 - 21 días tras la infección, mientras que con la IFI y el ELISA esta franja de tiempo se reduce, detectándose la seroconversión entre los 10 - 15 días (Peter y cols., 1985; Guigno y cols., 1992). Por otro lado, en humana han sido detectados resultados falsos-negativos por FC en pacientes crónicos de fiebre Q con altos títulos de anticuerpos debido al fenómeno prozona, así como falsos-positivos relacionados con reacciones cruzadas con antígenos de huevos de gallina.

En el caso de los estudios de seroprevalencia basados en la utilización de la FC, en epidemiología veterinaria la presencia de títulos de 1:10 y 1:40 indican la presencia de infección latente, mientras que la presencia en uno o más sueros en grupos de 5 a 10 animales con títulos de 1:80 o superiores, revelan una fase evolutiva de la infección (manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008). En el caso de la epidemiología humana, los títulos más frecuentemente utilizados para la realización de este tipo de estudios son 1:8 y 1:16 (Téllez, 1992; Pascual, 1994).

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es la técnica serológica de referencia para el diagnóstico de la fiebre Q en medicina humana. También ha sido ampliamente utilizada en estudios epidemiológicos en medicina veterinaria (Peacock y cols., 1983; Tissot-Dupont, 1994). Esta técnica cuenta con la ventaja de que precisa de poca cantidad de antígeno de *C. burnetii*. Se utilizan también antígenos de las fases I y II de este agente causal, obteniéndose los antígenos de la fase II mediante cultivo celular y los de fase I a partir del bazo de ratones de experimentación infectados. Esta técnica permite la detección de distintas subclases de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) y puede ser mejorada mediante la utilización de un absorbente de factor reumatoide para eliminar la IgG antes de determinar los niveles de IgM o de IgA (Tissot-Dupont, 1994).

En medicina humana, la seroconversión durante la fiebre Q aguda suele ser detectada mediante IFI a los 7-15 días tras la aparición de los síntomas, encontrándose anticuerpos contra *C. burnetii* en el 90% de los pacientes infectados a la tercera semana. Maurin y Raoult (1999) proponían una rutina de diagnóstico, en la cual, se realiza un escrutinio previo de las muestras analizadas en el que se establece un punto de corte con títulos de 1:50 ante la fase II. Las muestras que cumplen este requisito se estiman como positivas y pueden ser sometidas a pruebas posteriores de diluciones seriadas ante las fases I y II de *C. burnetii* así como a la determinación de los niveles de IgG, IgM e IgA, con el fin de ahondar en materias como el curso de la enfermedad. De esta forma, en su rutina diagnóstica en Francia, dichos autores

consideran que títulos de IgG \geq 1:200 y de IgM \geq 1:50 contra la fase II son indicativos de fiebre Q aguda en el hombre (Maurin y Raoult, 1999).

Lógicamente, los puntos de corte propuestos por los citados autores como criterio de escrutinio inicial y de diagnóstico de la fiebre Q aguda variarán según las diferentes regiones geográficas en virtud de las diferencias existentes en la inmunidad poblacional. De ahí la importancia de la realización de estudios de seroprevalencia en las zonas donde existe la enfermedad, con el fin de poder obtener valores de referencia de cara, por ejemplo, al diagnóstico individual de la enfermedad. Este aspecto es de mayor aplicación en la actualidad en medicina humana. De esta forma, en España, los títulos más aceptados de cara al diagnóstico de la fiebre Q aguda humana serían IgM \geq 1:64 y de IgG \geq 1:1024 contra la fase II de *C. burnetii* (Pascual, 1994; Marrie y Pollak, 1995).

Donde sí se unifican los criterios de cara a la elección de los puntos de corte de la IFI es en el diagnóstico de la fiebre Q crónica humana. En este sentido, la presencia de anticuerpos contra la fase I de *C. burnetii* son indicativos de enfermedad crónica. De esta manera, títulos de IgG \geq 1:800 contra la fase I son un buen indicador de la presencia de fiebre Q crónica y de endocarditis. Si bien, el mejor criterio de diagnóstico para la endocarditis es la detección del mencionado punto de corte y la presencia de la bacteria en sangre mediante cultivo (Fournier y cols., 1996). Otro indicador de la presencia de endocarditis es la presencia de títulos de IgA \geq 1:50 contra la fase I (Tissot-Dupont, 1994; Fournier y cols., 1996).

En cuanto a los estudios de seroprevalencia mediante la utilización de la IFI, en epidemiología veterinaria se suele utilizar como punto de corte para estos estudios, valores para la IgG \geq 1:160 contra la fase II de *C. burnetii* como indicativo de presencia de enfermedad (manual de la OIE sobre animales terrestres 2008), si bien hay estudios que utilizan valores de 1/20 como indicativo de haber pasado la enfermedad (Pascual, 1994). En epidemiología humana, el título mínimo que se acepta como signo de haber pasado la enfermedad es el de IgG \geq 1:20 contra la fase II, mas otros autores utilizan títulos de 1:40 y 1:80 (Pascual, 1994). Mientras que en las poblaciones humanas de Dinamarca se ha procedido a la revisión de los valores de corte para la detección de anticuerpos contra la enfermedad mediante la inmunofluorescencia indirecta, lo cual, supone un importante avance en materia de diagnóstico aplicable a estudios seroepidemiológicos futuros en dicha región (Villumsen y cols., 2010).

El enzoinmunoensayo (ELISA) es más sensible que la FC y la IFI (Field y cols., 1983; Peter y cols., 1988; Cowley y cols., 1992) y también, permite detectar anticuerpos contra las fases I y II de *C. burnetii*. Los puntos de corte propuestos en medicina humana para la fiebre Q aguda serían de $IgG \geq 1:1024$ y de $IgM \geq 1:512$ para la fase II, mientras que para la detección de la fiebre Q crónica los valores de IgG o bien de IgM contra la fase I han de ser superiores al valor 1:128 (Waag y cols., 1995). Sin embargo, la técnica de ELISA es más compleja de cara a la interpretación de los resultados, así como del aparataje necesario, con lo cual, se suele utilizar mayoritariamente en estudios seroepidemiológicos realizados por laboratorios de referencia (Peter y cols., 1987).

En cuanto a los estudios seroepidemiológicos, en epidemiología veterinaria los valores de corte suelen situarse en títulos para la IgG contra la fase II de 1:100 (manual de la OIE sobre animales terrestres, 2008), mientras que en epidemiología humana, los niveles de significación para este tipo de estudios se sitúan en títulos de $IgG \geq 1:500$ a 1:1000 contra la fase II (Pascual, 1994).

Otras técnicas serológicas propuestas para el diagnóstico de la fiebre Q incluyen **el dot inmunoblotting, el Western blotting, el test de la hemólisis indirecta y el radioinmunoensayo**. **El dot inmunoblotting** se ha mostrado como una técnica altamente sensible y específica que puede utilizarse para realizar cribados de muestras previos a otros análisis (Cowley y cols., 1992). **El Western blotting** también ha mostrado ser una técnica sensible y específica, pero se trata de una técnica en la que hay que invertir mucho tiempo y los resultados obtenidos no son reproducibles en muchos casos (Blondeau y cols., 1990). **El test de la hemólisis indirecta** ha mostrado ser altamente sensible y específico al igual que el **radioinmunoensayo** (Doller y Gerth, 1984; Tokarevich y cols., 1990). El problema del radioinmunoensayo basado en la detección de IgM marcada con ^{125}I , es que precisa ser llevado a cabo en laboratorios diseñados y con equipamiento para trabajar con radioisótopos. También se han diseñado métodos para poder realizar análisis serológicos a partir de muestras de leche con el fin de aplicarlo en estudios epidemiológicos en las producciones lecheras de rumiantes, pero estas técnicas se muestran menos sensibles que técnicas como la PCR (Rodalakis y cols., 2007).

Por último, se han detectado reacciones cruzadas al utilizar la serología en el diagnóstico de la fiebre Q con otras bacterias patógenas para el hombre como *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Bartonella quintana* y *Bartonella henselae*. Sin embargo, el diagnóstico diferencial se puede realizar fácilmente

mediante la cuantificación de los anticuerpos contra las fases I y II de *C. burnetii* (Dobija-Domaradzki y cols., 1984; Dyer y cols., 1988; Finidori y cols., 1992; La Scola y Raoult, 1996; Musso y Raoult, 1997).

2.5.5. DIAGNÓSTICO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Existen estudios de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) desde inicios de los años 1970. Si bien, la mayor producción de trabajos científicos relacionados con este campo tienen sus orígenes en los inicios de la década de 1990 con trabajos basados en la aplicación de técnicas de PCR de tipo convencional para la detección de *C. burnetii*. El último avance en este sentido es la creación de sistemas automatizados para la extracción y purificación del ADN muestral y la aplicación de la PCR a tiempo real para su detección (Maurin y Raoult, 1999).

El diagnóstico de la fiebre Q mediante PCR ha sido utilizado con éxito tanto en la medicina humana como en la veterinaria para la detección de *C. burnetii* en cultivos y en muestras procedentes de tejidos diana, leche, secreciones vaginales, semen, orina y heces (Kruszewska y cols., 1996; Maurin y Raoult, 1999; Berri y cols., 2000; Rodalakis y cols., 2007; Vaidya y cols., 2008). Este método ha sido probado directamente sobre muestras de sangre humana, pero los resultados no han sido satisfactorios para las PCR convencionales, siendo frecuentes los falsos positivos (To y cols., 1996; Maurin y Raoult, 1999). Las técnicas nuevas de PCR a tiempo real parecen haber solucionado este problema, convirtiendo a este tipo de técnicas en un medio de detección precoz, siendo muy eficaz antes de los 17 días tras la infección. Es capaz de detectar la enfermedad en el periodo de tiempo en el que no se puede detectar una respuesta inmune por medio de técnicas serológicas (Fournier y Raoult, 2003; Schneeberger y cols., 2002). Por otra parte, la PCR detecta *C. burnetii* en cultivos en viales de bioseguridad de muestras de sangre de pacientes de fiebre Q aguda y crónica que ya habían iniciado su tratamiento antibiótico, mientras que el cultivo de *C. burnetii* por sí solo, no permite la detección de la bacteria en este tipo de pacientes que ya han iniciado su medicación (Musso y Raoult, 1995).

De entre las aplicaciones epidemiológicas en veterinaria de la PCR con importantes repercusiones en materia de salud pública, caben destacar los avances importantes que se han logrado en las últimas dos décadas en el estudio de los diferentes patrones de eliminación al medio externo de *C. burnetii* por parte de las diferentes especies de rumiantes domésticos, así como la determinación de la

influencia de estrategias de control como la vacunación en dichos patrones (Arricau-Bouveri, 2003; Guatteo y cols., 2008).

Se han desarrollado cebadores específicos a partir de la secuencia de diversos genes como el gen de la superóxido dismutasa (conocido también como *sodB*), el gen *com1* que codifica una proteína de 27 kDa de la membrana, el operón que codifica dos proteínas de choque térmico (*htpA* y *htpB*), el gen que codifica la isocitrato deshidrogenasa (*icd*) y el gen IS1111, el cual codifica para una transposasa, siendo éste último el más se ha usado para la detección de *C. burnetii* mediante PCR (Vodkin y Williams, 1988; Heinzen y cols. 1990; Stein y Raoult, 1992; To y cols., 1996; Yuasa y cols., 1996; Nguyen y Hirai, 1999; Spiridaki y cols., 2002; Klee y cols., 2006; Vaidya y cols., 2008). También se han desarrollado PCRs basadas en la amplificación de regiones de genes presentes en otras bacterias para la detección de *C. burnetii*. Un ejemplo de este tipo de genes es el 16s rRNA (Stein y Raoult, 1993; Sjöstedt y cols., 1998; Spyridaki y cols., 2002).

Las primeras técnicas de PCR orientadas al diagnóstico de *C. burnetii* eran de **tipo convencional**, esto es, se llevaba a cabo un proceso de extracción y purificación del ADN muestral, para luego proceder a su amplificación y una vez amplificado, se procedía a la detección de los amplicones o fragmentos amplificados por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Uno de los grandes retos en medicina humana durante el desarrollo de este tipo de técnicas fue el de diseñar técnicas de PCR más sensibles y específicas que pudieran detectar la presencia de *C. burnetii* directamente a partir de muestras de sangre. En este sentido, por ejemplo, se diseñaron PCRs anidadas (nested-PCRs) que intentaban aumentar la sensibilidad mediante una amplificación en dos etapas del ADN muestral con el fin de paliar los efectos negativos de la gran cantidad de agentes inhibidores de la PCR presentes en la sangre. Pero se detectó que estas técnicas daban muchos resultados falsos positivos (To y cols., 1996; Maurin y Raoult, 1999).

Otro problema que se presentaba en el desarrollo de técnicas de PCR más sensibles eran los métodos de extracción del ADN. La diversidad de las muestras a analizar para la detección de *C. burnetii* (tejidos, leche, secreciones, heces) obligaba a los laboratorios de diagnóstico a desarrollar sus propios métodos de extracción para cada tipo de muestra. Esto implica una dedicación de tiempo importante a las labores de extracción de ADN y la reproducibilidad de la técnica en otros laboratorios no siempre era satisfactoria. Actualmente se cuenta con métodos de extracción

estandarizados y robotizados que solucionan los citados problemas (Berri y cols., 2000; Costa, 2004).

Dentro del proceso de evolución de las PCR convencionales, otros problemas que se presentaban eran el alto riesgo de falsos positivos por contaminación cruzada de las muestras que obligaba a llevar a cabo laboriosas prácticas de ordenamiento y realización del trabajo así como de descontaminación del ambiente, orientadas a minimizar el riesgo (Higuchi y Kwok, 1989; Longo y cols., 1990; Cimino y cols., 1991; Costa, 2004).

De las PCR convencionales destinadas al diagnóstico de la fiebre Q, la de mayor éxito ha sido la trans-PCR, basada en la amplificación de regiones específicas del gen *IS1111*. Este transposón se encuentra en un número variable de copias (entre 7 y 110) según el análisis de este gen en diferentes aislamientos de *C. burnetii* realizados en distintas regiones del mundo (Berri y cols., 2000; Klee y cols., 2006). La presencia de copias múltiples del gen en el genoma de *C. burnetii* logra que la amplificación de las regiones específicas del mismo en una sola etapa sea mayor que la lograda para otras PCR basadas en la amplificación de regiones específicas de un único gen, con lo que la sensibilidad de la prueba se ve considerablemente aumentada.

Con el desarrollo de la **PCR a tiempo real**, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante la detección de la emisión de fluorescencia se puede medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que ésta es proporcional al ADN formado. Los termocicladores utilizados para la PCR a tiempo real llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia y son capaces de medir la fluorescencia producida por moléculas emisoras o fluorocromos durante el proceso de amplificación en cada momento. Dentro de este tipo de sistemas de detección por fluorescencia tenemos dos tipos: **los agentes intercalantes** y **las sondas de hibridación específicas marcadas con fluorocromos** (Higuchi y cols., 1993).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente su emisión cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema tiene la ventaja de que la optimización de la reacción es más fácil, permite la utilización de determinados

cebadores diseñados para la PCR convencional y es más barato que la utilización de las sondas de hibridación específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en las PCRs (Costa, 2004).

Para aumentar la especificidad con los agentes intercalantes, deben utilizarse cebadores que minimicen la formación de dímeros y deben de emplearse condiciones de reacción óptimas. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR), lo cual disminuye el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden utilizar polimerasas recombinantes modificadas que solo funcionan a altas temperaturas o anticuerpos bloqueantes del centro activo de la polimerasa que se desnaturalizan a altas temperaturas permitiendo la actividad de la misma (Kellogg y cols., 1994; Moretti y cols., 1998).

Otro método para mejorar la especificidad es la detección de la temperatura de fusión de los productos amplificados o T_m . La mayoría de los equipos de PCR a tiempo real permiten determinar este parámetro, el cual, se define como la temperatura a la que el 50% del ADN del producto amplificado se encuentra desnaturalizado. Cada fragmento tiene su T_m característica, sobre todo en función de su longitud y de la composición (contenido en citosina y guanina). El objetivo último de este método es la diferenciación entre la T_m de la región específica diana y las T_m de otros productos inespecíficos y/o dímeros de cebadores, no obstante, este método no siempre ofrece una garantía absoluta (Kellogg y cols., 1994; Moretti y cols., 1998). Para lograr buenos resultados con este método es conveniente que haya diferencias notables de T_m entre los fragmentos a amplificar del ADN diana y el resto de productos inespecíficos, para lo cual, es interesante que la T_m del ADN diana sea alta, ya que, por ejemplo, las T_m de los dímeros y otros productos inespecíficos suelen ser bajas. Por último, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana (Costa, 2004).

Las sondas híbridas específicas son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la detección de transferencia de energía fluorescente mediante resonancia entre las dos moléculas (proceso FRET). Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también TaqMan, las sondas moleculares beacons y las sondas FRET. En todos estos sistemas, el incremento de ADN se corresponde con un aumento de la hibridación de las sondas, con lo cual, el fluorocromo emisor de fluorescencia se acerca al

fluorocromo receptor, lo que permite la mencionada transferencia de energía fluorescente o FRET y su detección por parte de los detectores de fluorescencia del equipo de PCR a tiempo real. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección, ya que solo hibridan en los amplicones específicos del ADN que se pretende detectar, y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el del SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil (Costa, 2004).

Por otra parte, la PCR a tiempo real permite la cuantificación de una manera más sencilla y precisa que la PCR convencional (Tyagi y Kramer, 1996). El método para cuantificar consiste en crear una curva patrón a base de analizar muestras control con diferentes concentraciones del ADN diana y observando en qué ciclos se supera un umbral de fluorescencia mínimo establecido para dar la muestra como positiva. De esta manera, cuando se analizan las muestras problema, si una muestra es positiva o supera el umbral de fluorescencia de corte de la prueba, observando el ciclo umbral o ciclo del ensayo en el que se sobrepasa dicho umbral, se puede establecer la cantidad de ADN diana inicial presente en la muestra.

2.5.6. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LAS PCRs Y APLICACIONES

Basándose en la amplificación de regiones del gen *IS1111*, Vaidya y colaboradores (2008) comparan una trans-PCR convencional, basada en la utilización de cuatro cebadores (trans1, trans2, trans3 y trans 4) diseñados para amplificar un fragmento de 687 pb y otro de 243 pb, con una PCR a tiempo real basada únicamente en la utilización de los cebadores trans3 y trans4 (para amplificar un fragmento de 243 pb), aplicándose en un estudio de muestras de placenta, fluido vaginal, heces y orina de mujeres que mostraron aborto espontáneo. A su vez, se compararon los resultados obtenidos en ambas PCR con los de cultivo y análisis de sueros sanguíneos mediante IFI. Cuando en el laboratorio se testaban controles para establecer las curvas patrón para la cuantificación bacteriana la PCR a tiempo real se mostró más sensible que la PCR convencional. Sin embargo, en el análisis de las muestras problema, no se vieron diferencias de sensibilidad entre ambas técnicas. Según este estudio, la IFI se mostró ligeramente más sensible que ambas técnicas de PCR (convencional y a tiempo real), sin embargo, ambas PCR se mostraron más sensibles (con una diferencia considerable) al cultivo de *C. burnetii*. El sistema de detección por fluorescencia utilizado en este caso fue el SYBER Green I.

Klee y colaboradores (2006) utilizaron sondas de hibridación específicas del tipo TaqMan como sistema de detección por fluorescencia de la PCR a tiempo real. En este estudio, se desarrollaron dos tipos de PCR a tiempo real: una basada en la amplificación de una secuencia específica del gen de la isocitrato deshidrogenasa o *icd* (el cual, cuenta con una sola copia en todos los aislamientos de *C. burnetii*) y otra basada en la amplificación de una secuencia específica del gen *IS1111* (el cual, como hemos visto, se muestra con un número variable de copias según los aislamientos). Ambas técnicas mostraron una gran sensibilidad, siendo más sensible la basada en la amplificación del gen *IS1111*. Sin embargo, la mejor técnica para cuantificar la presencia de *C. burnetii* en muestras de campo es la basada en el gen *icd*, debido a la variabilidad en el número de copias del gen *IS1111*. No obstante, los autores, teniendo en cuenta esta información, proponen un método para tipificar los aislamientos de *C. burnetii* de las diferentes regiones del mundo de una manera sencilla. Este método consiste en comparar los resultados de cuantificación obtenidos por ambas técnicas en muestras con idénticas concentraciones de *C. burnetii* para los diferentes aislamientos, con lo cual, se puede calcular el número aproximado de regiones *IS1111* presente en dicho aislamiento. Dicho método podría aplicarse, en el futuro, directamente sobre muestras de campo para determinar qué tipo de *C. burnetii* actúa en la región concreta donde se analizan dichas muestras.

Otro método propuesto para la tipificación que se basa en la amplificación del gen *IS1111* mediante PCR es el propuesto por Denison y colaboradores (2007b). En este caso, la técnica se basa en que se han observado hasta 20 tipos de secuencias diferentes para este gen, habiendo cepas como la Nine Mile que contiene en su genoma las 20 variantes existentes y cepas en las que están ausentes alguna o varias de estas variantes entre las copias del gen presentes en sus respectivos genomas. En este caso, no se trata de una PCR a tiempo real sino de una PCR convencional o de punto final, realizándose la misma en dos pasos: en un primer paso se utiliza una pareja de cebadores capaces de amplificar cualquiera de las diferentes variables del gen *IS1111*, mientras que en el segundo paso se utilizan 20 parejas de cebadores que amplifican de manera específica cada una de las 20 variantes posibles de este gen. El objetivo de la técnica es detectar que variantes del gen *IS1111* están ausentes en las diferentes cepas, estableciendo una clasificación de genotipos que cuenta con 5 grupos (Denison y cols., 2007b).

En una amplia revisión sobre los diferentes métodos de tipificación basados en la amplificación de ADN propuestos a nivel mundial (Sidi-Boumedine y Rousset, 2011), si bien es verdad que dichos autores proponen otros métodos como más

prometedores en cuanto a su relación coste-eficacia, citan a los métodos basados en la amplificación del gen IS1111 expuestos en los dos párrafos anteriores (Klee y cols., 2006; Denison y cols., 2007b) como métodos con una repetibilidad medio-alta, una reproducibilidad alta y con un coste relativo bajo-medio.

Otros ejemplos de aplicaciones de la PCR a tiempo real en la detección de *C. burnetii* los tenemos en el estudio de Barlow y colaboradores (2008). En él se relaciona a este agente causal con la producción de mamitis subclínica en Estados Unidos, o los trabajos ya mencionados al principio de este apartado, de Schneeberger y colaboradores (2002) y de Fournier y Raoult (2003), sobre la aplicación de una técnica de PCR a tiempo real en la rutina diagnóstica de la fiebre Q aguda humana mediante el análisis de muestras de suero sanguíneo en los pacientes.

Por último, hay que resaltar la gran especificidad que muestran las PCR específicas para la detección de *C. burnetii*. De hecho, en los casos concretos de las PCR basadas en los genes *icd*, así como en el *IS1111*, se han hecho pruebas para detectar posibles reacciones cruzadas con ADN de una amplia variedad de bacterias patógenas, incluyendo microorganismos muy cercanos filogenéticamente, como es el caso de especies de *Legionella* y *Francisella*, no obteniéndose nunca una reacción cruzada (Berri y cols., 2000; Klee y cols., 2006).

2.6. EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA

“No tengo talentos especiales, pero si soy profundamente curioso”

Albert Einstein

2.6.1. RESERVORIOS DE LA ENFERMEDAD

La fiebre Q cuenta con un amplio número de especies que se muestran como reservorios de esta zoonosis de distribución mundial. Incluyendo diferentes especies de mamíferos domésticos y salvajes, aves y artrópodos como las garrapatas (Aguirre y cols., 1984). De hecho, Babudieri, en una amplia revisión realizada llegó a la conclusión de que *C. burnetti* puede ser observada en todos los reinos animales (comentado en Aguirre y cols., 1984), representando los rumiantes domésticos el reservorio animal más importante de cara a la infección humana por *C. burnetii* (Marrie, 1990a).

2.6.1.1. RUMIANTES DOMÉSTICOS

Los primeros estudios de carácter seroepidemiológico realizados en ungulados domésticos mostraron la amplia difusión de esta enfermedad en muchos países (Kaplan y Bertagna, 1955). La mayoría de estos estudios datan de los años 60 y en muchas de las áreas donde se realizaron los mismos, la prevalencia real de la enfermedad en los animales estudiados era desconocida. Estudios posteriores confirmaron la alta prevalencia de la fiebre Q en el ganado (Krauss, 1989; Lang, 1990). El ganado vacuno, el ovino y el caprino son considerados los principales reservorios dentro de este grupo de animales. Estos animales excretan *C. burnetii* en la orina, en heces, en la leche y en las secreciones vaginales, así como en la placenta durante el parto y el postparto (Berri y cols., 2001; Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007).

Diversos estudios epidemiológicos sobre la fiebre Q realizados en las diferentes especies de ungulados domésticos apuntan a que el ganado vacuno suele alargar su estadio crónico de la enfermedad en mayor medida que el ganado ovino, por lo que puede significar un mayor riesgo de infección para las poblaciones humanas. De hecho, en los estudios en los que se han comparado ambas especies, se ha observado que en el ganado vacuno se prolonga en mayor medida la detección de anticuerpos específicos contra la enfermedad y la excreción de *C. burnetii* en comparación con los hallazgos encontrados en ovejas infectadas (Enright y cols.,

1957; Babudieri, 1959; Brooks y cols., 1986; Lang, 1990; Rodolakis y cols., 2007).

Por último, estudios realizados en el ganado caprino muestran una predisposición, al igual que ocurre en el ganado vacuno, hacia la cronificación de la infección (Lang, 1990; Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007). Esto hace pensar que esta especie pueda considerarse también una fuente importante de infección para las poblaciones humanas.

2.6.1.2. MASCOTAS: PERROS Y GATOS

Se ha demostrado que los perros y los gatos pueden ser reservorios de *C. burnetii*. Además, se ha podido apreciar que, en las perras infectadas y preñadas puede producirse la muerte prematura de los cachorros (Buhariwalla y cols., 1996). También se ha demostrado que esta especie puede transmitir la enfermedad al hombre (Marrie y cols., 1985; Rauch y cols., 1987; Laughlin y cols., 1991; Buhariwalla y cols., 1996), y se han realizado aislamientos a partir de muestras de útero de perros en Canadá (Maurin y Raoult, 1999).

En Nueva Escocia (Canadá) se ha observado la presencia de casos de fiebre Q humana relacionados con el contacto con gatas parturientas (Kosatsky, 1984; Marrie y cols., 1985; Langley y cols., 1988; Marrie y cols., 1988). En los citados estudios se ha observado que todas las personas infectadas manipularon a gatas parturientas o a sus crías, siendo demostrada la presencia de anticuerpos específicos contra la fiebre Q en el suero de las gatas afectadas.

2.6.1.3. OTROS ANIMALES

La infección por *C. burnetii* ha sido descrita de manera menos frecuente en numerosas especies de mamíferos tanto salvajes como domésticos, entre los que se incluyen caballos, conejos, cerdos, camellos, búfalos de agua, focas, ratas y ratones (Babudieri, 1959; Lapointe y cols., 1999; Schelling y cols., 2003; Barandika y cols., 2007; Perugini y cols., 2009).

Un estudio realizado en ratas del Reino Unido demostró la existencia de anticuerpos específicos anti-fase II de *C. burnetii*, con seroprevalencias que oscilaban entre el 7 y el 53% de las poblaciones estudiadas (Webster y cols., 1995). Los autores de este estudio hipotetizaron sobre si las ratas podrían ser un importante reservorio de *C. burnetii* para los animales domésticos, sobre todo para los gatos,

importantes predadores de estos roedores.

Diferentes especies de aves pueden ser infectadas por *C. burnetii*, aislándose en palomas, gallinas, patos, gansos y pavos (Babudieri, 1959; To y cols., 1998).

Finalmente, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos frente a *C. burnetii* en serpientes y tortugas de la India, no habiéndose podido realizar aislamientos a partir de muestras extraídas de estos animales (Babudieri, 1959).

2.6.1.4. GARRAPATAS

Los animales infectados por *C. burnetii* suelen tener una fase bacteriémica y se piensa que las garrapatas pueden adquirir esta bacteria al alimentarse de la sangre de animales infectados en esta fase. Se ha demostrado que más de 40 especies de garrapatas actúan como reservorios naturales de la enfermedad, entre las que se incluyen *Rhipicephalus sanguineus* aislada de perros (Mantovani y Benazzi, 1953), *Haemaphysalis humerosa* recuperada del bandicut, marsupial típico de Australia (Smith y Derrick, 1940), *Amblyomma triguttatum* encontrada en canguros (Pope y cols., 1960), y múltiples especies que fueron recogidas de diferentes regiones de Estados Unidos entre las que se encuentran: *Dermacentor occidentalis*, *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis leporis-palustris*, *Ixodes dentatus* y *Otobius magnini* (Cox, 1938; Davis, 1939; Cox, 1940).

Se ha logrado reproducir experimentalmente la transmisión de *C. burnetii* a cobayas libres de infección utilizando garrapatas portadoras de este agente tales como *Ixodes holocyclus*, *Haemaphysalis bispinosa* y *Rhipicephalus sanguineus* (Smith, 1940; Smith, 1941; Peter y cols., 1987). También se ha realizado un ensayo experimental de transmisión utilizando *Dermacentor andersoni* portadores de *C. burnetii* (Parker y Davis, 1938).

Se ha demostrado que *C. burnetii* se multiplica en el interior de las células del estómago y del intestino medio de las garrapatas. Estos artrópodos portadores de *C. burnetii* expulsan un cantidad considerable de esta bacteria cuando defecan en la piel de los animales hospedadores que parasitan, al mismo tiempo que se están alimentando. Por otra parte, se ha demostrado que la infección de los ovarios de las garrapatas posibilita la transmisión vertical de la infección, asegurando la permanencia del agente causal en las poblaciones de garrapatas en las diferentes regiones (Babudieri, 1959; Daïter y Gromova, 1970). Además, se ha podido

constatar que en estos artrópodos, al igual que en los mamíferos, se aísla la fase I de *C. burnetii* y ésta tiene una gran capacidad infectante.

Las garrapatas no se consideran necesarias para cerrar el ciclo evolutivo de *C. burnetii* en las poblaciones de animales de granja, puesto que este agente cuenta con múltiples estrategias para propagarse entre estos animales que están en contacto, sin necesidad de precisar la acción de estos artrópodos (Babudieri, 1959). Sin embargo, las garrapatas pueden jugar un importante papel en la diseminación y mantenimiento en el medio del agente causal de la fiebre Q, pudiendo actuar sobre animales de vida libre tales como roedores, lagomorfos y aves salvajes (Babudieri, 1959; Marrie y cols., 1986; Lang, 1990).

Por otra parte, en contraposición con las enfermedades provocadas por rickettsias, no es común la transmisión de fiebre Q mediante la exposición a garrapatas en la especie humana, aunque ésta ha sido descrita de manera ocasional (Eklund y cols., 1947).

2.6.2. FACTORES DEL HOSPEDADOR

2.6.2.1. FACTORES DEL HOSPEDADOR EN LAS POBLACIONES HUMANAS

En cuanto a los factores de riesgo de la fiebre Q crónica ligados al hospedador, cabe señalar la existencia de valvulopatía previa (Derrick, 1937; Raoult, 1990; Raoult y Marrie, 1995; Maurin y Raoult, 1999), de inmunodeficiencia (Raoult y cols., 1992) y el embarazo (Raoult y Stein, 1994).

En un estudio serológico se pudo observar que la seroprevalencia de los enfermos infectados con el virus VIH era tres veces mayor a la detectada en el resto de muestras que provenían de donantes de sangre, sugiriendo este hallazgo que podía existir una mayor susceptibilidad o una mayor exposición por parte de esta población a la infección por *C. burnetii*. Asimismo, el hecho de que los individuos que componían este grupo de riesgo fueran mayoritariamente personas drogadictas hacía pensar en la transmisión a través de la sangre (Raoult y cols., 1993).

El sexo y la edad han sido estudiados extensamente en las poblaciones humanas como factores de riesgo de fiebre Q ligados al hospedador. La información que existe al respecto se ha visto que varía de unas regiones a otras y parece

depender de la especie animal que se comporte como reservorio principal de la enfermedad en la región estudiada y, por otra parte, de la capacidad de poder contactar con los animales infectados, con sus producciones o con fómites contaminados con las excreciones de dichos animales (Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005; Tissot-Dupont y Raoult, 2008).

En regiones donde la exposición al ganado se considera como el principal factor de riesgo, como es el caso de la mayoría de los países europeos, California (EEUU) y Australia (Spelman, 1982; Montejo Baranda, 1985; Téllez y cols., 1985; Sanzo y cols., 1993; Thomas y cols., 1995; Davies y cols., 1997; Garner y cols., 1997), la enfermedad afecta de manera más frecuente a individuos con edades comprendidas entre los 30 y 60 años, siendo más frecuente en hombres que en mujeres. Esto contrasta con lo observado en estudios como los realizados en Nueva Escocia (Canadá), en el que el reservorio animal principal consistía en gatas parturientas infectadas con *C. burnetii*, donde el ratio de sexos fue 1:1 (Marrie y Pollak, 1995). O como en el caso de los estudios llevados a cabo en Egipto y Sudán (Taylor y cols., 1959), en Israel (concretamente en la población beduína) (Gross y cols., 1983) o en Lanzarote (Pascual, 1994), en los que el principal reservorio animal sigue siendo el ganado, pero en este caso, el ratio de sexos se invierte hacia las mujeres. La explicación de la inversión del ratio de sexos en dichos estudios estriba en la mayor participación, por parte de las mujeres de estas regiones, en las labores ganaderas.

Luego, el ratio de sexos no refleja de una manera precisa el riesgo de infección en las poblaciones humanas. En otro estudio realizado en Francia, se observó que de los enfermos de fiebre Q diagnosticados ingresados hospitalariamente en el país, la infección fue diagnosticada con más frecuencia en hombres que en mujeres (ratio de sexos= 2,5:1). Sin embargo, de sueros analizados a partir de donantes de sangre del mismo país se halló un ratio de sexos 1:1. Esta información sugiere que aunque el hombre y la mujer pueden tener el mismo riesgo de cara a infectarse, es probable que los signos clínicos de la fiebre Q sean más severos en el hombre (Tissot-Dupont y cols., 1992).

De hecho, en un modelo experimental llevado a cabo con ratones se observó que tras ser infectados con *C. burnetii*, las hembras mostraban una menor formación de granulomas en el bazo e hígado que los machos. El mismo resultado se obtuvo con hembras ovariectomizadas y tratadas con estradiol- β_{17} , mientras que las hembras ovariectomizadas mostraron una mayor formación de granulomas en bazo e

hígado, mostrando un cuadro similar al detectado en los machos. Por tanto, estos resultados sugieren que existe una predisposición por parte de los machos a sufrir un cuadro más severo de fiebre Q y que, dicho fenómeno, está influido por las hormonas sexuales, concretamente, por la presencia del estradiol- β_{17} (Leone y cols., 2004).

En función de estos resultados, cabe pensar que la gestación pueda ser otro factor predisponente al padecimiento de la enfermedad, al igual que se ha podido apreciar en distintos estudios observacionales realizados en rumiantes domésticos (Berri y cols., 2001; Berri y cols., 2007; Kennerman y cols., 2010). Por lo que diversos autores como medida de prevención de la Fiebre Q crónica, sugieren la necesidad de chequear la presencia de la fiebre Q entre las mujeres embarazadas en las zonas donde la fiebre Q es endémica (Tissot-Dupont y Raoult, 2008; Vaidya y cols., 2008).

Helbig y colaboradores (2005) llegaron a la conclusión de que ciertas diferencias genóticas hacen que determinados individuos sean más propensos a sufrir la fiebre Q crónica y, que dentro de este grupo de individuos, se presentan a su vez, diferencias en el genotipo que hacen que sean más propensos a la endocarditis o bien, que lo sean a mostrar el síndrome de la fatiga crónica. En lo que respecta a la fiebre Q aguda, no parece ser que haya diferencias genóticas significativas que argumenten que determinado tipo de individuos de entre la población general muestren mayor propensión a padecerla.

En esta línea, Anderson y colaboradores (2009) encontraron que la seroprevalencia en un estudio en EEUU fue mayor en los hombres que en las mujeres. Sin embargo, lo que llamó la atención fueron las diferencias observadas entre los diferentes grupos raciales estudiados, siendo los americanos de origen mexicano los que presentaban una mayor prevalencia con respecto a los blancos y los negros de origen no hispano. Además, se pudo apreciar que la seroprevalencia se incrementaba con la edad, lo que puede deberse a un efecto acumulativo, ya que la inmunidad frente a la enfermedad en humanos dura toda la vida (Pascual, 1994), observándose también, que la enfermedad se daba con más frecuencia en personas que habían nacido fuera del país y en personas que vivían bajo el umbral de la pobreza (Anderson y cols., 2009).

Con respecto a la influencia de la edad en la presentación de la fiebre Q en la especie humana, se pudo observar que los cuadros neumónicos de fiebre Q eran más frecuentes en las personas mayores e inmunodeprimidas, mientras que la presencia

de un cuadro hepático era más frecuente en los individuos jóvenes (Raoult y cols., 2000). En otro trabajo se llegó a la conclusión de que en determinados signos de la enfermedad tanto aguda como crónica se apreciaban ciertas alteraciones en su presentación y gravedad cuando se comparaban al grupo de niños con el de adultos (Terheggen y Leggat, 2007).

2.6.2.2. FACTORES DEL HOSPEDADOR EN LAS POBLACIONES ANIMALES

La enfermedad en los animales suele cursar de manera asintomática y tiende a cronificarse, convirtiendo a los animales infectados, en portadores excretores inaparentes de *C. burnetii*, siendo la manifestación clínica más evidente en este caso, la aparición de problemas reproductivos en forma de abortos, problemas de fertilidad, nacimientos prematuros e incremento de la mortalidad perinatal. Precisamente, un factor a tener en cuenta de los hospedadores animales son las diferencias observadas entre especies en cuanto a la evolución de la enfermedad (Berri y cols., 2001; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005; Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007; Kennerman y cols., 2010).

Así, por ejemplo, si bien es verdad que la enfermedad en los rumiantes domésticos suele ser inaparente clínicamente, se ha asociado a esta enfermedad con abortos, principalmente presentes en los ganados caprino y ovino (Waldhalm y cols., 1978; Palmer y Young, 1982; Berri y cols., 2007; Masala y cols., 2007) y con bajo peso al nacimiento e infertilidad en el ganado vacuno, si bien, ocasionalmente, también se producen abortos en esta especie (Schmeer y cols., 1987; van Moll y cols., 1993; Ho y cols., 1995; Cabassi y cols., 2006). De hecho, en el año 2006, Parisi y colaboradores realizando un estudio epidemiológico en ganado bovino, ovino y caprino reafirman que los abortos por fiebre Q se manifiestan de manera más frecuente en los ganados ovino y caprino que en el ganado vacuno.

Masala y colaboradores (2007), diagnosticando la presencia de *C. burnetii* en sueros (mediante ELISA) y abortos o placentas (PCR) de granjas de pequeños rumiantes llegaron a la conclusión de que, a pesar de que la enfermedad está ampliamente extendida en los ganados ovino (38%) y caprino (47%) en Cerdeña, lo cierto es que el rol que desempeñaba como agente causal de abortos era relativamente bajo, un 10 % de abortos por fiebre Q en ovejas, siendo especialmente bajo en el caso del ganado caprino (6%). Berri y colaboradores (2007) en una explotación caprina en la que se detectó un brote de abortos y a la que se hizo un

seguimiento durante el transcurso de dos parideras consecutivas, detectaron en la primera paridera que un 30% de los animales tenían problemas reproductivos (7% de abortos y 23% de nacimientos prematuros). Los resultados mejoraron considerablemente en la segunda paridera, presentando un 1,7 % de abortos y 6,7% de nacimientos prematuros. Si se presta atención al número de nacimientos prematuros en ambas parideras, se puede ver que es muy superior al número de abortos. Estos nacimientos prematuros provocaron una mortalidad en los neonatos antes de las 48 horas de vida del 25 % en la primera paridera y del 5% en la segunda.

Por tanto, la conjunción de los resultados de ambos estudios (Masala y cols., 2007; Berri y cols., 2007) dan motivos para pensar que la influencia de la fiebre Q en los índices reproductivos varía entre los ganados ovino y caprino, de tal manera que, en el ganado ovino, cobran más importancia los abortos que en el ganado caprino, siendo de mayor importancia las pérdidas económicas originadas por los nacimientos prematuros, en el caso de las cabras. Por tanto, tenemos tres comportamientos diferentes con respecto a la enfermedad por parte de los ganados vacuno, caprino y ovino, en el que el ganado caprino es como si se situara en un comportamiento de la presentación de la enfermedad intermedio con respecto a las otras dos especies.

De hecho, esto último queda patente en un estudio que se diseñó con el fin de ver las diferencias existentes entre los ganados bovino, caprino y ovino en los patrones de excreción de *C. burnetii* al medio (Rodolakis y cols. 2007). En dicho estudio se pudo apreciar que las vacas se mostraban asintomáticas y eliminaban la bacteria casi exclusivamente por la leche, no se observaron abortos, pero sí problemas de metritis y de fertilidad. En el caso de las cabras, el patrón de excreción de la bacteria era mayoritariamente por la leche registrándose abortos (3,2%) y una gran cantidad de neonatos inviables vinculados a fiebre Q sólo en una granja. Las granjas de ovejas estudiadas presentaban tasas de abortos relacionados con la fiebre Q que fueron desde valores menores al 5%, al 10% y 25%. La excreción de *C. burnetii* al medio en el caso de las ovejas era mayoritariamente a través del flujo vaginal y en las heces.

Ya se comentó en capítulos anteriores el tropismo de *C. burnetii* por el aparato reproductivo (Biberstein y cols., 1974; Baumgartner y Bachmann, 1992; Rose y cols., 1994; Maurin y Raoult, 1999; Sehadri y cols., 2003). Las diferencias anatómicas existentes entre la placenta de la vaca y la de los pequeños rumiantes, podría explicar la menor invasión de la placenta bovina por parte de *C. burnetii*, ya que esta

placenta tiene un grado de implantación menor que dificultaría el paso de la bacteria a los tejidos de la misma. De ahí, que las lesiones en este tipo de placentas sean menos frecuentes y presenten contaminaciones por *C. burnetii* sensiblemente inferiores a las encontradas para los pequeños rumiantes, siendo más frecuente en la vaca la infertilidad y la reducción del peso de los neonatos provocada, probablemente, por las metritis causadas por *C. burnetii* en este tipo de animales (van Moll y cols., 1993; Masala y cols., 2007).

En el caso de los pequeños rumiantes, se ha demostrado que el grado de infección por *C. burnetii* de las placenta es significativamente mayor que en el caso de la vaca, lo que podría explicarse por el mayor grado de implantación de las placentas en la oveja y en la cabra, que a su vez, facilitaría el paso de la bacteria a la placenta. Ya se ha visto que la lesión causada por *C. burnetii* en las placentas con un grado considerable de infección es la placentitis hipertrófica necrotizante. Lógicamente, este cuadro compromete la correcta nutrición fetal. Sin embargo, el grado de infección del feto es menor y es menos frecuente la infección fetal que la placentaria (Masala y cols., 2007). Por lo que parece ser que la infección placentaria severa es la causa necesaria para el aborto por fiebre Q en rumiantes, más que las lesiones provocadas en el feto por *C. burnetii*. Esto podría explicar el porqué de la mayor frecuencia de abortos por fiebre Q encontrada en pequeños rumiantes.

La incógnita de porqué son más frecuentes los abortos por fiebre Q en la oveja que en la cabra y, el porqué se presentan de manera más frecuente en la cabra los nacimientos prematuros que los abortos, podría tener una explicación en las diferencias endocrinológicas de la gestación existentes entre estas especies. En el caso de la oveja, la progesterona, durante la gestación es producida por la placenta. Luego, si además de una placentitis severa, añadimos el hecho de que *C. burnetii* es un microorganismo que presenta las rutas metabólicas precisas para poder metabolizar moléculas precursoras de la progesterona, los niveles de esta hormona en sangre disminuirían, aumentando el papel del estrógeno sanguíneo. Esta situación unida a un incremento del sufrimiento fetal, actuaría como acelerador del proceso abortivo en las ovejas. Sin embargo, en la cabra, la progesterona es producida por el cuerpo lúteo, con lo cual, la placentitis afectaría en menor medida al órgano productor de esta hormona durante la preñez. Esto alargaría el proceso abortivo, que dependería mucho más del sufrimiento fetal que de los niveles de progesterona en sangre (van Aarle y cols., 1996). En la cabra solo abortarían los animales infectados de forma tan severa que la placentitis pusiera en compromiso la vida fetal.

Por otra parte, Ruiz-Fons y cols. (2008), en otro trabajo en el que se comparan poblaciones de ciervos ibéricos salvajes que se crían en libertad con poblaciones de estos mismos animales criadas en granjas, pertenecientes ambas poblaciones a la misma región (Cádiz), se pudo observar que la seroprevalencia frente a *Coxiella burnetii* fue mayor para los animales criados en cautividad que para los criados en libertad. A su vez se comparó con otra región, Asturias, obteniéndose que la seroprevalencia de los ciervos ibéricos criados en libertad fue mayor en Asturias que en Andalucía. Pero al estudiar poblaciones de corzo europeo criado en libertad se dio la situación contraria, las poblaciones de Andalucía mostraron mayores seroprevalencias que las de Asturias.

Lógicamente, cuando se pasa de un sistema extensivo a intensivo, se espera un aumento de la tasa de contacto entre los animales enfermos y los animales sanos, susceptibles de ser infectados, que contribuya a aumentar las prevalencias en las poblaciones afectadas (Yorke y cols., 1979). Pero esto, que ha sido un factor de riesgo ambiental y de manejo estudiado para la fiebre Q en algunos trabajos (Tarasevich, 1987; Capuano y cols., 2001; Martinov, 2007; Kennerman y cols., 2010), ha resultado ser especialmente importante cuando se importa ganado libre de la enfermedad en zonas endémicas o, cuando se dan contactos ocasionales entre rebaños afectados y rebaños libres de la enfermedad. Pero además de los factores ambientales, resulta de interés el estudio de determinados factores del hospedador que, en muchas ocasiones, se entremezclan y se confunden entre sí con factores de tipo ambiental.

En cuanto a la relación entre la genética del hospedador y el padecimiento de la fiebre Q, es probable que diferencias genéticas y fenotípicas que afecten al desarrollo de la infección por *C. burnetii* puedan existir también entre especies animales (de ahí las diferencias de presentación de la enfermedad en las diferentes especies de ungulados domésticos), e incluso, entre razas de una misma especie y entre individuos de una misma raza como se ha podido apreciar para otro tipo de patologías infecciosas (Carter y cols., 1976; Engeland y cols., 1997a y b).

En cuanto a la influencia de la edad de los portadores en el padecimiento de la enfermedad, en Turquía se realizó un estudio seroepidemiológico en el ganado ovino de la región meridional de Mármara (Kennerman y cols., 2010). Se pudo observar como las ovejas primíparas presentaron mayores tasas de anticuerpos frente a la enfermedad que las machorras de menos de 10 meses de edad y que las ovejas de dos partos. De este estudio se desprende que la edad de mayor riesgo se

corresponde con el primer parto.

Otro hallazgo curioso relacionado con la influencia de la edad en la presentación de la fiebre Q fue observado en un modelo experimental en el que se utilizaron ratones con el fin de comparar el grado de respuesta inmune en función de la edad. El número de granulomas en el bazo y la carga bacteriana de los mismos fue mayor en los ratones de 14 meses que los ratones de 1 mes (Leone y cols., 2004).

2.6.3. INMUNIDAD DE LAS POBLACIONES

2.6.3.1. INMUNIDAD DE LAS POBLACIONES HUMANAS

Hay autores que proponen que determinados aislamientos de *C. burnetii* podrían tener diferentes grados de virulencia que se traduciría en la mayor capacidad de determinados genotipos para producir cuadros crónicos de la fiebre Q en el hombre y, en el caso de la enfermedad aguda, producir diferentes tipos de cuadros, bien sean hepáticos o pulmonares, de tal manera que, la existencia de este tipo de aislamientos en determinadas localizaciones geográficas podría explicar, en parte, las diferencias observadas en cuanto a la presentación de la fiebre Q en diferentes regiones del mundo (Glazunova y cols., 2005; Stein y cols., 2005; Beare y cols., 2006; Russell-Lodrigue y cols., 2009).

En el caso de las poblaciones humanas se ha podido apreciar que las posibilidades de contagio son principalmente, el contacto directo con animales infectados o indirecto mediante productos de estos animales, siendo muy improbable, el contagio directo entre humanos o bien, el contagio por garrapatas infectadas (Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri, 2005). Los hábitos de higiene y salud existentes en las poblaciones humanas parece ser que son suficientes para evitar el contagio directo entre humanos (al menos, en los países desarrollados donde se ha estudiado la transmisión de esta enfermedad). De ahí que la fiebre Q esté considerada como una enfermedad profesional en aquellos colectivos de trabajadores relacionados con la producción animal, la elaboración de productos derivados de dichas producciones, la investigación, el trabajo en laboratorios de diagnóstico y hospitales, la limpieza pública y el ejército (Maurin y Raoult, 1999; Abe y cols., 2001; Arricau-Bouveri y Rodalakis, 2005; Miceli y cols., 2009; Whitney y cols., 2009; Chang y cols., 2010). De hecho, se han registrado numerosos brotes epidémicos de esta enfermedad en diferentes regiones del mundo que han partido de estos colectivos, y es por ello que, las autoridades sanitarias de diversos países en

los que la fiebre Q tiene una repercusión socioeconómica considerable, han apostado por la inmunización activa de determinados colectivos profesionales de riesgo mediante planes vacunales contra la enfermedad (Garner y cols., 1997; Kermode y cols., 2003; Gidding y cols., 2009).

Por otro lado, la fuente de infección en la mayoría del resto de los brotes epidémicos sucedidos en las poblaciones humanas está asociada a la proximidad de animales infectados, a la proximidad de núcleos ganaderos, a la contaminación ambiental ejercida por ganados de diferentes especies de ungulados domésticos, a la proximidad de los núcleos de población con industrias relacionadas con la elaboración de productos derivados de la producción animal (mataderos e industrias cárnicas, industrias peleteras y textiles, etc...) y a actividades ganaderas como la transhumancia y el transporte de animales (Dupuis y cols., 1987; Fan y cols., 1987; Carrieri y cols., 2002; Delsing y Kullberg, 2008).

Con carácter general, las seroprevalencias detectadas en zonas rurales suelen ser mayores que las detectadas en las zonas urbanas (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Si bien, existen zonas en las que la densidad poblacional humana y animal son elevadas en un territorio limitado, de escaso relieve y con una importante acción de los vientos, donde la diferenciación entre zonas rurales y zonas urbanas no es tan patente, aunque las seroprevalencias detectadas en las zonas rurales siguen siendo superiores (Pascual, 1994).

En cuanto a las poblaciones de riesgo, diferentes estudios seroprevalenciales realizados al respecto en diferentes regiones han mostrado diferencias significativas con respecto a la población general. Pascual (1994), en su estudio de Lanzarote, observó en un grupo de riesgo compuesto por pastores, veterinarios y trabajadores de matadero, una seroprevalencia del 58.3%, siendo el colectivo de pastores el mayor seropositividad (casi el 61%), no existiendo diferencias significativas entre sexos y presentándose la enfermedad con más frecuencia, en este colectivo, entre los 19 y 45 años de edad.

En cuanto a la relación existente entre la inmunidad poblacional y la edad, se ha observado un incremento de la seroprevalencia con la edad (Dupont y cols., 1971; Cowley y cols., 1992; Pascual, 1994). Esto es consecuencia de la exposición acumulativa, ya que se estima que la duración de los anticuerpos frente a *C. burnetii* podrían abarcar toda la vida.

En general, en el caso de los citados colectivos de riesgo profesional se puede apreciar, un mayor grado de inmunidad adquirida por una mayor frecuencia de contacto efectivo con el agente causal de la enfermedad. Por tanto, es de esperar que en los brotes epidémicos en los que se vean afectados individuos englobados en estos colectivos profesionales sean otros factores los que cobren una importancia relativa mayor que la necesaria para causar la enfermedad en la población general urbana, ya que la probabilidad de encontrar individuos receptibles en estos colectivos es sensiblemente menor. Por el contrario, la probabilidad de que un individuo perteneciente a la población general humana contraiga la enfermedad tras un contacto efectivo con el agente causal será significativamente mayor que la de un ganadero de una zona en la que la fiebre Q sea endémica (Maurin y Raoult, 1999; Abe y cols., 2001; Arricau-Bouveri, 2005; Miceli y cols., 2009; Whitney y cols., 2009; Chang y cols., 2010).

Esta situación explicaría la aparición de brotes de fiebre Q en áreas urbanas en grupos de individuos que han tenido un contacto ocasional con animales infectados o bien, con zonas contaminadas con secreciones de animales infectados, que previamente pasaron por el lugar. Un ejemplo de esto sería un brote epidémico registrado en nuestro país en el que un grupo de personas que vivían en un ambiente urbano contrajeron la enfermedad tras una visita ocasional a una granja escuela en la que había animales infectados (Escudero Nieto y cols., 2006). Tras realizar un estudio de cohortes retrospectivo en el que se compararon las frecuencias de fiebre Q aguda de los usuarios con la de los trabajadores de la granja-escuela (25 y 30 individuos respectivamente), se observó que el riesgo de infección aguda era 8.5 veces superior en el caso de los usuarios (provenientes de la población urbana).

En cuanto a la inmunidad de poblaciones de zonas rurales, su comportamiento sería intermedio entre los profesionales de riesgo y las poblaciones urbanas. Sin embargo, aunque la probabilidad de contacto efectivo es inferior a la de los profesionales de riesgo, éstos los superan en número. De hecho, en un estudio observacional transversal retrospectivo en el que se revisaron 40 casos clínicos de fiebre Q aguda en el sureste de Gran Canaria (Canarias) entre los años 1998 y 2000 (Bolaños y cols., 2003), se observó que la mayor parte de los casos provenían de poblaciones rurales (67.5%). En otra revisión de casos realizada por Pascual en la isla de Lanzarote (Canarias) en el año 1992, la incidencia anual de casos clínicos de fiebre Q aguda fue de 12 casos por 100.000 habitantes, diagnosticándose la mayoría de casos en residentes de áreas rurales, si bien, también se diagnosticaron casos de enfermedad en áreas urbanas, relacionados todos con posibles contactos con

animales infectados o con zonas de pasto probablemente contaminadas con *C. burnetii* (Pascual, 1994). En los ocho años que incluía esta revisión, no se diagnosticó ni un solo caso entre los ganaderos de caprino de la isla. Por otra parte, son numerosos los brotes epidémicos en las poblaciones rurales descritos en la bibliografía en otros países (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005) y la información disponible hasta ahora sobre los brotes de fiebre Q nos hablan de que la mayoría de casos provienen de las áreas rurales.

Por tanto, los datos citados en el presente apartado en cuanto a la inmunidad de poblaciones unido al importante éxodo rural registrado en los países desarrollados e industrializados (principalmente durante el último siglo), el aumento de las comunicaciones y del transporte de personas y mercancías, el cambio climático y las nuevas tendencias en cuanto al ocio y, más concretamente, en cuanto al turismo (turismo rural, de disfrute de la naturaleza y deportivo), implican un aumento de la probabilidad de contacto efectivo con el agente causal de la fiebre Q por parte de individuos provenientes de poblaciones con bajos niveles de inmunidad poblacional, con lo cual, son cada vez más los expertos que tratan a la fiebre Q como una más de las muchas enfermedades emergentes (Hellebrand y cols., 2001; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

2.6.3.2. INMUNIDAD DE LAS POBLACIONES ANIMALES

Como se ha podido apreciar anteriormente, la fiebre Q afecta a un amplio rango de especies del reino animal, siendo el principal reservorio de la enfermedad las poblaciones de ungulados domésticos. Pero esta enfermedad también se ha detectado en poblaciones salvajes de mamíferos y aves y, en otros animales domésticos (perros y gatos). Lógicamente, la inmunidad de estas poblaciones muestra diferencias debidas a múltiples factores que han sido detectados en diversos estudios seroprevalenciales (Maurin y Raoult, 1999).

Comenzando por el ciclo silvestre de la fiebre Q, ya se pudo apreciar en el apartado de factores del hospedador como en el estudio de Ruíz-Fons y colaboradores (2008) se detectaban diferencias en la inmunidad de las poblaciones en función de la especie de ungulado silvestre y del medio en el que habitaban. Una observación curiosa fue que se detectó que las poblaciones de ciervos rojos estabuladas presentaban mayores seroprevalencias que las poblaciones silvestres. Un comportamiento similar es el que se ha observado cuando se ha producido un cambio importante en cuanto al manejo de los rumiantes domésticos de una región

determinada, como fue el caso de la intensificación de las producciones de estos animales en la antigua U.R.S.S. (Tarasevich, 1987). Por otra parte, Kennerman y colaboradores (2010) observaron una diferencia estadísticamente significativa entre la seroprevalencia de las granjas de mayor tamaño con respecto a las de mediano y menor tamaño (en cuanto al número de animales se refiere). Estos trabajos apuntan en la dirección de que la densidad poblacional animal puede comportarse como un factor de riesgo de la enfermedad y esto estaría de acuerdo con las observaciones de los trabajos de Yorke y colaboradores (1979) y tendría su principal explicación en un aumento de la tasa de contacto en las poblaciones. Este comportamiento presenta similitudes con las diferencias observadas entre las poblaciones humanas urbana, rural y de riesgo profesional tratadas en el apartado anterior.

Sin embargo, Martinov (2007) realiza un estudio retrospectivo en el que compara la seroprevalencia observada en los rumiantes domésticos de Bulgaria (ganados caprino, ovino y vacuno) desde los años 50 hasta el año 2006, dividiendo el estudio en tres periodos con diferentes características. En el primer periodo las ganaderías eran de tipo extensivo, en el segundo periodo se llevó a cabo un manejo intensivo industrial (número menor de explotaciones con un número mayor de animales por explotación) y terminó con un último periodo caracterizado por un sistema intensivo descentralizado con explotaciones con un número de animales muy inferior al del periodo anterior. En este estudio se pudo observar cómo en la transición entre el primer y segundo periodo, las seroprevalencias disminuyeron en los ganados caprino y bovino de una manera considerable, no siguiendo el mismo comportamiento el ganado ovino, que se vio incrementada. Parece ser que la intensificación de las producciones afectaría en menor medida a los ganados bovino y caprino que al ganado ovino, en lo que a la presencia de fiebre Q se refiere.

Curiosamente, en otro estudio sobre diferencias entre manejo intensivo y extensivo, la seroprevalencia global fue del 14.4%, mientras que por tipo de manejo, las seroprevalencias mayores correspondieron a las vacas que estabulaban en invierno y pastaban en primavera (19.6%), mientras que las estabuladas permanentemente tenían una seroprevalencia del 13.2% y las criadas en extensivo mostraban una seroprevalencia del 1.9%. La mayor seroprevalencia observada en los ganados que estabulan solo en invierno podría ser debida a una mayor probabilidad de infectarse con nuevas cepas provenientes de otros animales que pastaran en los mismos pastizales o de garrapatas. (Capuano y cols., 2001).

Otro factor a tener en cuenta en la inmunidad de las poblaciones animales es

la presencia de agentes inmunosupresores en el medio donde se desarrollan estas poblaciones. Ya se ha visto que estudios de experimentación animal muestran la mayor susceptibilidad frente a la fiebre Q en animales inmunodeprimidos (Raoult y cols., 1992; Raoult y cols., 1993; Read y cols., 2010).

Parece lógico pensar que las poblaciones de mascotas con más probabilidad de contacto con los principales reservorios de la enfermedad, es decir, los perros y gatos que habitan en las ganaderías de rumiantes, presenten una mayor inmunidad poblacional ante la fiebre Q. Sin embargo, en un trabajo realizado en Eslovenia, la población canina que mostró la mayor seroprevalencia detectada entre diversos tipos de poblaciones caninas fue la de animales abandonados, por delante de las poblaciones de perros relacionados con el ganado (Kocianová y cols., 1993).

Al igual que ocurría con las poblaciones humanas, es muy probable que las poblaciones de estos animales en las zonas urbanas cuenten con un grado de inmunidad menor que las poblaciones existentes en áreas rurales o las que habitan en las ganaderías. Esto hace que los animales provenientes de las zonas urbanas tengan una mayor probabilidad de contraer la enfermedad si son desplazados a las zonas rurales y de transmitirla a las poblaciones humanas urbanas, las cuales, a su vez, serían más susceptibles (Marrie y cols., 1985; Rauch y cols., 1987; Laughlin y cols., 1991; Buhariwalla y cols., 1996).

2.6.4. FACTORES ASOCIADOS AL AGENTE CAUSAL (*Coxiella burnetii*)

C. burnetii es un microorganismo que se sitúa evolutivamente en el subgrupo gamma de las proteobacterias, mostrando importantes analogías con el orden *Legionellales*, y dentro de este orden, cuenta con una estrecha relación con *Legionella pneumophila* (patógeno facultativo e intracelular humano) y con *Rickettsiella grylli* (patógeno intracelular del saltamontes y de artrópodos).

En cualquier caso, estas relaciones filogenéticas nos hablan de que *C. burnetii* está emparentada con microorganismos cuya estrategia principal de expansión se basa en su alta ubicuidad y tasa de presencia en el medio externo, entre los que hay endosimbiontes de diversos artrópodos (muchos de los cuales se transmiten vía transovárica en estos invertebrados, al igual que ocurre con *Coxiella*), así como patógenos facultativos de diversas especies animales (entre ellas, diversas especies de invertebrados y mamíferos, entre las que se incluye el hombre). Su filogenia explica sus principales características de una manera más acorde a la realidad que la

anterior taxonomía, que la relacionaba con el orden *Rickettsiales* (Weisburg y cols., 1989; Roux y cols., 1997; Seshadri y cols., 2003; Zamboni y cols., 2003; Zusman y cols., 2003; Bandyopadhyay y cols., 2004; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

Como se ha mencionado, una de las principales características de *C. burnetii* es su gran ubicuidad en el medio. Esta característica se ve favorecida, sin duda, por su capacidad de formar las ya citadas formas de resistencia (McCaul y cols., 1981; Amano y cols., 1984; La Scola y Raoult, 2001), cuya gran persistencia en el medio fue estudiada por Babudieri (1959).

Otra característica de *C. burnetii* que llama la atención son las diferencias observadas en la virulencia entre las cepas obtenidas a partir de distintos aislamientos de diferentes orígenes. Así, en Eslovaquia y en la República Checa, se han realizado aislamientos de cepas autóctonas de *C. burnetii* presentes en diversos rebaños bovinos y en diversos focos naturales de infección en estos países. El carácter subclínico de la fiebre Q en el ganado bovino en estas regiones, asociada teóricamente a estos tipos de aislamientos circulantes en las mencionadas regiones, se estimó que podía deberse a la baja virulencia de estas cepas (Literák y Calvo Rodríguez, 1994; Literák y Kroupa, 1998).

Con el fin de testar la virulencia de las cepas de *C. burnetii* circulantes en estas regiones, Kocianová y colaboradores (1993) realizaron un estudio experimental basado en la inoculación de dos cepas (aisladas a partir de leche de ganado bovino) en ovejas preñadas. Los resultados obtenidos demostraban una baja virulencia, ya que ninguna de las ovejas inoculadas mostraron signos de enfermedad y parieron corderos sanos. Sin embargo, Martinov y colaboradores (1989) testaron la virulencia de otro aislamiento ovino en ovejas preñadas inoculadas vía intravascular, las cuales mostraron fiebre y todos los corderos nacieron prematuros o murieron a las 24 horas del nacimiento.

Por otra parte, en otro estudio sobre la virulencia del aislamiento Priscilla de *C. burnetii* (obtenido a partir de una cabra abortada y relacionado con casos de fiebre Q crónica en la especie humana) a partir de la inoculación experimental con cobayas, éste mostró una virulencia que no fue excesiva en comparación con los resultados obtenidos con otros aislamientos obtenidos de garrapatas (Kazár y cols., 1993). Asimismo, Kocianová y colaboradores (2001) demostraron que los aislamientos obtenidos a partir de garrapatas se mostraban más virulentos en cobayas que los aislamientos obtenidos a partir de leche de ganado bovino mencionados

anteriormente. Los autores concluyeron que las observaciones realizadas apuntaban a que en las cepas de *C. burnetii* circulantes en las poblaciones de ganado bovino aisladas del contacto con garrapatas podrían perder paulatinamente su virulencia.

Esta afirmación parece estar de acuerdo con los estudios realizados por Babudieri en 1962 en Italia, quien observó que tras la aparición de determinados brotes epidémicos de fiebre Q asociados a la importación de ganado bovino infectado en las áreas afectadas, los casos de esta enfermedad iban desapareciendo tanto de las poblaciones de estos animales, como de las humanas afectadas, varios años después de evitar el contacto del ganado con las garrapatas. Esta hipótesis fue sostenida también para explicar el receso experimentado en la década de 1950 de los casos de fiebre Q aguda en las poblaciones humanas ocurridos en Checoslovaquia (Syruczek y cols., 1958). Por otra parte, Pautov en 1973 concluyó en un estudio que los aislamientos de *C. burnetii* realizados a partir de muestras de ovejas o de vacas infectadas disminuían su virulencia significativamente cuando eran transferidos al ganado vacuno y estos se mantenían circulando en dichas poblaciones, hasta el punto de que terminaban por perder la capacidad patogénica.

También existe un estudio en el que se ha demostrado que la virulencia de *C. burnetii* disminuye cuando se realizan sucesivos pases en una misma especie de garrapata (Dařter y Gromova, 1970). Por otra parte, en un estudio de virulencia realizado sobre aislamientos obtenidos en el noroeste de Ucrania, a partir de unas muestras extraídas tras la detección de un foco de fiebre Q en poblaciones de animales silvestres de dicha región, se observó que dos aislamientos, uno realizado a partir de garrapatas y otro a partir de un campañol común (pequeño roedor), mostraron gran virulencia, siendo claramente el más virulento de los dos, el segundo, en este caso (Klimchuk y Kushnir, 1989).

Es probable que estemos viendo en la actualidad, un proceso de adaptación de un microorganismo patógeno para los mamíferos, que en el caso de las garrapatas, se comporta prácticamente como un endosimbionte. *C. burnetii*, si bien causa infección en las garrapatas, no causa una enfermedad clínica en estos artrópodos, teniendo además, la capacidad de transmitirse transováricamente a las generaciones subsiguientes de estos invertebrados (Babudieri, 1959; Dařter y Gromova, 1970). Sin embargo, *C. burnetii* sí que provoca enfermedad en los mamíferos y, en particular, en los ungulados domésticos, en las mascotas (perro y gato) y en el hombre, entre otras numerosas especies animales. Es razonable pensar que esto se debe a que el contacto de este agente causal ha sido mucho más

extendido en el tiempo y sobre todo, en número de generaciones, con las garrapatas que con los mamíferos, lo que explicaría el porqué *C. burnetii* convive perfectamente con estos artrópodos sin producirles enfermedad.

Muy al contrario, *C. burnetii* puede ser muy beneficiosa para las diferentes especies de garrapatas parásitas de estos mamíferos, ya que, como se ha podido apreciar en los párrafos anteriores, las cepas originarias de las garrapatas son las que contarían con mayor capacidad virulenta para los mamíferos (Kazár y cols., 1993; Kocianová y cols., 2001). Los animales infectados por *C. burnetii* son animales que, sobre todo en las poblaciones salvajes y en ganados en régimen extensivo, dan lugar a progenies más débiles y más susceptibles de ser parasitadas por estos artrópodos en los estadios iniciales de la vida y, a hembras más débiles en torno a la época de partos y más fáciles de parasitar.

En función de lo expuesto en el presente apartado con respecto a la presunta relación existente entre el tipo de hospedador de *C. burnetii* y la virulencia de este agente causal, parece lógico pensar que la domesticación de los citados ungulados domésticos es un fenómeno que puede haber influido en la evolución molecular de esta bacteria. De hecho, Glazunova y colaboradores (2005), en un estudio en el que se compararon los genotipos de 159 aislamientos de *C. burnetii* obtenidos de diferentes tipos de muestras de origen animal, humano y de garrapatas, provenientes de diferentes orígenes geográficos, determinaron que, el origen de *C. burnetii* podría situarse en el antiguo mundo y que, desde esta localización, la enfermedad se extendió al nuevo mundo.

Por otra parte, se han establecido cambios genéticos importantes en estas especies domésticas, con respecto a las especies salvajes originarias, con los que *C. burnetii* ha tenido que convivir y evolucionar, y que probablemente han tenido influencias en la evolución de la virulencia de este agente causal (Gentry y cols., 2003; Seshadri y cols., 2003). Probablemente, la mayor virulencia de *C. burnetii* encontrada en los aislamientos obtenidos a partir de garrapatas y de ciertos animales salvajes, podría estar en consonancia con un proceso evolutivo, en el cual, debido a que en el medio en el que se desarrollan los animales salvajes que actúan como hospedadores definitivos, la tasa de contacto sería teóricamente menor y la rusticidad de los animales sería mayor, lo cual, redundaría en una mayor dificultad para que las garrapatas puedan completar su ciclo y por tanto, esto sería un hándicap también para *C. burnetii* de cara a cumplir con su ciclo biológico que sería compensado, por parte de este microorganismo, con una evolución orientada a

umentar la virulencia. Asimismo, la variabilidad entre las posibles especies en este medio sería mayor, lo que daría lugar a una peor adaptación por parte de *C. burnetii* frente a su hospedador definitivo, fruto de esta mayor diversidad de especies (Klimchuk y Kushnir, 1989; Kazár y cols., 1993; Buxadé y cols., 1996; Kocianová y cols., 2001). En este contexto entrarían también las características del ciclo biológico de las distintas especies de garrapatas que pueden transmitir *C. burnetii*, ya que podemos encontrarnos con especies con uno, con dos o hasta con tres posibles hospedadores definitivos, con lo que nos encontraríamos con escenarios evolutivos para *C. burnetii* bien diferentes (Maurin y Raoult, 1999).

En el lado contrario estaría la evolución de *C. burnetii* en las poblaciones de ungulados domésticos, las cuales a su vez, estarían más relacionadas con las poblaciones humanas. En este caso tendríamos una tasa de contacto mayor que, en la mayoría de los casos, se daría entre individuos de una misma especie, o bien dos o, menos frecuentemente, tres especies de ungulados (los últimos dos supuestos se darían en el caso de rebaños mixtos). Además, estas poblaciones serían, por norma general, más productivas pero menos resistentes a enfermedades, fruto de la disminución de su rusticidad en un proceso de selección artificial orientado a una mayor productividad (Kazár y cols., 1993; Buxadé y cols., 1996). Esto se traduciría en una evolución de las cepas de *C. burnetii* circulantes en estas poblaciones orientada a adaptarse a estos hospedadores definitivos más probables. En este caso, las cepas de *C. burnetii* no tendrían la necesidad de ser tan virulentas para completar su ciclo vital, ya que, la probabilidad de extenderse la enfermedad en este escenario es considerablemente mayor. La evolución lógica de *C. burnetii* como parásito sería, en este caso, la de adaptarse al hospedador definitivo de manera que se produjera el mayor número posible de casos crónicos de enfermedad, provocando que dichos hospedadores se convertirían en portadores eliminadores crónicos del agente causal (Martin y cols., 1997).

Esta hipótesis podría explicar la disminución de virulencia que se experimenta, al cabo de cierto tiempo, cuando cepas aisladas de garrapata (más virulentas) se introducen en el ganado bovino y acaban convirtiéndose en cepas circulantes en estas poblaciones (Syruczek y cols., 1958; Babudieri, 1962). Como se ha visto, la fiebre Q tiende a cronificarse en esta especie y, por otro lado, no suele producir abortos en la vaca, siendo la principal vía de excreción la leche y las heces (Rodolakis y cols., 2007).

Como se ha apreciado anteriormente, en el caso de la cabra tendríamos una estrategia intermedia entre la oveja y la vaca. Se tendería igualmente a la

cronificación, pero además, también en esta especie, la fiebre Q produce abortos y nacimientos prematuros, con lo cual, la evolución de las cepas circulantes de *C. burnetii* en las poblaciones de ganado caprino tienen un mecanismo de dispersión adicional con respecto a las vacas (Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007). Esto podría explicar el porqué cepas aisladas a partir de muestras de abortos producidos en cabras (como es el caso del aislamiento Priscilla) muestran una virulencia intermedia cuando se inoculan a animales de experimentación entre lo que podría ser la obtenida por aislamientos como Nine Mile (obtenida a partir de garrapatas) y la obtenida a partir de aislamientos de muestras extraídas de abortos de ovejas (Kazár y cols., 1993).

En el caso del ganado ovino, la evolución lógica de *C. burnetii* debería basarse en un aumento moderado de la virulencia que permitiera una rápida transmisión durante la época de partos (el principal mecanismo de transmisión y de persistencia en el medio de *Coxiella* durante la parasitación en esta especie). Por otro lado, otro factor a tener en cuenta en este caso, es la capacidad del vellón para mantener al agente causal en el ambiente, además de que las ovejas son más gregarias que las vacas o las cabras (lo cual se traduce en una mayor tasa de contacto) (Buxadé y cols., 1996). Luego la necesidad de adaptación de *C. burnetii* al hospedador definitivo en las poblaciones de ovino domésticas, de cara a cronificar la enfermedad como estrategia de permanencia en el medio, no sería tan importante como la capacidad de infectar en un momento determinado. Esto puede explicar la virulencia encontrada en las cepas de *C. burnetii* aisladas a partir de esta especie de ungulado doméstico, la cual se ve atenuada cuando es introducida en poblaciones de ganado bovino aisladas del contacto con garrapatas (Martinov, 1989; Kocianová y cols., 2001).

Hasta ahora, hemos visto una serie de hipótesis que intentan explicar la evolución de la virulencia de *C. burnetii* en relación con las poblaciones de artrópodos, de animales salvajes y en el caso de los ungulados domésticos, partiendo del supuesto de que estas poblaciones se comportan aisladamente. En realidad, existen interacciones entre el mundo salvaje y los rebaños de ungulados domésticos en régimen extensivo, o bien, hay rebaños mixtos (estos son de ovejas y cabras más frecuentemente, aunque existen ganaderías en las que coexisten las tres especies), dándose también zonas donde se han intensificado las producciones ganaderas y se ha producido un mayor aislamiento de las poblaciones domésticas y las salvajes (con lo cual, nos acercaríamos a las hipótesis anteriores).

En este sentido, conviene retomar de nuevo el trabajo realizado por Glazunova y colaboradores en 2005. En este trabajo, se agruparon los mencionados

159 aislamientos en función de sus diferentes genotipos en 30 grupos. Por otra parte y como se vio en el capítulo de bacteriología, los cambios evolutivos en el genoma de *C. burnetii* son escasos y relativamente recientes si los comparamos con otros patógenos intracelulares más dependientes del hospedador definitivo, como es el caso de las diferentes especies de *Chlamydia* y de *Brucella* (Seshadri y cols., 2003). Puede que esta evolución reciente de *C. burnetii* esté muy relacionada con su capacidad detectada en los laboratorios para cambiar de fase y de velocidad de crecimiento en función de las exigencias selectivas del medio y de la necesidad de evolucionar de una manera rápida a las cambiantes necesidades originadas por todas las posibles combinaciones de interacciones con los hospedadores definitivos y el medio en el que se desarrollan dichas interacciones, donde la domesticación y la evolución de las prácticas del manejo en la ganadería, muy probablemente, han jugado un papel fundamental (Maurin y Raoult, 1999; Seshadri y cols., 2003).

Por otra parte, otro estudio experimental demostró que la exposición mediante la vía aerógena de cobayas frente a diferentes aislamientos de *C. burnetii* mostraba la presencia o ausencia de enfermedad aguda en función de la presencia o ausencia de determinados plásmidos (Russell-Lodrigue y cols., 2009). Estas conclusiones refuerzan la hipótesis sostenida por varios autores de que diversas diferencias genotípicas están asociadas a las distintas formas de expresión de la enfermedad tanto en el hombre como en los animales (Glazunoba y cols., 2005; Stein y cols., 2005; Beare y cols., 2006; Russell-Lodrigue y cols., 2009), pero no debemos olvidarnos de la dependencia multifactorial de la presentación de las enfermedades en las poblaciones para no caer en el error de sobreponderar la acción de determinados factores sobre otros (Martin y cols., 1997).

La definición exacta del término virulencia es la capacidad de un agente infeccioso para producir la enfermedad, en términos de frecuencia y gravedad" (Thrusfield, 1990). En el caso de la fiebre Q humana, lo más frecuente es que la enfermedad se muestre en su forma aguda, mientras que, la forma crónica, aunque menos frecuente, es de mayor gravedad, pudiendo ser mortal (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Esto podría explicar el que muchos de los aislamientos asociados a la producción de cuadros agudos en el hombre no hayan podido ser aislados a partir de ungulados domésticos mientras que, aislamientos englobados en secuencias tipo asociadas a fiebre Q crónica humana, sí han podido ser aislados a partir de cabras, ovejas y vacas (Glazunoba y cols., 2005). En este sentido, se relacionaron aislamientos que se obtuvieron a partir de muestras de abortos en cabras con importantes brotes epidémicos de la fiebre Q crónica en el

hombre (Hatchette y cols., 2002; Glazunoba y cols., 2005).

Por último, citar que la disminución de la virulencia observada por Daïter y Gromova (1970) tras sucesivos pases de *C. burnetii* en una misma especie de garrapata puede ser un signo más del control de poblaciones bacterianas que podría estar relacionado con fenómenos como el cambio de fases y ralentización del crecimiento observado en laboratorio tras el cultivo de este microorganismo (Maurin y Raoult, 1999). La explicación de este fenómeno podría estar en que este experimento se comportaría como una simulación de lo que ocurriría en las poblaciones de estos artrópodos con la transmisión transovárica. Hemos de recordar que las vías que posibilitan la infección de estos artrópodos son la ingesta de sangre de animales infectados y la vía transovárica. En las poblaciones de animales salvajes, por ejemplo, en los años de mucha mortandad perinatal, habrá menos animales que parasitar y estos serán más resistentes y, entre estas capacidades de resistencia, podría estar la resistencia a la parasitación por garrapatas, lo que, lógicamente, se traduciría en una menor probabilidad de que las garrapatas desarrollen la transmisión transovárica. En esta situación, una mayor virulencia de *C. burnetii* estaría justificada si partimos de la base de que la producción de enfermedad en estos animales facilitaría la posibilidad de que la garrapata y su endosimbionte desarrollaran su ciclo vital en un medio adverso.

En un escenario más benigno para la garrapata, la mayor virulencia de las cepas circulantes de *C. burnetii* no estaría justificada, ya que, aunque las garrapatas no pudieran transmitir la fiebre Q, tendrían igualmente el éxito asegurado, ya que habrían muchos más animales susceptibles de ser parasitados por su mayor sensibilidad. *C. burnetii* tendría la oportunidad de desarrollarse tanto en los artrópodos como en las diferentes especies animales, con lo cual, la virulencia en este caso, se orientaría a lograr una mayor adaptación a sus diferentes hospedadores cronificando los procesos. Este mecanismo de adaptación se vería facilitado en las garrapatas mediante la transmisión transovárica que, en un medio sin tanta selección, sería más probable. Por tanto, el citado proceso, podría explicar la presencia de microorganismos endosimbiontes de las garrapatas relacionados filogenéticamente con *C. burnetii* (Noda y cols., 1997; Bernasconi y cols., 2002; Mediannikov y cols., 2003; Lee y cols., 2004; Reeves y cols., 2005; Jasinskis y cols., 2007; Reeves, 2008).

De otro lado, tendríamos que es muy probable que la transmisión transovárica de *C. burnetii* pueda tener mayor repercusión en aquellas especies de garrapatas con

un solo hospedador definitivo, como se ha demostrado para la transmisión de ciertas enfermedades producidas por diferentes especies de *Babesia* (Smith y cols., 1978). Este escenario, a primera vista y según lo expuesto en este apartado, debería ser más propicio para una mejor adaptación de las cepas de *C. burnetii* circulantes a los potenciales hospedadores de estas especies de garrapata y por tanto, ello debería redundar en una disminución de la virulencia de las cepas promovida por la transmisión transovárica en estos artrópodos (Kocianová y cols., 2001).

2.6.5. FACTORES AMBIENTALES Y ELEMENTOS BIÓTICOS (GARRAPATAS)

Si bien la fiebre Q se ha podido detectar prácticamente en todo el mundo, a excepción de Nueva Zelanda, los territorios que se consideran de mayor importancia nosológica son los países que circundan el mar Mediterráneo y el mar Negro, zonas esteparias del Asia Central, Japón, zonas de la Sabana Africana, áreas de pastos de los estados del oeste americano y la mitad oriental de Australia (Blaha y cols., 1995; Maurin y Raoult, 1999). Todas estas regiones se caracterizan por estar habitadas por diferentes especies de garrapatas y por tener climas cálidos o templados con inviernos que no son extremadamente fríos y unas precipitaciones que permiten el desarrollo del ciclo vital de estos artrópodos. Sin embargo, esta situación está cambiando con el cambio climático, de tal forma que estos artrópodos están logrando habitar territorios en los que no eran capaces de desarrollarse en apenas una década atrás (Ogden y cols. 2005; Lindgren y cols., 2006; Gray, 2009). Como ya hemos visto también, con la evolución de las prácticas de producción animal, se ha apreciado que estos ectoparásitos no son necesarios para que la enfermedad se expanda entre las poblaciones animales, pero sí que actúan como un reservorio importante de *C. burnetii* en la naturaleza (Marrie, 1990a; Maurin y Roul, 1999; Arricau-Bouveri, 2005).

De otra parte, está la capacidad de *C. burnetii* para persistir en el medio por amplios periodos de tiempo. Esta está relacionada a su vez, con su capacidad para ser transportada por el viento a largas distancias a partir de suelos contaminados, fenómeno que también parece depender de las precipitaciones, probablemente debido a que se facilita la posterior creación de aerosoles contaminados tras las épocas de lluvias (Tissot y cols., 2004).

En un estudio realizado en Perú, sobre casos de infección respiratoria aguda, se logró establecer una relación entre la aparición de dichos casos y factores

climáticos como la temperatura y la humedad relativa del aire (Aguinaga y cols., 2003). Si bien no existen estudios con respecto a la fiebre Q en este ámbito, este estudio nos habla de la posibilidad de que la aparición de los distintos cuadros de fiebre Q aguda en las poblaciones humanas pueda depender de este tipo de variables climáticas. Esta hipótesis se apoyaría también en las diferencias de presentación de la fiebre Q aguda humana observadas en diferentes regiones del mundo, donde parece ser que en los climas más fríos y con mayor humedad relativa en el aire, se darían cuadros neumónicos con más frecuencia que los hepáticos, mientras que en los climas más cálidos y secos, la tendencia sería contraria (Marrie y cols., 1985; Simor, 1987; Sesma, 1990; Latorre y cols., 1995; Caron y cols., 1998; Tissot-Dupont, 2004; Ergas y cols., 2006; Cilla y cols., 2008; Delsing y Kullberg, 2008).

Dichos factores climáticos tienen mucho que ver con la frecuencia de presentación de la enfermedad en las poblaciones animales. No obstante, un buen diseño de las instalaciones ganaderas en las explotaciones de rumiantes ayuda a proteger al ganado de las inclemencias climatológicas, especialmente, su zona cubierta debe tener una influencia importante en la disminución de la transmisión y en las tasas de presencia de enfermedades como la fiebre Q, cuya vía de transmisión principal es la aerógena (Buxadé y cols., 1996).

Además, tenemos la importancia del manejo de los animales de producción domésticos en las tasas de presencia de fiebre Q en estos animales y, más concretamente, el manejo de las producciones de ungulados. En este sentido, ya hemos visto como en Turquía Kennerman y colaboradores (2010) relacionaban un mayor número de ovejas de la explotación con una mayor seroprevalencia. A su vez, se ha visto cómo las variaciones de manejo experimentadas en las diferentes especies de los rumiantes domésticos en Bulgaria ha contribuido a variar las seroprevalencias en dichas poblaciones a lo largo del tiempo de una manera importante (Martinov, 2007).

Existen pocos trabajos que relacionen estas variables ambientales en las producciones animales con el desarrollo de la fiebre Q en dichas poblaciones. Estos conocimientos son indispensables a la hora de establecer planes de lucha y control contra cualquier enfermedad. De nada sirve tener vacunas efectivas en condiciones de experimentación animal que, normalmente, no son las que se dan en las explotaciones ganaderas, si tenemos, por ejemplo, un ambiente en las explotaciones ganaderas que genera estrés, que cuenta con una alta contaminación del suelo y que debido al mal diseño de su zona cubierta, genera fuertes cambios de temperaturas o

corrientes de aire, las cuales a su vez, favorecen la aparición de cuadros neumónicos y, teóricamente, deberían favorecer la transmisión de fiebre Q. En estas condiciones, difícilmente lograremos unos resultados óptimos a la hora de controlar la enfermedad aunque dispongamos de una vacuna eficaz (Buxadé y cols., 1996; Martin y cols., 1997).

El control de la fiebre Q en las explotaciones de rumiantes domésticos es primordial de cara a afrontar el problema de salud pública que supone esta enfermedad. De hecho, las principales fuentes de infección para las poblaciones humanas parten de la contaminación ambiental por *C. burnetii* generada por estas poblaciones animales. Por tanto, el controlar la contaminación ambiental por *C. burnetii* ha de ser una de las claves de cara al establecimiento de los planes de lucha y control contra la fiebre Q. Para ello han de conocerse, entre otra cosas, las posibles vías de eliminación de *C. burnetii* al medio por parte de las especies hospedadoras. En este sentido, una serie de estudios llevados a cabo en las especies ovina, caprina y bovina, han determinado que la primera tiende a contaminar masivamente el medio, principalmente en torno a la época de partos, siendo las principales vías de excreción las heces, las secreciones vaginales, las placentas y fetos abortados, eliminando también la bacteria por la leche, pero de una manera más discontinua en este caso que en el caso de los ganados caprino y bovino. Con respecto a la cabra, la eliminación de *Coxiella* al medio tiende a cronificarse, siendo la principal vía de excreción la leche, al igual que en el caso del ganado bovino, pero en la cabra, como ya se ha visto, este agente causal es capaz de producir abortos, con lo cual, esta se convertirá en otra importante vía de eliminación al medio en las épocas de partos en esta especie (Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007).

Una ruta de diseminación de *C. burnetii* al medio que llama la atención en ganado caprino y bovino es la eliminación por la leche. En el caso de la fiebre Q, cuya principal vía de transmisión es la vía aerógena, parece que su eliminación por la leche en estas especies no ha de tener una especial repercusión en la transmisión de la enfermedad tanto entre las poblaciones de estos animales como en las poblaciones humanas (Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Pero sin embargo, se ha visto que todas las especies de rumiantes domésticos eliminan *Coxiella* por las heces en mayor o menor medida (Berri y cols., 2001; Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007). La ingesta de leche por parte de las crías durante la lactancia natural, principalmente en el caso de los ganados bovino y caprino, puede convertirse en otra vía de contaminación ambiental y de dispersión del agente causal, ya que puede ser eliminada posteriormente por las heces por estos animales que han ingerido grandes

cantidades de esta bacteria a través de la leche contaminada de sus madres.

De igual forma, y sobre todo en el ganado ovino, una fuente de contaminación ambiental por *C. burnetii* sería la de los excrementos de las garrapatas que parasitan a estos ganados y que se acumularían en el vellón de lana de estos animales. Ésta podría ser una fuente importante de infección no solo para las poblaciones de estos animales, sino también para las poblaciones humanas, mediante prácticas tradicionales como la esquila de las ovejas o el tratamiento artesanal o industrial de lana. Asimismo, estaría también la contaminación de pieles y pelo en todas las especies de rumiantes domésticos (Marrie, 1990a). Las heces de garrapata tienen una gran concentración bacteriana de *C. burnetii* y por tanto, una gran capacidad infectante vía aerógena en los supuestos que se han expuesto anteriormente (Derrick y cols., 1959).

Por último, parece ser que la principal vía de eliminación de *C. burnetii* al medio en el caso de las mascotas y las poblaciones humanas, son las placentas y las secreciones vaginales tras el parto de hembras y mujeres infectadas. Esto explica la aparición de brotes epidémicos relacionados con el parto de mascotas infectadas o la infección del personal sanitario tras asistir el parto de mujeres que padecen la fiebre Q durante el embarazo (Marrie., 1990a; Vaidya y cols., 2008).

2.6.6. PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN TIEMPO ABSOLUTO. ESTACIONALIDAD. INTERRELACIONES EDAD-TIEMPO

En cuanto a la presentación de la fiebre Q en tiempo absoluto, esta enfermedad se manifiesta normalmente de manera estacional tanto en las poblaciones humanas como en animales. Si bien en las diferentes regiones, dicha estacionalidad varía principalmente en función de la especie animal que actúe como reservorio natural más importante y del manejo reproductivo de la misma (de la distribución de los partos en el año), así como de la climatología de la zona en concreto, entre otros factores ambientales. Este abanico de posibilidades hace que en regiones como Europa, la enfermedad tenga un carácter marcadamente estacional, donde la distribución de las parideras de los rumiantes (sobre todo de los pequeños rumiantes) en torno al final del otoño y principio del invierno, desemboca en una importante contaminación del ambiente con *C. burnetii* que se convierte en una fuente de contagio para los animales y que, si no hay variaciones ambientales importantes como las debidas a la climatología, produce la máxima acumulación de casos de fiebre Q en las poblaciones humanas en torno a la primavera.

En los países donde el clima no es excesivamente frío o bien es cálido, la enfermedad se comporta de forma endémica con la aparición de brotes epidémicos. Lógicamente, la aparición de estos brotes son provocados por la rotura temporal del equilibrio establecido entre el medioambiente, el agente causal y los hospedadores (Marrie, 1990a; Martin y cols., 1997; Maurin y Raoult, 1999). En este sentido y hasta ahora, dichos brotes epidémicos suelen ser diagnosticados en las poblaciones humanas antes que en los animales. La aparición de casos clínicos por encima de los valores normales alertan a los servicios de salud pública de las regiones afectadas, lo que a su vez, origina la búsqueda de la causa del brote (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999).

En el extremo opuesto tendríamos el caso de Canadá, donde no se aprecia una estacionalidad manifiesta (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

Un ejemplo de desequilibrio originado por un cambio medioambiental que desembocó en un brote epidémico de fiebre Q lo tenemos en el ocurrido durante el invierno de 1998 a 1999 en la población humana del (Tissot-Dupont y cols., 2004). Aquel invierno el viento Mistral sopló con más intensidad y dejó más precipitaciones de lo normal, originando la aparición de un aumento inesperado de casos de fiebre Q aguda humana aquel invierno, cuando lo normal era un pico máximo de casos en torno a la primavera.

Otro ejemplo de desequilibrio en una zona endémica que englobaría, en este caso un cambio entre la relación agente-hospedador, es el experimentado en la evolución de la fiebre Q en Bulgaria y Eslovenia a partir de las reformas económicas ocurridas en torno a la década de 1990 (Zerbezov y cols., 1999). En Bulgaria este cambio de modelo económico originó que el censo caprino del país se triplicara y desplazara en importancia al que fuera el principal subsector ganadero del país, la producción de ganado bovino. Esto originó que cepas de *C. burnetii* circulantes en los ganados de cabras importados entraran en contacto de forma masiva con los ganaderos y sus familias y con gentes de las zonas rurales, lo cual desembocó en brotes epidémicos de enfermedad clínica de fiebre Q y un aumento de los casos crónicos de la enfermedad en diferentes poblaciones humanas del país. Sin embargo, la importación de cabras en Eslovenia no repercutió en la sanidad pública de la misma manera. Se cree que, un buen diagnóstico precoz de los casos de fiebre Q aguda y la aplicación temprana de un eficaz tratamiento antibiótico fue la causa de

que no hubiera tantos casos crónicos de la enfermedad, mientras que, un control veterinario de los movimientos de animales, basado en estudios serológicos, el control de materias primas importadas y la aplicación de un plan de lucha y control contra la enfermedad en los animales de producción, sería la explicación que dan los autores a la menor aparición de casos de fiebre Q en las poblaciones humanas de Eslovenia.

Finalmente, en cuanto a las interrelaciones edad-tiempo presentes en la fiebre Q, no existen estudios epidemiológicos específicos sobre esta enfermedad al respecto, aunque sería interesante conocer no solo cómo se presenta la fiebre Q con respecto a la edad, sino hasta qué punto han podido influir en esta distribución de la enfermedad por edades, factores ambientales actuales o incluso, como pudieron influir factores ambientales pasados. (Marrie, 1990a; Martin y cols., 1997; Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

2.7. EPIDEMIOLOGÍA APLICADA: MEDICINA PREVENTIVA Y ESTUDIOS ECOLÓGICOS

“Mi ideal político es la democracia.

Cada uno debe ser respetado como persona y nadie debe ser divinizado”

Albert Einstein

2.7.1. INFLUENCIA Y REPERCUSIÓN DE LA FIEBRE Q EN LA SANIDAD ANIMAL Y LA SALUD PÚBLICA. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA ENFERMEDAD

Según diversos estudios, se estima que aproximadamente entre el 50% y el 60% de las infecciones agudas que acontecen en la especie humana son asintomáticas, si bien hay que tener en cuenta que los síntomas de la fiebre Q aguda pueden confundirse, por ejemplo, con los de la gripe (Dupuis y cols., 1987; Raoult y cols., 2000; Maurin y Raoult, 1999). Estos datos apuntan a que la fiebre Q aguda humana probablemente esté infradiagnosticada, máxime en lugares donde la enfermedad está presente y no existen unidades de diagnóstico con experiencia en la detección de esta enfermedad.

Según datos obtenidos en el sur de Francia donde se estima una incidencia media anual de casos de fiebre Q clínica de 50 casos cada 100.000 habitantes, de los pacientes que muestran signos de enfermedad, la gran mayoría (alrededor de un 95%) no precisan ser hospitalizados, siendo hospitalizados el 5% restante (es decir, el 2% del total de infectados con o sin síntomas). Uno de cada diez pacientes hospitalizados evoluciona hacia la forma crónica de la enfermedad (es decir, el 0,2% de todos los infectados), siendo la incidencia anual media de casos de endocarditis por fiebre Q crónica de 1 caso por millón de habitantes (Maurin y Raoult, 1999), siendo a su vez la endocarditis la evolución más frecuente de la fiebre Q crónica humana (60-70%) (Raoult y cols., 2000; Cutler y cols., 2002). El riesgo de evolución a la forma crónica de la enfermedad en humana es considerablemente mayor en aquellos pacientes crónicos que no han sido tratados durante la fase aguda de la enfermedad (Raoult y cols., 1999; Fenollar y cols., 2001).

También se ha demostrado la existencia del denominado síndrome de la fatiga crónica asociado a la fiebre Q. Diversos estudios sitúan la prevalencia de dicho síndrome entre el 10 y el 30% de todos los enfermos que, habiendo pasado la fase aguda de la enfermedad, muestran síntomas persistentes después de haber

transcurrido un año tras el inicio de la infección aguda (Kermode y cols., 2003; Marmion y cols., 2005). Asimismo, las mujeres embarazadas son otro colectivo de alto riesgo debido al tropismo que muestra *C. burnetii* por el tejido placentario. De esta manera, se han observado hasta un 33% de nacimientos prematuros y un 39% entre abortos espontáneos y muertes de neonatos en la presentación aguda de la fiebre Q en mujeres embarazadas (Raoult y cols., 2002).

En cuanto a las repercusiones de la fiebre Q en la Sanidad Animal, ya se ha citado que esta enfermedad ocasiona sus mayores pérdidas afectando de manera considerable a los diferentes índices reproductivos de los ganados de rumiantes afectados. En este sentido, ya se ha podido apreciar en capítulos anteriores cómo la infección por *C. burnetii* influye de manera diferente en los índices reproductivos según la especie que se esté estudiando. De esta manera, en el ganado bovino la fiebre Q afectará principalmente a la tasa de fertilidad, mientras que en el ganado caprino las tasas de abortos, de nacimientos prematuros y de mortalidad neonatal se verán afectadas en mayor grado, siendo en el ganado ovino, el incremento de la tasa de abortos lo más destacable (Berri y cols., 2005; Rodolakis y cols., 2007; Rousset y cols., 2009).

En el ganado bovino, si bien las infecciones por *C. burnetii* se suelen asociar a procesos de metritis e infertilidad (Lang, 1990), también se han observado brotes de aborto como el descrito por Cabassi y colaboradores (2006) en el norte de Italia. En otro estudio realizado en Alemania sobre ganado bovino con problemas de fertilidad asociados a fiebre Q diagnosticados mediante PCR y serología conjuntamente, se observó que los ganaderos de las explotaciones en las que se daban abortos asociados a fiebre Q tenían mayor riesgo de contraer la enfermedad (Sting y cols., 2002).

Algunas cifras ilustrativas de cómo afecta la fiebre Q a los índices reproductivos en el ganado de pequeños rumiantes en las zonas donde esta enfermedad es endémica podemos encontrarlas en estudios como el realizado en la isla de Cerdeña por Masala y colaboradores (2007). En este estudio, se analizaron sueros mediante ELISA y muestras de abortos (fetos y placentas) mediante PCR, provenientes de granjas de ovejas y cabras de toda la isla. Se detectaron anticuerpos en el 38% de las granjas de ovejas y en el 47% de las granjas de caprino analizadas, siendo positivos el 9% y el 13% de los sueros analizados en el caso de los ganados ovino y caprino, respectivamente. En cuanto al análisis de las muestras de abortos por PCR, se observó presencia de *C. burnetii* en el 10% de las muestras en el caso

del ganado ovino y en el 6% en el ganado caprino.

Como se puede observar en este estudio, la importancia de los abortos relacionados con la fiebre Q es mayor en el ganado ovino que en el caprino, aún siendo la prevalencia media de los ganados afectados, menor en los ovinos que en los caprinos de la isla de Cerdeña. Los autores de dicho trabajo destacaban la escasa importancia de *C. burnetii* como agente productor de abortos en esta región (sobre todo en lo que respecta al ganado caprino). Sin embargo, la prevalencia media de los ganados afectados de abortos no es excesivamente alta, si bien es muy similar a la detectada por otros autores en dicho país para las diferentes especies de rumiantes (1.2%-14%) (Capuano y cols., 2001) y a la encontrada en otras zonas relativamente cercanas al Mediterráneo como es el caso de Albania, donde se detectó una seroprevalencia del 9.8% en ovinos y caprinos (Çekani y cols., 2008). Por otra parte, en una población de búfalos de agua localizada en la región de Campania (sur de Italia), se detectó la presencia de *C. burnetii* mediante PCR, en el 17.5% de los fetos abortados (Perugini y cols., 2009).

En la isla de Lanzarote (Islas Canarias), donde la enfermedad también es endémica, se detectó a principios de los años 90 una seroprevalencia en el ganado caprino de la isla del 32.73% (Pascual, 1994). Por su parte, en otro estudio realizado en el País Vasco en el que se analizaban las causas de aborto infeccioso en el ganado ovino entre los años 1999 y 2003, *C. burnetii* estaba entre las causas más frecuentes, detectándose en el 3% de los casos de aborto analizados, resultado que aumentaba al 9% cuando se utilizaba la técnica de PCR en el diagnóstico (Oporto y cols., 2006). Otras causas infecciosas de aborto detectadas en dicho estudio fueron la enfermedad de la frontera (16%), toxoplasmosis (15%), clamidiosis (12%), salmonelosis (10%), infecciones misceláneas (*Yersinia* spp., *Listeria* spp., *Brucella* spp.) (7%) y otras lesiones inflamatorias compatibles con la posible acción de otros agentes infecciosos (7%). En esta misma localización, en un estudio de seroprevalencia llevado a cabo en ganaderías semiextensivas de las diferentes especies de rumiantes (Ruíz-Fons y cols., 2010), se detectaron las siguientes prevalencias por especies: ovinos (11.8%), caprinos (8.7%) y vacuno de aptitud cárnica (6.7%).

Otro estudio de estas características se desarrolló en California entre los años 1991-1998. En dicho estudio se analizaron las causas de casos de aborto caprino, detectándose una causa de origen infeccioso en el 37% de los casos, de los cuales, el 30.5% fueron originados por bacterias. *C. psittaci* y *C. burnetii* fueron las principales

causas de aborto, siendo detectadas en el 23% de todos los abortos analizados (Moeller, 2001). Por otra parte, en Suiza (Chanton-Greutmann y cols., 2002), en un estudio donde se realizó un seguimiento a cabras y ovejas durante dos parideras consecutivas (años 1996–1998) se detectó que *C. burnetii* era la tercera causa en importancia de aborto infeccioso (1% en ovejas, 10% en cabras), siendo la primera causa de aborto *Chlamydophila abortus* (39% en ovejas, 23% en cabras), seguida de *Toxoplasma gondii* (19% en ovejas, 15% en cabras).

En Francia, Berri y colaboradores (2001) realizaron un estudio en el que se llevó a cabo un seguimiento a un lote de ovejas durante tres parideras. En este estudio se observó que abortaron un 6% de las ovejas debido a la infección por *C. burnetii* en la primera paridera, no observándose en las parideras subsecuentes ni abortos, ni nacimientos prematuros, ni corderos débiles. El mismo autor principal, estudió durante dos años consecutivos las consecuencias de un brote de abortos asociado a fiebre Q en un ganado de cabras ocurrido en 2003, en el que la seroprevalencia detectada mediante ELISA a las 6 semanas del inicio del brote fue del 80%. El primer año el 30% de los animales mostró problemas reproductivos, de los cuales, el 7% fueron abortos y el 23% fueron nacimientos prematuros, mientras que en el segundo año, la tasa de abortos disminuyó al 2% y la tasa de nacimientos prematuros al 7%. La mortalidad por nacimiento prematuro sumada a la mortalidad neonatal (48 horas tras el nacimiento) ascendió en el primer año al 25%, siendo del 5% al año siguiente (Berri y cols., 2007). Este estudio pone de manifiesto que, si bien la fiebre Q produce pérdidas en el ganado caprino asociadas a la producción de abortos, las mayores pérdidas producidas por esta enfermedad se asocian a los nacimientos prematuros y, a la mortalidad perinatal y neonatal.

Son pocos los estudios que valoran las repercusiones económicas de esta enfermedad. En este sentido, Australia, país que contaba con 20.6 millones de habitantes en el año 2006, concentrados principalmente en grandes ciudades costeras como Sidney, Melbourne, Brisbane, Perth y Adelaida, que cuenta con una incidencia anual de casos de fiebre Q que se sitúa entre 3.11 y 4.99 casos cada 100.000 habitantes (Garner y cols., 1997), lleva desarrollando un programa nacional de vacunación contra la fiebre Q en profesionales de riesgo desde el año 2002. Dicho programa abarcó la prevención mediante la vacunación contra la fiebre Q en el 100% de los trabajadores de matadero y en el 43% de los ganaderos. La detección de casos de fiebre Q entre 2002 y 2006 en Australia decreció en un 50%, siguiendo la misma tendencia la disminución de hospitalizaciones debidas a la enfermedad y, siendo el grupo de hombres jóvenes el que experimentó el principal descenso,

previniéndose la enfermedad especialmente en el colectivo de trabajadores de matadero (Gidding y cols., 2009).

Previamente a este estudio, una investigación trató de establecer un modelo matemático predictivo sobre cuál sería la evolución coste-beneficio de un programa nacional de vacunación por 20 años que incrementara la prevención del 65% al 100% de los trabajadores relacionados con la industria cárnica del país y del 0% al 20% de los ganaderos. En dicho estudio se utilizó un modelo de Markov y la relación coste-beneficio fue de 6.294\$ de coste enfrente a 20.002\$ de beneficio por persona en el caso de los trabajadores de la industria cárnica y de 7.984\$ de coste enfrente a 24.950\$ de beneficio por persona en el caso de los ganaderos. El modelo apuntaba a que el programa de vacunación sería rentable, lo cual, se pudo constatar empíricamente a posteriori, como se vio en el párrafo anterior (Kermode y cols., 2003). Asimismo y previamente a estos estudios, otro trabajo de revisión de la fiebre Q y sus repercusiones en el ámbito de la salud pública realizado también en Australia entre los años 1991-1994, determinaba que las pérdidas anuales originadas por esta enfermedad debido a sus repercusiones en el mencionado ámbito ascendían a aproximadamente a un millón de dólares y más de 1.700 semanas de trabajo por bajas médicas de los trabajadores afectados (Garner y cols., 1997). Ya en este trabajo, sus autores preveían los beneficios de aplicar un programa nacional de vacunación contra la fiebre Q que incluyera la vacunación de los habitantes de las zonas rurales y la de los empleados de los mataderos.

Otro estudio que analiza la importancia económica de las repercusiones de la fiebre Q en la Salud Pública tiene que ver con el potencial de *C. burnetii* como arma biológica (Moodie y cols., 2008), realizado por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (Estados Unidos). Se evaluó la relación riesgo-beneficio de la aplicación de un plan de profilaxis contra la fiebre Q tras una exposición masiva a *C. burnetii*, fruto de un atentado terrorista. En dicho estudio se analizaron por separado la población general, la de mujeres embarazadas y otros grupos de riesgo dentro de la población. Para cada uno de los grupos estudiados se construyó un árbol de decisión en el que se determinó las tasas de presencia de enfermedad y de mortalidad esperadas tras la implantación del citado plan, expresando los valores por cada 100.000 habitantes. El plan de profilaxis consistía en aplicar a la población objeto del atentado un tratamiento a base de doxiciclina, exceptuando a las mujeres embarazadas, en cuyo caso se aplicaría un tratamiento a base de trimetoprim-sulfametazol. Dicho plan se empezaría a aplicar entre los días 8-12 tras la exposición al agente causal.

Los autores concluyeron que, según el límite superior de probabilidad estimado sobre los efectos adversos que pudieran derivarse de la aplicación del tratamiento, el riesgo derivado de la presencia de la fiebre Q pesaba más que los efectos adversos esperados del tratamiento con doxiciclina cuando la probabilidad de exposición a *C. burnetii* superaba el 7%. En el caso de las mujeres embarazadas el valor de la probabilidad de exposición a *C. burnetii* que justificaba la aplicación del tratamiento aumentaba al 16% (Moodie y cols., 2008).

Si en el ámbito de la Salud Pública los estudios sobre la repercusión económica de la fiebre Q son escasos, en el ámbito de la Sanidad Animal son nulos. En cualquier caso, una enfermedad que repercute sobre los índices reproductivos de los rumiantes domésticos de la manera descrita por los estudios citados anteriormente (Pascual, 1994; Berri y cols., 2001; Moeller, 2001; Chanton-Greutmann y cols., 2002; Masala y cols., 2004; Oporto y cols., 2006; Berri y cols., 2007; Çekani y cols., 2008; Perugini y cols., 2009; Ruíz-Fons y cols. 2010), de forma continuada, produce unas pérdidas económicas que se presuponen suficientes como para justificar económicamente la aplicación de planes nacionales de lucha y control contra la enfermedad en áreas endémicas.

En cualquier caso, hacen falta estudios que cuantifiquen y creen modelos predictivos teóricos, basados en datos reales, que ayuden a elegir las mejores opciones de actuación en los diferentes escenarios posibles, máxime en un escenario como el actual, en el que, fenómenos como la reciente urbanización en zonas rurales experimentada en múltiples países desarrollados, ha aumentado la presencia de la enfermedad en las poblaciones rurales fruto del aumento del riesgo de exposición a *C. burnetii* (Hellenbrand y cols., 2001).

2.7.2. LA FIEBRE Q EN CANARIAS EN EL ÁMBITO DE LA SALUD PÚBLICA Y DE LA SANIDAD ANIMAL

En el estudio seroprevalencial llevado a cabo por Pascual (1994) a principios de los años 90 en la isla de Lanzarote, mediante la técnica de la inmunofluorescencia indirecta (anti-IgG), se detectó una seroprevalencia global en la especie humana del 18.70%. En comparación con otras regiones de España y según estudios realizados en las décadas de 1980 y 1990 que utilizaban la misma técnica diagnóstica y mismo punto de corte, esta tasa de seroprevalencia se situaba por debajo de las detectadas para el País Vasco con 32.3% (Sanzo y cols., 1993) y Huelva con 30.9% (Igual y cols., 1990), cercana a la detectada en el Ferrol que fue del 17.95% (Sesma

Sánchez, 1990), y superior a la detectada para Sevilla, un 10.8% (García y Nájera, 1984). Asimismo, en otro estudio realizado en la isla de Tenerife en 1995 con la misma técnica pero con un punto de corte más alto, la seroprevalencia detectada fue del 11.6% (del Castillo y cols., 1995).

Al inicio de la pasada década (Bolaños y cols., 2004), un estudio seroprevalencial realizado para la totalidad del archipiélago mediante inmunofluorescencia indirecta, mostró una seroprevalencia del 35.8% cuando el punto de corte se establecía en la dilución 1/20 y del 21.5 % cuando el punto de corte se establecía en 1/80, con lo cual, se pudo apreciar una diferencia significativa entre la utilización de ambos puntos de corte ($p=0.001$). Como se puede apreciar, si bien es verdad que estos datos se refieren al global del archipiélago (Bolaños y cols., 2004), si los comparamos con los resultados de seroprevalencia detectados en la isla de Lanzarote en la década de los 90 (estudio realizado con punto de corte 1/20), observamos un incremento de 17.1 puntos porcentuales. Concretamente, 35.8% (Bolaños y cols., 2004) versus 18.7% (Pascual, 1994).

Sin embargo, la incidencia anual de casos de fiebre Q aguda humana detectada en Lanzarote entre 1990 y 1992 fue de 9 casos por cada 100.000 habitantes, mientras que en el sureste de Gran Canaria, entre los años 1998 y 2000, fue de 5 casos cada 100.000 habitantes, similar por ejemplo, a la detectada en Australia (Pascual, 1994; Garner y cols., 1997; Bolaños y cols. 2003). Luego, a falta de trabajos más recientes sobre la incidencia de la enfermedad en las poblaciones humanas en Canarias, no parece ser que la densidad poblacional humana explique, por sí sola, la distribución de la incidencia de casos clínicos de la enfermedad por islas. Probablemente, factores como la distribución territorial de los ganados y de las poblaciones humanas en las zonas rurales, factores socioculturales, como el grado de apego de los ciudadanos de las zonas urbanas al mundo rural, la orografía y climatología (acción de los vientos en las distintas islas), pueden estar influyendo en la distribución de la enfermedad en las poblaciones humanas de las diferentes islas (Maurin y Raoult, 1999; Tissot-Dupont y cols., 1999; Hellenbrand y cols., 2001; Tissot-Dupont y cols., 2004).

En cuanto a los estudios seroprevalenciales de los rumiantes en Canarias cabe destacar la seroprevalencia detectada por Pascual (1994) en el ganado caprino de Lanzarote mediante inmunofluorescencia indirecta (1/20), la cual fue del 32.7%. Otro estudio realizado recientemente en la isla de Gran Canaria sobre una muestra aleatoria compuesta por cabras, ovejas y vacas, utilizando un test indirecto de ELISA,

mostró unas seroprevalencias del 60.4%, 31.7% y 12.2%, respectivamente (Rodríguez y cols., 2010).

Los datos expuestos en el párrafo anterior (Pascual, 1994; Rodríguez y cols., 2010) unidos a los resultados de estudios como los de Berri y colaboradores en ovejas (2001) y en cabras (2007), en los que se han asociado tasas de seroprevalencia a la repercusión de la enfermedad en los distintos índices reproductivos de los rebaños afectados, hacen pensar que las pérdidas debidas a esta enfermedad en los rebaños de ungulados domésticos de Canarias han de ser cuantiosas.

Ante la falta de estudios que profundicen en el coste real de las pérdidas económicas de la fiebre Q en las producciones ganaderas de rumiantes domésticos en Canarias, éstas podrían ser debidas a los perjuicios causados por la enfermedad en las tasas de aborto, de mortalidad de prematuros y neonatal (sobre todo en los pequeños rumiantes), en las tasas de fertilidad (Martinov y cols., 1989; Damoser y cols., 1993; Berri y cols., 2007; Wouda y Dercksen, 2007), unido al probable descenso en el rendimiento lechero de las reproductoras afectadas por la enfermedad. En la última década se ha logrado asociar a *C. burnetii* con la producción de mamitis (Barlow y cols., 2007). Además, se ha observado que el periodo máximo de recuperación de las lesiones producidas por la infección de *C. burnetii* puede extenderse hasta los 120 días (Sánchez y cols., 2007). Sin embargo y en el caso concreto del ganado caprino, se pudo apreciar que las pérdidas fetales a partir de los tres meses de gestación por distintas causas (las cuales fueron las que se observaron con más frecuencia) no se asociaban, al menos de una manera significativa, con pérdidas considerables en la producción láctea y/o con el empeoramiento de otros índices de producción (Engeland y cols., 1997b).

Según el Servicio de Estadística, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias, la producción cárnica de estos subsectores ganaderos en Canarias se ha estimado para 2010 en 25.748.000 euros, con el siguiente desglose (en euros): caprino 17.193.000, ovino 2.350.000 y bovino 6.205.000. Según la fuente citada, la producción láctea en Canarias se ha estimado para 2010 en 40.584.000 euros, con el siguiente desglose (en euros): caprino 27.217.000, bovino 11.409.000 y ovino 1.958.000 (Estadística Agraria de Canarias, 2010).

Si nos centramos en el subsector caprino canario y admitimos que el 34,4%

del valor de la producción cárnica de 2010 se debió a los rendimientos obtenidos por el sacrificio de los cabritos (**Plan Director Ganadero de Canarias**, capítulo XIV, Subsectores Caprino de Leche y de Caprino de Carne, 2000), obtenemos que el sacrificio de dichos animales generó un valor aproximado de 5.175.900 euros en 2010. El 80% del citado valor (4.140.720 euros) se generó a su vez en la Provincia de Las Palmas, donde la isla de Gran Canaria aporta el 37.07% del censo oficial (Estadística Agraria de Canarias, 2010). Si se admite como aproximación en virtud de los datos expuestos que la producción de carne de cabrito en la isla de Gran Canaria alcanzó un valor de 1.534.965 euros, tenemos en cuenta la seroprevalencia detectada recientemente para el ganado caprino de la isla, que fue del 60,8%, detectada mediante ELISA (Rodríguez y cols., 2010) y prestamos atención al ya citado estudio de Berri y colaboradores (2007), donde se detecta una fuerte influencia negativa en los índices reproductivos de un ganado con una seroprevalencia del 80% detectada también mediante ELISA, se comprenderá que dichos datos justifican económicamente la realización de estudios como el que nos ocupa y futuros estudios sobre la influencia de la Fiebre Q en los índices productivos de las explotaciones de rumiantes de Canarias.

Valores próximos a los detectados en Francia para los índices reproductivos (Berri y cols., 2007) en la población caprina de Gran Canaria (Rodríguez y cols., 2010), con datos como un 7% de abortos que evoluciona al 2% al año siguiente, 23% de nacimientos prematuros que evoluciona al 7% al año siguiente o, datos como un 25% de mortalidad neonatal que evoluciona a un 5% al año siguiente, unido a los elevados precios de las materias primas utilizadas para la alimentación de los animales, suponen unas pérdidas inasumibles para cualquier productor.

2.7.3. TRANSMISIÓN Y ECOLOGÍA DE LA FIEBRE Q

Como se ha podido apreciar en capítulos anteriores, *C. burnetii* es un agente causal con especial habilidad para persistir en el medio externo, al igual que otros microorganismos cercanos evolutivamente, como es el caso de *L. pneumophila*. De hecho, y al igual que se ha demostrado para *Legionella*, se ha podido constatar que *C. burnetii* Nine Mile es capaz de infectar a las amebas, siendo viable el cultivo de esta cepa en cultivos celulares (células HEL) hasta seis semanas después de haber parasitado a estos microorganismos. Con lo cual, las amebas pueden comportarse como reservorio natural de *C. burnetii*, conformando un nicho natural protector para esta bacteria, tal y como se ha demostrado para las especies de *Legionella* (Rowbotham, 1980; La Scola y Raoult, 2001; Sturgill-Koszycki y Swanson, 2006).

Esta capacidad para persistir en el medio, unido a su capacidad para dispersarse a distancias considerables mediante la acción del viento (Marrie y Pollak, 1995; Carrieri y cols., 2002), constituyen dos características de este agente que ayudan a explicar el que la principal vía de transmisión observada para la fiebre Q sea la vía aerógena, mediante la inhalación de aerosoles formados a partir de la contaminación ambiental y de fómites provocada por *C. burnetii*. Este agente, cuando causa infección en las numerosas especies a las que es capaz de parasitar, logra una importante multiplicación que se traduce en una posterior e importante contaminación del medio, que favorece a su vez, su transmisión mediante aerosoles contaminados. Si a esto le unimos el que esta contaminación ocurre en muchas regiones de manera estacional, relacionada con la época de partos de los rumiantes domésticos de dichas regiones (Maurin y Raoult, 1999; Tissot-Dupont y Raoult, 2008), se puede entender que la fuerte concentración bacteriana en el ambiente unido a la acción de diferentes fenómenos climáticos, como es el caso de la acción de los vientos y las lluvias (Tissot-Dupont y cols., 2004), favorezca la formación de aerosoles contaminados que explican la citada importancia de la vía aerógena en la transmisión de la fiebre Q.

De hecho, en un estudio de experimentación animal se trató de infectar a cobayas mediante la aplicación de aerosoles contaminados con diferentes cantidades de *C. burnetii* comprendidas entre 2×10^6 y 2×10^1 bacterias, en un intento de lograr un modelo experimental que se acercara a la infección vía aerógena en el hombre (Russell-Lodrigue y cols., 2006). En dicho estudio se observó que los animales infectados con 2×10^6 bacterias morían antes del día 10 tras la inoculación, encontrándose una dosis letal 50 que se situaba en $2 \times 10^{5.7}$ coxiellas. Por otra parte, se verificó que bajas dosis de *C. burnetii* eran suficientes para causar la fiebre Q aguda en estos animales (concretamente 2×10^1 coxiellas), dando cuadros clínicos e histopatológicos muy similares a los encontrados en humana (Maurin y Raoult, 1999; Okimoto y cols., 2004). Dichos resultados están en la línea de los hallados por Tigertt y colaboradores en 1957, quienes observaron en un modelo mixto de experimentación animal y humana, que una dosis infectante muy pequeña (próxima a una única unidad infectante de *C. burnetii*) era capaz de infectar a una pequeña proporción de cobayas por las vías aerógena e intraperitoneal, observándose un buen ajuste entre las predicciones realizadas mediante un modelo de Poisson y los resultados observados experimentalmente por estos autores en cuanto a la relación de dosis infectante y producción de enfermedad.

En este mismo estudio se comparó la presencia de la enfermedad entre las cobayas y humanos infectados mediante la administración de aerosoles contaminados con diferentes dosis infectantes, observándose que en los humanos se daban mayores tasas de presencia de enfermedad a menores dosis infectantes que en las cobayas. Por otro lado, estos resultados contrastan con los observados por otros autores que precisaron de mayores dosis para producir la enfermedad vía aerógena en el mencionado animal (Kazar y cols., 1993), pero en cualquier caso, los resultados existentes apuntan a que *C. burnetii* es muy virulenta por la vía aerógena, asumiéndose en general, que la dosis infectante en humana puede estar en torno a 10 células de *C. burnetii* (Marrie, 1990a).

Esta capacidad patogénica mediante la vía aerógena, se ve potenciada in vivo por su capacidad para ser eliminada al medio en importantes cantidades a través de diversas excreciones y secreciones de las muchas especies susceptibles de ser infectadas. Entre dichas vías de eliminación de *C. burnetii* al medio destacan, la leche, la orina, las heces, los fluidos uterinos, líquido amniótico y placentas en los ungulados domésticos y salvajes, de las poblaciones humanas, además de las heces de las garrapatas, las cuales, por ejemplo, en el ganado ovino se pueden acumular por grandes periodos de tiempo en el pelaje del animal (Derrick y cols., 1959; Rodolakis y cols., 2007; Vaidya y cols., 2008), habiéndose observado que *C. burnetii* es capaz de mantener su capacidad infectante en las heces deshidratadas de estos artrópodos hasta 586 días (Ormsbee, 1972; Marrie, 1990a). Por otro lado, estarían las no tan bien estudiadas vías de eliminación de este agente causal por parte de las mascotas (principalmente perros y gatos), en los roedores, animales éstos que están en conexión con las producciones ganaderas en el medio rural y que podrían actuar como nexo entre el ciclo salvaje y el ciclo doméstico de la fiebre Q, y las vías de eliminación en las numerosas especies animales salvajes que se pueden ver afectadas por esta enfermedad (Maurin y Raoult, 1999).

Un estudio reciente en el que se pone de manifiesto la gran importancia de la vía aerógena en la transmisión de la fiebre Q y que invita a una reflexión profunda sobre la emergencia de esta enfermedad es el hallazgo de un brote de fiebre Q en una escuela urbana del centro de Israel (Amitai y cols., 2010). En este caso, se detectó que el foco de infección estaba relacionado con los sistemas de aire acondicionado del centro, los cuales, estaban contaminados con *C. burnetii*. Además, los autores del presente trabajo hacen hincapié en lo necesario del diagnóstico diferencial con los signos de la gripe. Sin duda, futuros estudios sobre la relación de *C. burnetii* con las amebas de vida libre y con el agua, y su ciclo vital en el exterior

de los hospedadores animales, nos abrirán muchas puertas al conocimiento de la epidemiología de la fiebre Q.

En la siguiente tabla se muestran algunos datos sobre las concentraciones de *C. burnetii* que se han detectado en algunas de estas vías de eliminación. Al contrastar estos datos con los datos de dosis infectante necesaria para la vía aerógena expuestos en el párrafo anterior, se pone de manifiesto la importancia de dichas vías en la diseminación en el medio y en la transmisión de la fiebre Q (tabla 2).

Vía de eliminación de <i>C. burnetii</i> al medio.	Concentración bacteriana detectada.	Referencias bibliográficas
Leches de oveja y vaca	50 – 5x10 ⁴ bacterias/ml	Enrigh y cols., 1956 Guatteo y cols., 2008
Placentas de rumiantes	10 ⁹ bacterias/gramo	Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005 Babudieri, 1957
Placenta humana	1.68x10 ² – 4.16x10 ⁶ bacterias/μl	Vaidya y cols., 2008
Secreciones vaginales, humana	2.61x10 ⁴ – 8.11x10 ⁴ bacterias/μl	Vaidya y cols., 2008
Orina humana	2.31x10 ¹ – 6.01x10 ¹ bacterias/μl	Vaidya y cols., 2008
Heces humana	1.13x10 ¹ – 1.39x10 ¹ bacterias/μl	Vaidya y cols., 2008

Tabla 6. Vías de eliminación de *C. burnetii* al medio por parte de diferentes hospedadores potenciales.

Después de examinar los resultados expresados en la tabla 2, es fácil hacerse a la idea de la facilidad con la que *C. burnetii* coloniza el medio circundante al hospedador, que actúa como fuente de infección. Un solo gramo de placenta de rumiante posee unas 10⁸ dosis infectantes para el hombre del agente causal de la fiebre Q (Babudieri, 1959; Marrie, 1990a; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Lógicamente, datos como estos ayudan a explicar la estacionalidad de la enfermedad en humana ligada a las épocas de partos, sobre todo cuando los casos observados en las poblaciones humanas se asocian temporalmente a las épocas de partos en pequeños rumiantes (Maurin y Raoult, 1999).

A esto hemos de añadir que, los ungulados domésticos portadores de *C. burnetii*, principal reservorio de la enfermedad en estrecho contacto con las poblaciones humanas, se mantienen largos periodos de tiempo como portadores

excretores tras los partos. En este sentido, hemos de destacar la eliminación de *C. burnetti* por la leche, la cual es especialmente importante en los ganados vacuno y caprino, y que puede contaminar el tracto digestivo de los lactantes, pudiendo convertir a éstos en portadores eliminadores de la bacteria en heces (Berri y cols., 2001; Rodolakis y cols., 2007).

La capacidad de persistencia en el medio de este agente logra que se mantenga su capacidad infectiva más de 2 semanas en los aerosoles y más de 5 meses en los suelos contaminados (Lennette y Welsh, 1951; Welsh y cols., 1957). Los diferentes mecanismos de eliminación de *C. burnetii* al medio logran que puedan contaminarse distintos tipos de fómites, incluida la lana y pieles de los animales, vestimentas y calzado (Babudieri, 1959; Woldehiwet, 2004), pudiendo comportarse estos materiales como fómites vehiculadores de la infección. Esta propiedad de *C. burnetii* explica los brotes epidémicos de fiebre Q asociados a las industrias cárnicas y peleteras y, a la manipulación de productos de origen vegetal contaminados (Rehacek, 1987), además de poder explicar aquellos casos de fiebre Q humana en los que no se ha detectado una relación clara con ningún factor de riesgo conocido de la enfermedad (Marrie, 1990a).

En cualquier caso, y a pesar de la gran capacidad de colonización del medio externo por parte de *C. burnetii*, lo cierto es que, la fiebre Q en las poblaciones humanas está ligada con mayor importancia a las zonas rurales y, en el caso de ciertos brotes epidémicos, ligada a zonas cercanas a mataderos, industrias peleteras o bien, a zonas donde se han manipulado determinadas materias primas contaminadas con la bacteria (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999). Por otra parte, si bien el viento y las precipitaciones se han mostrado como factores que influyen en la diseminación y en la aparición de la fiebre Q (Tissot-Dupont y cols., 2004), lo cierto es que la mayor frecuencia de presentación de enfermedad en humana se asocia, como se ha dicho, a ambientes donde la fuente de contaminación se asocia a la presencia de animales infectados que contaminan en el medio. Incluso, la mayoría de los casos de fiebre Q humana detectados en las poblaciones urbanas (sin contacto cotidiano con animales infectados o zonas contaminadas) se han asociado al contacto esporádico con animales infectados o con zonas contaminadas (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999; Escudero Nieto y cols., 2006). Este es otro indicio más de la importancia de la vía aerógena en la transmisión de la fiebre Q en la naturaleza en contraste con la sospecha controvertida de que la fiebre Q pueda ser transmitida vía oral.

La transmisión por vía oral, principalmente asociada a la ingesta de leche cruda y de otros productos lácteos sin pasteurizar, ha sido descrita como probable por algunos autores, que la describen como una vía de transmisión minoritaria frente a la vía aerógena (Benson y cols., 1963; Krumbiegel y Wisniewski, 1970; Fishbein y Roul, 1992). Lo cierto es que, no se ha podido probar hasta ahora que realmente *C. burnetii* sea capaz de producir la fiebre Q vía oral. Lo más cercano a la demostración experimental de una infección por *C. burnetii* vía oral ha sido la aparición de seroconversión, que no de signos clínicos, en individuos que ingirieron leche cruda contaminada con *C. burnetii* (Benson y cols., 1963). De hecho, en otro modelo experimental con gatos, los animales infectados vía oral no mostraron la enfermedad, mientras que los gatos infectados vía subcutánea, mostraron fiebre y letargia (Gillespie y Baker, 1952).

Una vía de transmisión que sí se ha podido probar experimentalmente es la transmisión percutánea de la fiebre Q (Eklund y cols., 1947; Gillespie y Baker, 1952), aunque se sugiere que es bastante improbable en la naturaleza. Sin embargo, en los rumiantes domésticos, cortes profundos contaminados con *C. burnetii* proveniente del medio externo podrían producir la enfermedad, sobre todo en hembras preñadas. De hecho, en un estudio experimental realizado con cabras inoculadas subcutáneamente con dosis infectantes situadas entre 10^6 y 10^8 coxiellas, produjo abortos en todos los animales inoculados (Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2003).

Otro mecanismo de transmisión en rumiantes domésticos, no estudiado aún, sería la posible transmisión de la enfermedad mediante el ordeño mecánico. Se ha observado que *C. burnetii* es capaz de producir mamitis en vacas, fenómeno que es probable que se dé también en las ovejas, pero sobre todo en las cabras, por su patrón de eliminación de *Coxiella* en leche más continuo (Barlow y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007). Por tanto, no es descartable que el ordeño mecánico pueda favorecer la transmisión de la enfermedad mediante la contaminación de heridas producidas por microtraumatismos provocados por sobreordeño, o bien, por reflujo de leche contaminada a las cisternas mamarias de hembras libres de enfermedad, sobre todo en hembras preñadas, las cuales parecen más susceptibles de contraer la enfermedad (Babudieri, 1959; Buxadé y cols., 1996).

Otra vía de transmisión que se ha podido demostrar experimentalmente mediante un modelo animal con ratones es la transmisión sexual (Kruszewka y Tylewska-Wierbanowska, 1992). También se ha podido observar la presencia de *C. burnetii* en semen de toro (Kruszewka y Tylewska-Wierbanowska, 1996).

Centrándonos ahora en las poblaciones humanas, otras vías de transmisión de la fiebre Q muy improbables serían el contacto persona a persona, dentro de la cual, tendríamos el contacto con mujeres parturientas infectadas durante la asistencia al parto (Raoult y Stein, 1994), la vía transplacentaria resultando en una infección congénita (Stein y Raoult, 1998) y durante autopsias de enfermos de fiebre Q (Harman y Camb, 1949; Marmion y Stoker, 1950). Sin embargo, no es necesario el aislamiento de los pacientes de fiebre Q en los hospitales (Grant y cols., 1985), simplemente se tendrá en cuenta el estado del enfermo a la hora de su manipulación y se extremarán las precauciones a la hora de realizar las autopsias de dichos enfermos (Ormsbee, 1972). Otras vías de transmisión descritas serían la intradérmica y las transfusiones de sangre contaminada con *C. burnetii* (Maurin y Raoult, 1999).

Como se ha visto en el capítulo anterior de epidemiología descriptiva, la mayor parte de los trabajos sobre epidemiología de la fiebre Q están basados en observaciones relacionadas sobre el ciclo doméstico de la enfermedad, es decir, observaciones relacionadas sobre el comportamiento de la enfermedad en las poblaciones de rumiantes domésticos y en las poblaciones humanas. Sin embargo, la fiebre Q tiene un amplio espectro de hospedadores en la naturaleza (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999) y un ciclo salvaje que, a su vez, puede relacionarse con el ciclo doméstico debido a la práctica de la ganadería extensiva o a la existencia de hospedadores de la enfermedad que pueden actuar como nexos de ambos ciclos de la enfermedad, etc.

De hecho, se cree que palomas portadoras de *C. burnetii* introdujeron la enfermedad en Irlanda del Norte (Pratt, 1983). En este sentido, en un estudio realizado en Japón (To y cols., 1998), se observó mediante serología en una muestra de aves domésticas y salvajes, que fueron positivas el 2% y el 19% respectivamente. Además, se demostró la presencia de la bacteria y se comprobó la capacidad infectante de las cepas existentes en cinco cuervos de la jungla (*Corvus macrorhynchos*) que se mostraron positivos a la serología, mediante la inoculación de suero de estos animales en ratones de laboratorio. En este estudio se observó que las aves que habitaban y/o se alimentaban en zonas próximas a rebaños infectados presentaban una mayor seroprevalencia. Por tanto, éste podría ser un ejemplo de especies que podrían funcionar de nexo entre los ciclos salvaje y doméstico de la fiebre Q.

Otros ejemplos de estudios sobre el ciclo salvaje de la fiebre Q son los estudios realizados en la familia *Cervidae*. En este sentido, en un estudio serológico llevado a cabo en España, se observó una seroprevalencia global del 15.4% en las poblaciones de corzo común y del 5.6% en las de ciervo rojo (Ruíz-Fons y cols., 2008). En Canadá (Marrie y cols., 1993), se detectó una seroprevalencia del 16.5% en una población de alces (*Alces Alces*) y del 1.5% en una población de ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), mientras que en Japón, se observó una seroprevalencia del 69% para el ciervo de Hokkaido (*Cervus nippon yesoensis*) y del 56% en el ciervo japonés (*Cervus nippon centralis*) (Ejercito y cols., 1993). Estas y otras especies de rumiantes salvajes han de suponer un importante reservorio de la enfermedad en la naturaleza y se ha observado que las garrapatas que parasitan a estos animales en España son comunes para las diferentes especies de ungulados salvajes (Ruiz-Fons y cols., 2008). Luego, una vez más, vemos la importancia de estos artrópodos en el mantenimiento la infección en la naturaleza, si bien, se ha demostrado que no son imprescindibles para la perpetuación de la enfermedad en el ciclo doméstico (Marrie, 1990a; Maurin y Raoult, 1999).

Adicionalmente, se ha observado la importancia de los gatos en la propagación de la enfermedad en las poblaciones humanas. En Canadá se ha postulado que es probable que las gatas parturientas, fuentes de infección para las poblaciones humanas, se infecten por medio de su contacto con poblaciones de ratones de zonas donde existe la enfermedad (Marrie y cols., 1985). De hecho, existen estudios como los desarrollados en Reino Unido y en el norte de España (País Vasco) en el que se demuestra que estas especies también se comportan como hospedadores de *C. burnetii* (Webster y cols., 1995; Barandika y cols., 2007).

La importancia de estas especies como reservorios de la enfermedad para las poblaciones humanas y de rumiantes domésticos queda por ser determinada. No hay que olvidar las diferencias de virulencia observadas entre diferentes aislamientos de *C. burnetii* según su origen, tratadas en el apartado de factores asociados al agente causal, en el capítulo de epidemiología descriptiva (Syruczek y cols., 1958; Babudieri, 1962; Dařter y Gromova, 1970; Pautov, 1973; Martinov y cols., 1989; Kazár y cols., 1993; Kocianová y cols., 1993; Literák y Calvo Rodríguez, 1994; Literák y Kroupa, 1998; Kocianová y cols., 2001). La incursión de nuevas cepas en medios en los que no son habituales, sobre todo cuando la incursión se produce desde el ciclo salvaje al ciclo doméstico, pueden contribuir a la importancia de la enfermedad y a la producción de brotes epidémicos.

2.7.4. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA FIEBRE Q

Como se ha visto anteriormente, la fiebre Q es una enfermedad de distribución prácticamente mundial, cuyo agente causal goza de una amplia gama de hospedadores en la naturaleza, que mantienen la enfermedad en su ciclo salvaje y doméstico, además de contar con una capacidad de resistencia en el medio externo importante (Maurin y Raoult, 1999; Woldehiwet, 2004; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Esto hace que la erradicación de este tipo de enfermedad, incluso en territorios insulares con relativa poca extensión y una limitada fauna silvestre, como es el caso del Archipiélago Canario, sea una tarea realmente difícil, por no decir imposible con los medios y la tecnología actual. Por tanto, en otros territorios donde la enfermedad es endémica y además existe un importante número de especies silvestres que pueden actuar como reservorios de la enfermedad en su ciclo salvaje, el pensar en planes de erradicación de la fiebre Q es, probablemente, una utopía (Martin y cols., 1997). Por tanto, lo más lógico es dedicar los esfuerzos a tomar medidas orientadas al control de la enfermedad en los territorios afectados y, en este sentido, las mismas deben de orientarse, en la medida de lo posible y principalmente, a evitar la contaminación ambiental por *C. burnetti*.

Un eje fundamental en el control de la fiebre Q es la actuación con respecto a las poblaciones de ungulados domésticos. En este sentido, el control de los ectoparásitos es una práctica a tener muy en cuenta, máxime cuando los animales están en régimen extensivo. Este tipo de tratamientos evita no solo el contagio, sino, que además, evita el trasiego de distintas cepas de *C. burnetii* entre diferentes poblaciones animales, evitando también el consecuente riesgo de aumento de virulencia de las cepas (Maurin y Raoult, 1999; Woldehiwet, 2004).

A su vez, tendríamos la importancia del manejo y del diseño de las instalaciones en las producciones de rumiantes en el control de la fiebre Q. En cuanto al manejo, la lotificación de los ganados, separando a las hembras gestantes, con el fin de controlar mejor los partos, pudiendo eliminar así, gran cantidad de material altamente infectante, como es el caso de las placentas, mediante la intensificación de las tareas de limpieza y desinfección en esta etapa de la producción, la realización de vacíos sanitarios en los diferentes corrales de la explotación que permitan una correcta desinfección de las instalaciones con productos efectivos durante el tiempo necesario para garantizar la eficacia de los mismos y, el tener una enfermería que permitiera el aislamiento y tratamiento de animales con enfermedad clínica manifiesta, son algunas de las medidas que, si bien suponen un mayor coste

económico para las explotaciones, éste se puede ver recompensado por la disminución de las pérdidas generadas por ésta y otras enfermedades (Buxadé y cols., 1996; Polydorou, 1985). En Chipre, medidas como la destrucción de placentas y de restos de abortos, el aislamiento de las hembras sospechosas de estar infectadas y la desinfección de las instalaciones, lograron una fuerte disminución de las prevalencias observadas en los ganados ovino y caprino de este país (Polydorou, 1985).

En este sentido, es interesante resaltar la importancia del tratamiento del estiércol con vistas a su utilización para la agricultura. Una vez éste se ha recogido y almacenado, resulta conveniente cubrirlo y realizar tratamientos como el compostaje o la aplicación de cianamida al 0.4%, evitando en la medida de lo posible, la exposición del mismo a corrientes de aire que puedan crear peligrosos aerosoles de cara al contagio de la enfermedad (Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

En cuanto al diseño de las explotaciones, un correcto dimensionamiento unido a prácticas respetuosas con el bienestar animal evitarían un estrés que se restaría al ya, de por sí mismo, estresante ritmo de producción al que se somete a estos animales (sobre todo en las explotaciones en régimen intensivo). Por otra parte, un buen diseño de las zonas cubiertas de las explotaciones, orientado a evitar temperaturas extremas y a crear una buena ventilación que promueva una conveniente renovación del aire en su interior, sin la creación de corrientes de aires excesivas, debería traducirse en una reducción de las infecciones respiratorias y, por ende, en una disminución de la probabilidad de infección por *C. burnetii* (Buxadé y cols., 1992; Martin, 1997).

Otra medida de actuación complementaria a las ya citadas hasta ahora es la vacunación contra la fiebre Q. Se menciona como complementaria, porque, como es lógico, esta medida por sí sola tendrá un rendimiento menor que si se aplica conjuntamente con el resto de medidas anunciadas, las cuales, promueven un ambiente de menor estrés, de menor contaminación ambiental y por tanto, promueven una mejor reacción vacunal. Se han probado en animales hasta la fecha diversas vacunas, habiéndose mostrado como más efectiva la vacuna inactivada de *C. burnetii* en fase I. De hecho, la vacuna inactivada de *C. burnetii* en fase II se mostró 100 veces menos efectiva que la de fase I en un modelo experimental animal llevado a cabo con ratones (Gajdosova y cols., 1994).

La mencionada vacuna consiste en un preparado antigénico altamente purificado a partir de la cepa Nine Mile en fase I (con entre 2 y 6 pases en embriones

de pollo), tras su inactivación con formaldehído. En un estudio orientado a comprobar su eficacia en cabras preñadas, se demostró la mayor eficacia de la vacuna en fase I que en fase II, demostrándose la notable capacidad de la primera para prevenir abortos y disminuir considerablemente la eliminación de *C. burnetii* por la leche, secreciones vaginales y en heces (Arricau-Bouveri y Rodalakis, 2005).

Sin embargo, uno de los problemas del uso de esta vacuna en las ganaderías de ruminantes consiste en el aumento de eliminación al medio del agente causal que provoca en los rebaños y animales que ya tienen la enfermedad. Por ello, algunos autores recomiendan el uso de esta vacuna en rebaños libres de enfermedad o en animales adultos no infectados, inmunizando a los animales jóvenes en los años sucesivos hasta lograr inmunizar a la totalidad de los animales que componen el rebaño (Krauss, 1989). De hecho, en un estudio realizado en vacas, en el que se ha probado los efectos de esta vacuna, se observó que las hembras que se vacunaban sin preñar tenían una probabilidad de convertirse en portadoras excretoras de *C. burnetii* cinco veces menor que las hembras que se vacunaban preñadas, las cuales tenían la misma probabilidad de convertirse en portadoras excretoras que las vacas a las que se administraba un placebo (Guatteo y cols., 2008).

Una actuación alternativa a la hora de aplicar esta vacuna a la totalidad de los animales en los ganados infectados podría ser la combinación de un tratamiento antibiótico, conjuntamente con la aplicación de la vacuna, al total de animales de la granja, en el agua de bebida, de tetraciclinas (8 mg/kg durante varias semanas) o bien mediante aplicaciones de fármacos de larga acción inyectables en momentos puntuales de la gestación. La aplicación de terramicina de larga acción o LAT®, a los 105 y 120 días de gestación ha sido probada en ovejas con buenos resultados. La aplicación de este tipo de tratamientos se ha observado que disminuye drásticamente la eliminación de *C. burnetii* al medio en el ganado afectado por la enfermedad, además de disminuir el número de abortos. Esta alternativa se trata, sin duda, de una medida más agresiva, pero su uso puntual al inicio de la puesta en práctica del plan vacunal, podría evitar el riesgo de aumentar la eliminación de *C. burnetii* al medio tras las primeras vacunaciones en animales infectados y/o portadores, pudiendo además, disminuir el número de portadores eliminadores de cara a la siguiente paridera, contribuyendo a que los animales enfermos no se debiliten en exceso por la acción de la vacuna y, estaría especialmente indicado, en los brotes epidémicos de la enfermedad que conllevaran aparejadas grandes pérdidas económicas para los productores (Behymer y cols., 1977; Berri y cols., 2005; Berri y cols., 2007).

Sin embargo, en otro estudio más reciente realizado en ovejas pertenecientes a un ganado con alta seroprevalencia en el País Vasco, España, se pudo apreciar cómo la aplicación de un tratamiento con oxitetraciclina consistente en dos aplicaciones durante el periodo de gestación (concretamente a los 100 y 120 días) no logró disminuir la eliminación de *C. burnetii* al medio externo en la leche, heces y fluidos vaginales en los animales tratados, no obteniéndose diferencias considerables con un grupo de animales no tratados que actuaron como control de la experiencia (Astobiza y cols., 2010).

En cualquier caso, no existen hasta la fecha datos comparativos de coste-beneficio que permitan evaluar las ventajas de efectuar una estrategia selectiva respecto a una estrategia no selectiva a la hora de vacunar a ganados positivos a fiebre Q (Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2008), si bien, hay que evaluar también el riesgo de cara a la salud pública que supondría la aplicación de una estrategia no selectiva ya que, en Francia por ejemplo, se ha descrito la aparición de un brote de fiebre Q humana asociado al contacto con animales vacunados contra la enfermedad (Fishbein y Raoult, 1992).

Sin duda, la realización de actuaciones encaminadas a reducir las tasas de presencia de esta enfermedad se rentabilizará en la mayoría de las zonas donde ésta es endémica gracias a la disminución de las pérdidas producidas por la enfermedad en las producciones ganaderas afectadas, lo cual redundará en un beneficio en materia de Salud Pública sin necesidad de aplicar planes de vacunación, por ejemplo, a la totalidad de las poblaciones humanas rurales, las cuales son las más afectadas por la enfermedad (Garner y cols., 1997). Ya se ha mencionado cómo en Eslovenia, se ha observado una considerable disminución en las tasas de enfermedad tanto en las poblaciones humanas como animales, tras llevar a cabo un plan de vacunación a escala nacional en el ganado durante más de diez años y mediante un control veterinario del programa y de los movimientos de animales en el país (Serbezov y cols., 1999). Además, este tipo de planes de vacunación son perfectamente monitorizables mediante técnicas como la PCR, ya que, por ejemplo, nos permite evaluar de manera sencilla, el grado de eliminación de *C. burnetii* al medio mediante el análisis de muestras de leche extraídas directamente del animal o bien en el tanque de frío, así como en muestras de fluidos vaginales y heces (Berri y cols., 2000; Barlow y cols., 2007).

En cuanto a los perros y gatos, no se han descrito hasta ahora actuaciones de tipo preventivo contra esta enfermedad, a pesar de haberse demostrado que en determinadas regiones endémicas se ha asociado a brotes epidémicos de fiebre Q humana a estas especies (Marrie, 1990a). En cualquier caso, es probable que la disminución de las tasas de enfermedad en las poblaciones de ungulados domésticos, fruto de la aplicación de las medidas desarrolladas anteriormente, contribuya indirectamente a disminuir las tasas de presencia de esta enfermedad en estos animales (Kocianová y cols., 1992).

En cuanto a las poblaciones humanas, los esfuerzos por mejorar el diagnóstico clínico de la enfermedad, ya que un amplio número de casos no son diagnosticados debido a la inespecificidad de sus síntomas que no permiten un diagnóstico diferencial sencillo, así como el control serológico periódico en las zonas donde la enfermedad es endémica, se hacen necesarios como herramientas orientadas a valorar la evolución de la repercusión de la implantación de planes de prevención y control, tanto en las poblaciones humanas como en las poblaciones animales (Maurin y Raoult, 1999).

En cuanto a la prevención mediante vacunación en las poblaciones humanas, la vacuna contra *C. burnetii* (también en fase I) ha sido utilizada con éxito en personal de riesgo en Australia desde 1989. Su uso no se recomienda en individuos que presenten seroconversión o en aquellos de los que se sospeche que han sido expuestos a la bacteria previamente a su inmunización (Marmion y cols., 1990).

Respecto al tratamiento de la enfermedad aguda en el hombre, antibióticos como la doxiciclina, el cloranfenicol, la clorotetraciclina, la eritromicina (efectiva en procesos neumónicos agudos por *C. burnetii*) y la rinfampicina, se han mostrado eficaces (Marrie 1996; Yeaman y Baca, 1990). En un estudio más reciente en el que se utilizó una técnica de PCR a tiempo real para la comprobación de la eficacia de los antibióticos sometidos a prueba, se mostraron eficaces la doxiciclina, la fluorquinolona y la rifampicina, siendo el macrólido más eficaz contra *C. burnetii* la telitromicina (Boulos y cols., 2005).

En el caso de la fiebre Q crónica humana, se recomienda el tratamiento prolongado con al menos 2 antibióticos con diferentes mecanismos de acción. Un ejemplo de este tipo de terapias que se llevó a cabo con éxito con ocho pacientes de fiebre Q crónica fue la combinación de tetraciclina y cotrimoxazol durante dos años, si bien, hay autores que recomiendan el tratamiento de la enfermedad crónica de por

vida. Asimismo, pueden ser necesarias intervenciones quirúrgicas en pacientes en los que haya que reemplazar válvulas cardíacas debido a la acción de la bacteria (Marrie, 1990a). Otra terapia propuesta para este tipo de pacientes es la combinación de doxiciclina con hidrocloroquina durante un periodo de tiempo estimado entre 18 y 36 meses (Rolain y cols., 2003).

Por otro lado están las investigaciones sobre la securinina, un agonista de los receptores GABAA de los macrófagos, que al igual que los agonistas para los receptores TLR de los macrófagos, fomentan la internalización y destrucción de *C. burnetii* en estas células defensivas. Este principio activo se ha observado que no es excesivamente tóxico en experiencias *in vivo*, con lo cual, la securinina o compuestos de similares características podrían utilizarse en el futuro como adyuvante que mejorara la resistencia del hospedador ante los patógenos intracelulares (Lubick y cols., 2007).

En cuanto a la utilización de desinfectantes para instalaciones, fómites y personal, resulta de interés mencionar que *C. burnetii* se ha mostrado resistente ante desinfectantes como el lisol (5%), o la formalina al 5%, mientras que ha logrado ser desactivado ante la exposición al etil-alcohol (70%), cloroformo (5%) y a preparaciones comerciales a base de combinaciones de amonios cuaternarios como el producto denominado Enviro-Chem (5%). Asimismo, el formaldehído se ha mostrado eficaz cuando se aplica logrando una humedad ambiental del 80%. Además, la irradiación con ondas gamma se ha mostrado efectiva tanto para la atenuación como para la esterilización de muestras biológicas (Scott y Williams, 1990). Por último, la pasterización a una temperatura de 67.1 °C durante 20 minutos logra eliminar a las coxiellas de la leche tratada, mientras que un tratamiento térmico a 80 °C durante 1 hora logra eliminarla de una dilución acuosa (Enright y cols, 1957).

Material y métodos

3. MATERIAL Y MÉTODOS

“Exígete mucho a ti mismo y espera poco de los demás. Así te ahorrarás disgustos”

Confucio

3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (Trans-qPCR) PARA LA DETECCIÓN DE *Coxiella burnetii*

Se llevó a cabo la estandarización de una técnica de PCR a tiempo real basada en la aplicación de los cebadores diseñados por Houver y colaboradores en 1992, para su utilización a tiempo final.

De esta manera, se procedió a adaptar una PCR, denominada Trans-PCR por ser su molécula diana un transposón específico para dicha bacteria, que se había mostrado altamente sensible y específica (Berri y cols., 2000; Rodolakis y cols., 2007) en su uso como PCR de producto final a su uso como PCR a tiempo real. A continuación se procede a describir el proceso de puesta a punto de esta técnica.

3.1.1. EVALUACIÓN DEL ADN CONTROL POSITIVO DE *Coxiella burnetii*

El ADN control positivo fue cedido por la Dra. **Nathalie Arricau Bouveri**, investigadora perteneciente en aquel momento al equipo formado para el estudio de las clamidiosis y de la fiebre Q de la Unidad de Patología Infecciosa e Inmunología del Instituto INRA TOURS-NOUZILLY, Francia. Dicho control consistía en una muestra altamente concentrada de ADN extraído a partir de un concentrado inicial de una cepa de referencia de *C. burnetii* (cepa Nine Mile) de concentración desconocida. Las recomendaciones de la Dra. N. A. Bouvery eran que utilizáramos dicho control a diluciones de \log^{-3} o \log^{-4} .

Se realizó una evaluación de la sensibilidad de la prueba a utilizar en el presente estudio, para lo cual, se procedió a determinar la concentración de ADN presente en la dilución madre utilizando la técnica de la espectrofotometría y siguiendo el siguiente protocolo:

- Encendido del espectrofotómetro (SmartSpec® 3000, BIORAD) con media hora de antelación a la realización de las medidas con el fin de lograr una correcta preparación y estabilización del mismo.

- Se utilizaron cubetas de cuarzo estériles para realizar la medida.
- Realización de medidas a 260 nm de longitud de onda (λ): Primero se llevó a cabo la lectura del blanco o muestra de 50 μ l de solución TE (su elaboración se verá en el apartado del protocolo de extracción de ADN). Tras la lectura del blanco se realizaron 4 lecturas de una muestra compuesta por 5 μ l de la solución madre a utilizar como control positivo más 45 μ l de solución TE.
- Realización de cálculos de concentración de ADN en función de las medidas obtenidas tras el análisis: $[\text{ADN}] = 2,5 \mu\text{g de ADN/ml} \times (\text{media aritmética de los resultados de las medidas, tras analizarlas por triplicado} \times 100)$.
- Realización del cálculo de la equivalencia entre concentración de ADN encontrada y concentración bacteriana: el peso molecular aproximado del genoma de la cepa Nine Mile de *C. burnetii* es de $1,04 \times 10^9$ daltons, es decir, $1,761 \times 10^{-9} \mu\text{g}$ (Myers y cols., 1980). Luego la concentración bacteriana de la que proviene la solución madre de ADN vendría dada por la fórmula $[\text{bacteriana}] = [\text{ADN}] / 1,761 \times 10^{-9}$ bacterias/ml.

3.1.2. CEBADORES

Los cebadores utilizados en este estudio han sido descritos previamente por Houver y colaboradores (1992) y son complementarios a un transposón del genoma de *C. burnetii*. Las secuencias de estos cebadores son las siguientes:

Trans 1: (5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3')

Trans 2: (5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3')

Estos cebadores fueron fabricados por SIGMA-GENOSYS, Ltd. y se utilizaron a una concentración de 1 μ M.

3.1.3. Trans-PCR A TIEMPO FINAL

Preparación de las muestras

El protocolo seguido para la preparación de las muestras en este caso fue el siguiente:

Muestras positivas: 1 μ l del cebador Trans 1 + 1 μ l del cebador Trans 2 + 3 μ l del ADN + 20 μ l de agua ultrapura + 1 perla con el resto de reactivos necesarios para la reacción en cadena la polimerasa (Ilustra®, Pure Taq Ready-to-go beads).

Muestras de control negativas: 1 μ l del cebador Trans 1 + 1 μ l del cebador Trans 2 + 23 μ l de agua ultrapura + 1 perla con el resto de reactivos necesarios para la reacción en cadena la polimerasa (Ilustra[®], Pure Taq Ready-to-go beads).

Protocolo de PCR

El protocolo que se utilizó para la realización de la PCR de punto final, en un termociclador modelo "MASTER CYCLER GRADIENTE" (fabricado por Eppendorf[®]), fue el siguiente (Berri y cols., 2000):

- **CICLO 1 (1 repetición):** paso 1: 95 °C - 02:00 minutos.
- **CICLO 2 (40 repeticiones):** paso 1: 95 °C - 00:30 minutos; paso 2: 61 °C - 00:30 minutos; paso 3: 72 °C - 01:00 minutos.
- **CICLO 3 (1 repetición):** paso 1: 95 °C - 00:30 minutos.
- **CICLO 4 (1 repetición):** paso 1: 4 °C y mantenimiento en refrigeración a esta temperatura de las muestras amplificadas.

Preparación del gel de agarosa

Los geles de agarosa al 1,5% se elaboraron partiendo de una dilución de 0,375 gr de agarosa en 25 ml de TAE 1X (su elaboración se describirá más adelante). Se calentó y agitó dicha solución con el fin de lograr una correcta dilución de la agarosa en el TAE 1X, para posteriormente verterla en un soporte para geles diseñado para electroforesis, y se colocó el peine correspondiente.

Una vez los geles solidificaron convenientemente, se procedió a preparar las muestras añadiendo a cada pocillo 1 μ l de tampón de carga (BIORAD[®]) + 5 μ l de ADN amplificado de cada una de las muestras de las diluciones seriadas. Con el fin de comprobar el peso molecular de los productos de ADN obtenidos tras la amplificación, se procedió a rellenar un pocillo con 2 μ l de un marcador de pesos moleculares comercial (MWM XIV, Roche[®]) + 3 μ l de TE PH 8 (su elaboración se describirá más adelante)+ 1 μ l de tampón de carga.

Electroforesis

Una vez cargado el gel con las muestras y el marcador de peso molecular, se introdujo en una cubeta diseñada para la electroforesis en gel, utilizando como

solución líquida conductora de la electricidad la cantidad de TAE 1x indicada por el fabricante de dicho aparato. Acto seguido, se conectó a la cubeta una fuente regulable de alimentación de corriente eléctrica, siendo regulado el voltaje a valores comprendidos entre 120 - 150 voltios y el tiempo de exposición de 20 a 30 minutos.

Visualización del producto de la PCR

Una vez terminada la migración de las muestras por el gel, se procedió a teñir el gel resultante con una dilución de bromuro de etidio en TAE 1x (3 µg/ml), en suficiente cantidad este último como para cubrir el gel y teñirlo. Las bandas obtenidas según el peso molecular de los productos amplificados visibles en las muestras positivas se detectaron y fotografiaron utilizando un transiluminador emisor de luz ultravioleta (Universal Hood II-S.N., 765/01274, BIORAD®).

3.1.4. Trans-PCR A TIEMPO REAL (Trans-qPCR)

El termociclador utilizado para realizar las PCRs a tiempo real fue el modelo MyiQ® (Biorad).

Preparación de las muestras de control:

Las muestras del ADN control positivo para la Trans-PCR a tiempo real se prepararon de la siguiente manera: Se tomaron 5 µl de muestra del ADN control positivo a una dilución de \log^{-3} + 1 µl de la dilución del cebador Trans 1 + 1 µl de la dilución del cebador Trans 2 + 12,5 µl de la dilución comercial SYBER Green® + 5,5 µl de agua ultrapura.

Asimismo, se utilizó como control negativo de la prueba la siguiente mezcla: 1 µl de la dilución del cebador Trans 1 + 1 µl de la dilución del cebador Trans 2 + 12,5 µl de la dilución comercial SYBER Green® + 10,5 µl de agua ultrapura.

Los 25 µl de las muestras se añadieron a pocillos de placas de PCR a tiempo real (Biorad). Todas las manipulaciones fueron realizadas en un ambiente controlado, en el interior de una cámara de flujo vertical, manteniendo las muestras y los reactivos en frío durante su manipulación. Una vez se sellaron correctamente dichos pocillos, se procedió a introducir las muestras en el termociclador y se aplicó el protocolo de ciclos de temperatura y tiempo que se muestra a continuación.

Protocolo de ciclos de temperatura y tiempo seguido para la amplificación de las muestras de ADN problema:

- **CICLO 1 (1 repetición):** paso 1: 95 °C - 02:00 minutos.
- **CICLO 2 (40 repeticiones):** paso 1: 95 °C - 00:30 minutos; paso 2: 61 °C - 00:30 minutos; paso 3: 72 °C - 01:00 minutos. Recolección de datos habilitada.
- **CICLO 3 (1 repetición):** paso 1: 95 °C - 00:30 minutos.
- **CICLO 4 (1 repetición):** paso 1: 55 °C - 01:00 minutos.
- **CICLO 5 (66 repeticiones):** paso 1: 65 °C - 00:10 minutos. Incremento de la temperatura inicial tras el ciclo 2 en 0,5 °C. Recolección de datos, obtención de la curva y análisis de la temperatura de fusión activados.
- **CICLO 6 (1 repetición):** paso 1: 4 °C y mantenimiento en refrigeración a esta temperatura de las muestras amplificadas.

3.1.5. CURVA PATRÓN (RELACIÓN ENTRE CICLO UMBRAL Y CONCENTRACIÓN DE ADN DE *Coxiella burnetii* EN LA MUESTRA)

Tras conocer la concentración de ADN de la solución madre y, por extrapolación, la concentración bacteriana de la que fue extraída de dicho ADN, se procedió a calcular una curva patrón a partir del análisis mediante la PCR a tiempo real de 10 diluciones seriadas de la primera solución. Dichas diluciones se encontrarían en el intervalo que va de \log^0 a \log^{-9} . De esta manera se obtuvieron los datos de ciclo umbral para las diferentes diluciones o concentraciones de ADN.

Se procedió a realizar la PCR a tiempo real directamente sobre diluciones seriadas del control positivo del ADN de *C. burnetii*.

Tras la realización de este ensayo, se procedió a realizar un estudio de regresión lineal con los resultados obtenidos, con el fin de diseñar una recta patrón o estándar que nos permitiera relacionar el ciclo umbral de una muestra problema que contuviera la cepa Nine Mile con la concentración de ADN de dicha cepa y por lo tanto, con la concentración bacteriana de dicha muestra. El ciclo umbral se define como aquel ciclo de la amplificación de una muestra de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, a partir del cual, se estima que se ha sobrepasado el nivel de producción de fluorescencia necesario para que la muestra se considere positiva.

Preparación de las muestras:

- Se procedió a realizar las diluciones seriadas (log 0 a log -9) introduciendo las diferentes diluciones en sendos recipientes tipo Eppendorf de 25 μ l previamente autoclavados. Las diluciones contaban con un volumen total de 10 μ l y se utilizó como diluyente una solución amortiguadora TE.

- Posteriormente se procedió a preparar las muestras para la PCR a tiempo real de cada una de las diluciones seriadas. Para ello se tomó 5 μ l de muestra de cada dilución seriada + 1 μ l de la dilución del cebador Trans 1 + 1 μ l de la dilución del cebador Trans 2 + 12,5 μ l de la dilución comercial SYBER Green® + 5,5 μ l de agua ultrapura.

- Asimismo, se procedió a realizar una dilución que se utilizaría como control negativo de la prueba: 1 μ l la dilución del cebador Trans 1 + 1 μ l de la dilución del cebador Trans 2 + 12,5 μ l de la dilución comercial SYBER Green® + 10,5 μ l de agua ultrapura.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

- **CICLO 1 (1 repetición):** paso 1: 95 °C - 02:00 minutos.
- **CICLO 2 (45 repeticiones):** paso 1: 95 °C – 00:30 minutos; paso 2: 61 °C – 00:30 minutos; paso 3: 72 °C – 01:00 minutos. Recolección de datos habilitada.
- **CICLO 3 (1 repetición):** paso 1: 95 °C – 00:30 minutos.
- **CICLO 4 (1 repetición):** paso 1: 55 °C – 01:00 minutos.
- **CICLO 5 (66 repeticiones):** paso 1: 65 °C – 00:10 minutos. Incremento de la temperatura inicial tras el ciclo 2 en 0,5 °C. Recolección de datos, obtención de la curva y análisis de la temperatura de fusión activados.
- **CICLO 6 (1 repetición):** paso 1: 4 °C y mantenimiento en refrigeración a esta temperatura de las muestras amplificadas.

3.1.6. CÁLCULO DEL ÍNDICE DE CORRELACIÓN ENTRE EL CICLO UMBRAL OBSERVADO Y EL ESPERADO.

El programa estadístico utilizado para calcular el índice de correlación fue el IBM SPSS Statistics 20 Win 32.

3.1.7. ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN

Se analizaron los resultados obtenidos de la temperatura de fusión ("melting temperature") de las diferentes diluciones utilizadas. Este análisis se completó con el estudio de la temperatura de fusión realizado para las muestras de campo (más información sobre las muestras en el apartado 3.2).

A todas las muestras positivas se les exigió un requisito mínimo a cumplir en cuanto al parámetro $-d(\text{RFU})/dT$ que relaciona la temperatura con la emisión de fluorescencia (todas las muestras positivas tienen un valor para este parámetro superior a 50).

3.1.8. COMPARACIÓN DE LA Trans-PCR A TIEMPO REAL Y FINAL

Una vez realizada la PCR a tiempo real de las diferentes diluciones seriadas de la solución madre de ADN, se procedió a repetir el análisis de las mismas muestras de forma convencional, con el fin de comparar los resultados de sensibilidad obtenidos con los que mostraba la PCR a tiempo real. De esta manera, hemos comparado la concentración mínima de ADN y/o bacteriana de *C. burnetii* que se puede detectar mediante la utilización de ambos métodos (a tiempo real y en análisis de punto final), en las condiciones experimentales detalladas anteriormente.

Para ello, se partió de las muestras previamente amplificadas en la PCR a tiempo real y, siguiendo el siguiente protocolo descrito anteriormente, se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa, tinción del ADN y visualización.

3.2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE *Coxiella burnetii* EN LA LECHE DE CABRA EN LA ISLA DE LANZAROTE

3.2.1. ANÁLISIS PREVIO DEL CENSO GANADERO CAPRINO DE LA ISLA DE LANZAROTE

Partiendo del censo oficial de la Consejería de Agricultura, Ganadería y Pesca de Canarias del subsector caprino de Lanzarote, se procedió a un estudio previo del mismo. En dicho estudio se estableció qué porcentaje de la población pertenecía a granjas con más de 100 cabezas (población diana de nuestro estudio). Debido a que se disponía del censo por explotación y se contaba con la localización municipal de las granjas, se procedió a dividir al total de granjas de más de 100 cabezas de la isla por municipios y a su vez, en tres estratos diferentes: de 100 a 300 cabezas; de más de 300 y menos de 500; de más de 500 cabezas. Tras esto se procedió a realizar un estudio municipal, donde se vio la distribución del censo entre los diferentes estratos así como la proporción de ganaderías pertenecientes a cada uno de los estratos y, se procedió a calcular el número medio de cabezas por granja de cada estrato y la media aritmética del municipio para dicha variable.

El número de cabezas por granja, así como los estratos, fueron tenidos en cuenta como factores de riesgo a la hora de realizar el estudio analítico de los datos obtenidos tras la realización del estudio de las muestras mediante la Trans-PCR a tiempo real para la detección de *C. burnetii*.

Para culminar con el estudio del censo por municipios, se tuvo en cuenta la distribución geográfica de las granjas diseñada en su momento por el doctor Pascual (1994), a la hora de realizar su estudio seroepidemiológico en el ganado caprino de la isla de Lanzarote. En dicha distribución se dividió a la isla en un total de cinco zonas que se correspondían con los siguientes municipios:

- ZONA NORTE: municipio de Haría.
- ZONA ESTE: municipios de Arrecife, San Bartolomé y Tías.
- ZONA CENTRO: municipio de Tegui.
- ZONA OESTE: municipio de Tinajo.
- ZONA SUR: municipio de Yaiza.

Tras la realización del mencionado estudio del censo por municipios, se estudió la realidad censal del subsector caprino en la totalidad de la isla de Lanzarote. Para ello, se

empezó haciendo una distribución del censo así como una distribución de las ganaderías por estratos de toda la isla para la población diana del presente estudio (ganaderías de más de 100 cabezas). Una vez se obtuvo esta información, se distribuyó el censo de la población total en los tres estratos objeto de estudio.

También se realizaron para la población en estudio una distribución del censo por municipios, una distribución del censo por estratos en cada municipio y un estudio del número de cabezas por explotación medio por municipios y por estratos.

3.2.2. MUESTREO

Tras este análisis previo del censo, se diseñó un plan de muestreo para el presente estudio epidemiológico. El tipo de muestreo elegido fue el aleatorio estratificado. Para determinar el tamaño muestral se tuvo en cuenta el tamaño poblacional de cada uno de los tres estratos que se pretendían estudiar y se hallaron los tamaños muestrales con el fin de determinar la tasa global de presencia en leche de *C. burnetii* con una cota de error del 5 %, asignando a los estratos pesos proporcionales a su tamaño poblacional.

Una vez determinado el número de muestras por estrato, se realizó una elección aleatoria de los animales que serían objeto de estudio en cada una de las ganaderías pertenecientes a la población diana.

3.2.3. OBTENCIÓN Y REMISIÓN DE MUESTRAS DE LECHE AL LABORATORIO

La recogida de muestras de los animales elegidos aleatoriamente se realizó siguiendo el presente método para su correcta extracción:

1. Limpieza con agua y jabón de la ubre y posterior secado.
2. Desinfección del pezón con una solución de povidona iodada para evitar contaminación exterior de la muestra.
3. Extracción de los primeros chorros que se depositarían en un recipiente aparte y que serían desechados.
4. Recolección de la leche para la muestra en un vial estéril que sería guardado en refrigeración para su posterior traslado hasta el laboratorio del Servicio Técnico Oficial de Ganadería del Cabildo Insular de Lanzarote.
5. Traspaso de una alícuota de 1 ml de cada muestra utilizando una micropipeta con puntas estériles a un vial tipo Eppendorf previamente esterilizado. Dicho vial fue correctamente identificado con el número de referencia asignado para la granja

objeto de muestreo y se guardó en refrigeración hasta su envío, por transporte urgente, al laboratorio del IUSA perteneciente a la Unidad de Epidemiología y Medicina Preventiva Veterinaria de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Las muestras en todo momento estuvieron convenientemente refrigeradas con el fin de evitar su deterioro.

6. Una vez en el destino final, se guardaron en refrigeración hasta el momento de su análisis.

De esta manera, se obtuvieron un número total de 414 muestras, las cuales fueron recibidas en nuestro laboratorio en cuatro fechas de recepción diferentes:

1. 25 de mayo de 2005: muestras de la 1 a la 53.
2. 16 de junio de 2005: muestras de la 54 a la 99.
3. 5 de agosto de 2005: muestras de la 100 a la 245.
4. 4 de noviembre de 2005: muestras de la 246 a la 414.

3.2.4. EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE LECHE REMITIDAS

Las muestras de leche recibidas fueron sometidas a continuación, y a la mayor brevedad de tiempo, a un proceso de extracción de ADN basado en la utilización de una matriz de sílice (Tola y cols., 1996). Para ello se utilizó una serie de reactivos cuya metodología para su obtención se pasa a describir a continuación. Algunos de los reactivos que se van a citar a continuación se habían mencionado con anterioridad en este capítulo de material y métodos. Ahora se expondrá la manera de obtener dichos reactivos.

3.2.4.1. MATERIAL NECESARIO PARA EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UNA MATRIZ DE SÍLICE

Solución de la sílica (Tola y cols., 1996)

1. Se añadieron 60 gramos de sílica a 500 ml de agua destilada.
2. Se decantó al menos 24 horas y se eliminó el sobrenadante (cerca de 440 ml).
3. Se añadió de nuevo agua destilada (la misma cantidad que hemos quitado en el paso anterior), se mezcló nuevamente y se decantó al menos 5 horas.
4. Se eliminó gran parte del sobrenadante (no eliminarlo todo).
5. Se llevó a pH 2,0 usando una solución de HCl concentrada.
6. Se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos y conservó almacenado en pequeñas

alícuotas.

Etanol al 70 %

1. Se añadió a un tubo Falcon de 50 ml, 35 ml de etanol puro y 15 ml de agua ultrapura.
2. Se agitó suavemente y se guardó a -20 °C.

SDS al 10 %

1. Se diluyeron 10 grs de SDS en 80 ml de agua ultrapura.
2. Para lograr una óptima disolución se procedió a calentar la misma hasta 68°C al mismo tiempo que se agitaba.
3. Se ajustó el pH a 7,2.
4. Se llevó hasta un volumen de 100 ml con un matraz aforado. Se conservó a temperatura ambiente.

Tris HCl 1 M pH 8,0

1. Se diluyeron completamente 60,55 gr de TRIS base en 400 ml de agua ultrapura.
2. Se ajustó a pH 8,0 con HCL concentrado mientras se agitaba.
3. Se llevó hasta un volumen de 500 ml utilizando un matraz aforado.
4. Se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos.

EDTA 0,5 M, 50X a pH 8,0

1. Se diluyeron 18,60 gr de EDTA en 70 ml de agua ultrapura.
2. Cuando la solución llegó a ser transparente, se midió el pH mientras se agitaba y se añadía una solución de NaOH hasta ajustar el pH a 8,0.
3. Se llevó hasta un volumen de 100 ml en un matraz aforado.
4. Se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos.

TE a pH 8,0

1. En un matraz aforado se añadieron 200 µl de EDTA 0,5 M a pH 8,0 y 1 ml de TRIS HCl 1 M a pH 8,0.
2. Se llevó hasta un volumen de 100 ml con agua ultrapura.
3. Se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos.

TAE 50X

1. En un matraz aforado se mezclaron 24,2 gr de TRIS base, 5,71 ml de ácido acético glacial y 10 ml de EDTA 0,5 M a pH 8,0.
2. Se llevó hasta un volumen de 100 ml en un matraz aforado.
3. Se autoclavó a 121 °C durante 15 minutos.

TAE 1X

1. En un bote previamente autoclavado se diluyeron 2 ml de TAE 50 X en 98 ml de agua ultrapura.
2. Se recomienda recubrir el recipiente donde se almacene esta disolución. Puede reutilizar para 4 o 5 electroforesis en gel.

Tampón de lavado

1. Se disolvieron 120 gramos de tiocianato de guanidina en 100 ml de Tris-HCl a pH 6,4, logrando una disolución 0,1 Molar.
2. Para lograr una disolución óptima, se facilitó la misma calentando (60–65°C) mientras se agitaba. Para realizar esta operación de manera segura, se ha de realizar en el interior de una cámara especialmente diseñada para la manipulación de sustancias tóxicas y volátiles, ya que el tiocianato de guanidina en contacto con cualquier compuesto con pH ácido libera un gas tóxico.

Tampón de lisis

1. Se disolvieron 120 gramos de tiocianato de guanidina en 100 ml de TRIS-HCl a pH 6,4.
2. Se añadieron 22 ml de EDTA 0,2 M a pH 8,0.
3. Para finalmente, añadir 2,6 ml de Tritón X-100.
4. Para facilitar la disolución se le aplicó calor (60–65°C) y agitación. Para realizar esta operación de manera segura hemos de hacerla en el interior de una cámara especialmente diseñada para la manipulación de sustancias tóxicas y volátiles ya que el tiocianato de guanidina en contacto con cualquier compuesto con pH ácido libera un gas tóxico.

Solución denaturante (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)

1. Se disolvieron 30 gr NaOH en 500 ml de agua ultrapura.
2. Se diluyeron 4,383 gr de NaCl en la solución de NaOH hasta llegar a un valor de 50 ml.

3.2.4.2 PROTOCOLO SEGUIDO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS MUESTRAS DE LECHE

1. Se tomaron 50 µl de la muestra de leche y se depositaron en un tubo Eppendorf de 1 ml de capacidad.
2. Se añadieron 50 µl de la solución denaturante, dejándolo 10 minutos a temperatura ambiente. Se han de mezclar bien las dos fases para lo que se deben golpear suavemente los tubos durante los primeros minutos.
3. Se añadieron a cada solución, 900 µl de tampón de lisis + 40 µl de sílica.
4. Se sometió a la disolución anterior a una agitación manual a temperatura ambiente durante 10 minutos.
5. Se sometió a vibración en el vórtex durante 5 segundos.
6. Se centrifugó 15 segundos a 12000 g.
7. Se decantó y se añadió 1 ml de tampón de lavado, resuspendiendo a continuación con el vórtex.
8. Se centrifugó 15 segundos a 12000 g.
9. Se decantó y se añadió 1 ml de tampón de lavado, resuspendiendo a continuación con el vórtex.
10. Se centrifugó 15 segundos a 12000 g.
11. Se decantó y se añadió 1 ml de etanol al 70% (no frío), resuspendiendo a continuación con el vórtex.
12. Se centrifugó 15 segundos a 12000 g.
13. Se decantó y se añadió 1 ml de etanol al 70 % (no frío), resuspendiendo a continuación con el vórtex.
14. Se centrifugó 15 segundos a 12000 g.
15. Se decantó y se añadió 1 ml de acetona, resuspendiendo a continuación con el vórtex.
16. Se centrifugó 15 segundos a 12000 g.
17. Se decantó y se colocó el Eppendorf durante unos segundos, boca a abajo con la tapa abierta y sobre un papel de filtro.
18. Se colocó el tubo durante 10 minutos a 56 °C en el calentador de eppendorf con la tapa abierta.

19. Se añadieron 100 µl de solución amortiguadora TE a pH 8,0 y se resuspendió con el vórtex.
20. Se colocó el Eppendorf durante 10 minutos a 56 °C en el calentador de eppendorf con la tapa cerrada.
21. Se agitó en el vórtex y centrifugó a 12000 g durante 2 minutos.
22. El DNA se encontraba en el sobrenadante.
23. El DNA extraído se guardó en congelación.

Una vez se extrajo el ADN de cada una de las muestras se procedió a la realización de la PCR a tiempo real para la detección de ADN de *C. burnetii*.

3.2.5. ANÁLISIS MEDIANTE Trans-PCR A TIEMPO REAL DE LAS MUESTRAS DE CAMPO

Cada una de las muestras de ADN obtenidas a partir de las muestras de leche fueron correctamente identificadas, de tal manera que en todo momento se tuvo conocimiento de la granja de la que provenía cada muestra así como de su fecha de recepción en nuestro laboratorio.

Para la realización del análisis de PCR a tiempo real de las muestras de ADN de campo se siguió la misma metodología que la que se describió en el apartado 3.1.5 con 45 repeticiones del ciclo 2 de este capítulo de material y métodos referente a la realización de la PCR a tiempo real. Para ello, se prepararon las placas de pocillos diseñadas para el termociclador modelo MyiQ® (BIORAD) siguiendo las siguientes pautas:

1. Cada vez que se realizaba un análisis de muestras se añadía a la prueba un control positivo y otro negativo. Estos controles no se localizaban siempre en el mismo lugar, es decir: en algunos análisis se situaron al final de la placa (osea, eran las últimas muestras en ser procesadas antes de someterse al proceso de amplificación) y en otros análisis se situaron al principio de la placa. Esto se hizo con el fin de determinar si el tiempo de manipulación de las muestras durante el proceso previo a la amplificación del ADN podía afectar al resultado final de la amplificación de las muestras.

2. Preparación de las muestras de campo: 5 µl de muestra de cada dilución seriada + 1 µl la dilución del cebador Trans 1 + 1 µl la dilución del cebador Trans 2 + 12,5 µl de la dilución comercial SYBER Green® + 5,5 µl de agua ultrapura.

3. Preparación del control negativo: 1 µl la dilución del cebador Trans 1 + 1 µl la dilución del cebador Trans 2 + 12,5 µl de la dilución comercial SYBER Green®+ 10,5 µl de agua ultrapura.

4. Preparación del control positivo: 2 µl de control positivo (dilución log -3) + 1 µl la dilución del cebador Trans 1 + 1 µl la dilución del cebador Trans 2 + 12,5 µl de la dilución comercial SYBER Green®+ 8,5 µl de agua ultrapura.

5. Tras la preparación de las placas, los pocillos se sellaron correctamente y se sometieron al protocolo de ciclos de temperatura y tiempo descritos en el apartado 3.1.5.

Tras la realización de la PCR a tiempo real a las muestras de campo, se obtuvieron los pertinentes registros en cuanto a la emisión de fluorescencia tras el proceso de amplificación, así como los registros de ciclo umbral para aquellas muestras en las que se obtuvo amplificación de ADN y los registros de la temperatura de "melting" o temperatura de fusión para cada una de las muestras amplificadas. Dichos registros quedaron grabados automáticamente en el sistema informático accesorio del termociclador modelo MyiQ® (BIORAD).

3.2.6. ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

Con el fin de conocer la realidad del subsector ganadero caprino en lo relativo a determinados factores de riesgo de la Fiebre Q en animales, y concretamente en estos ungulados destinados a las producciones ganaderas, así como conocer determinados índices productivos y pautas de manejo relacionados con la enfermedad y con el estatus sanitario general del ganado caprino en las diferentes explotaciones y, por último, con el fin de conocer determinadas características de nuestros ganaderos de ganado caprino en la isla de Lanzarote, se diseñó y se llevó a cabo una encuesta epidemiológica entre un total de 19 ganaderos de ganado caprino de la isla (nivel de confianza del 95% y un error permisible o precisión absoluta del 10%) (Canon y Roe, 1982). El muestreo realizado en esta ocasión fue de tipo aleatorio simple. Debido a la aleatoriedad del muestreo, se encuestaron a ganaderías en las que no se habían extraído muestras de leche para su análisis mediante Trans-PCR.

El fin último de la presente encuesta fue la obtención de una serie de datos sobre diferentes variables que pueden comportarse como factores de riesgo, con el fin de establecer conclusiones estadísticas de tipo analítico, o bien, con el fin de obtener valores

para realizar una estadística descriptiva que permita apoyar las conclusiones analíticas obtenidas, así como la obtención de información de relevancia a la hora de afrontar futuras acciones orientadas a la instauración de un plan de lucha y control de la Fiebre Q.

El cuestionario diseñado para el presente estudio se adjunta como anexo (**Anexo I**) y es una modificación de un cuestionario diseñado que fue aplicado en un estudio sobre brucelosis (Lithg-Pereira y cols., 2004).

El método utilizado para recoger la información fue el de entrevista personal con cada uno de los encuestados. Este método se utilizó con el fin de garantizar una alta tasa de respuesta.

En todo momento se garantizó a todos los encuestados la confidencialidad de los datos personales aportados por ellos, según lo establecido en la **Ley Orgánica 15/1999**, de Protección de Datos de Carácter Personal.

Los programas informáticos utilizados para la creación de las bases de datos informáticas a partir de los registros obtenidos tras la realización de la presente encuesta epidemiológica y su posterior análisis fueron el Epi Info versión 3.5.3, el IBM SPSS Statistics 20 y el software libre R versión 2.7.1 (procedimiento GLM).

3.2.7. ANÁLISIS MATEMÁTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Tras la recogida de los datos obtenidos tras la puesta a punto de la Trans-PCR a tiempo real, el posterior análisis de las muestras de campo, la realización de la encuesta epidemiológica y la correspondiente creación de las pertinentes bases de datos para cada una de las fases de experimentación descritas, se procedió a realizar el siguiente estudio matemático de los datos obtenidos. En el presente apartado se exponen los materiales y las metodologías utilizados.

3.2.7.1. PRIMER ESTUDIO INFERENCIAL PARTIENDO DEL TOTAL DE LAS GRANJAS MUESTRADAS PARA EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE MEDIANTE LA Trans-qPCR PARA LA DETECCIÓN DE *C. burnetii*

El objetivo principal de este estudio analítico fue el identificar factores de riesgo asociados con la presencia de *C. burnetii* en muestras de leche del ganado caprino en la isla de Lanzarote.

Dicho estudio inferencial se dividió en dos partes. En primer lugar, se ha realizado un análisis inferencial partiendo de un estudio observacional prospectivo en el que se muestreó a un número especificado de animales por granja, identificándose posteriormente, la presencia o ausencia de *C. burnetii* en leche. En este primer estudio se pretendió establecer relaciones estadísticas entre las granjas positivas, es decir, las que contaban con animales portadores que eliminaban *C. burnetii* por la leche, con la estación de muestreo, con el fin de establecer si existía estacionalidad en la eliminación de *C. burnetii* por la leche en el ganado caprino de Lanzarote (Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005; Rodolakis y cols., 2007), con el estrato al que pertenece la granja y con el número de cabezas, con el fin de determinar si existía una relación entre el tamaño de las explotaciones ganaderas y la presencia de portadores eliminadores de *C. burnetii* (Kennerman y cols., 2010) y, por último, se estudió la relación existente con la zonificación de las explotaciones muestreadas (Pascual, 1994).

Para la realización de este primer estudio inferencial, en cada grupo de granjas determinado por cada uno de los factores analizados, se obtuvieron las frecuencias absolutas y relativas de presencia de *C. burnetii* en muestras de leche y se compararon mediante el test exacto de Fisher, recomendado para estudios donde tanto el tamaño muestral como el de la población diana son relativamente pequeños (Pértega y Pita, 2004). Posteriormente, y para el caso concreto de la estacionalidad en la eliminación de *C. burnetii* por la leche en el ganado caprino de Lanzarote, se procedió de la siguiente manera: para la *i*-ésima granja y estación *t* ($t=1,2$) representamos por $N_{i,t}$ el número de animales examinados y por $Y_{i,t}$ el número de casos detectados en los que se daba eliminación del agente causal en leche. Los datos se ajustaron a un modelo de Poisson (McCullagh y Nelder, 1989) el cual asume que $Y_{i,t} \cong P(\mu_{i,t})$ (ley de Poisson de parámetro $\mu_{i,t}$), siendo:

$$\log \mu_{i,t} = \log N_{i,t} + \theta + \alpha_t + \beta' \cdot \mathbf{X}_{i,t}$$

Aquí, α_t representa el efecto correspondiente al periodo *t* ($\alpha_2 = 0$) y $\mathbf{X}_{i,t}$ el vector de potenciales factores de riesgo. La selección de variables se llevó a efecto mediante el criterio de Akaike (AIC). La bondad de ajuste del modelo se evaluó a través del coeficiente de sobredispersión (*overdispersion*) y mediante la comparación de las tasas de presencia de *C. burnetii* en leche observadas con las pronosticadas por el modelo. Los datos se analizaron con el paquete estadístico R versión 2.7.1 (procedimiento GLM).

A continuación se muestra el código R utilizado para realizar los cálculos descritos anteriormente:

Figura 4. Código R empleado para realizar los cálculos de ajuste de los datos experimentales a un modelo de Poisson que explique la estacionalidad de la presencia de *C. burnetii* en la leche de cabra en Lanzarote.

```

Call:
glm(formula = COXIELA ~ offset(log(N)) + EST, family = poisson(link =
"log"))
Deviance Residuals:
Min 1Q Median 3Q Max
-1.5960 -0.8642 -0.6210 -0.0611 2.9877
Coefficients:
Estimate Std. Error z value Pr(>|z|)
(Intercept) -2.8936 0.2425 -11.931 < 2e-16 ***
EST 2.0893 0.2970 7.034 2.01e-12 ***
---
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
(Dispersion parameter for poisson family taken to be 1)
Null deviance: 93.553 on 37 degrees of freedom
Residual deviance: 40.980 on 36 degrees of freedom
AIC: 79.507
  Number of Fisher Scoring iterations: 6

List of 30
 $ coefficients : Named num [1:2] -2.89 2.08
  .. attr(*, "names")= chr [1:2] "(Intercept)" "EST"
 $ residuals : Named num [1:30] -1.0000 -0.0281 -0.0559 1.1742 -1.0000
  ...
  .. attr(*, "names")= chr [1:30] "1" "2" "3" "4" ...
 $ fitted.values : Named num [1:30] 1.06 10.29 1.06 1.84 1.11 ...
  .. attr(*, "names")= chr [1:30] "1" "2" "3" "4" ...
 $ effects : Named num [1:30] 10.400 -6.869 0.115 1.821 -0.879 ...
  .. attr(*, "names")= chr [1:30] "(Intercept)" "EST" "" "" ...
 $ R : num [1:2, 1:2] -7.07 0.00 -4.81 -3.30
  .. attr(*, "dimnames")=List of 2
  .. ..$ : chr [1:2] "(Intercept)" "EST"
  .. ..$ : chr [1:2] "(Intercept)" "EST"
 $ rank : int 2
 $ qr :List of 5
  ..$ qr : num [1:30, 1:2] -7.071 0.454 0.146 0.192 0.149 ...
  .. .. attr(*, "dimnames")=List of 2
  .. .. ..$ : chr [1:30] "1" "2" "3" "4" ...
  .. .. ..$ : chr [1:2] "(Intercept)" "EST"
  ..$ rank : int 2
  ..$ qraux: num [1:2] 1.15 1.40
  ..$ pivot: int [1:2] 1 2
  ..$ tol : num 1e-11
  .. attr(*, "class")= chr "qr"
 $ family :List of 11
  ..$ family : chr "poisson"
  ..$ link : chr "log"
  ..$ linkfun :function (mu)
  ..$ linkinv :function (eta)
  ..$ variance :function (mu)
  ..$ dev.resids:function (y, mu, wt)
  ..$ aic :function (y, n, mu, wt, dev)
  ..$ mu.eta :function (eta)
  ..$ initialize: expression({ if (any(y < 0)) stop("negative

```

```

values not allowed for the Poisson family") n <- rep.int(1, nobs)
mustart <- y + 0.1 })
..$ validmu :function (mu)
..$ valideta :function (eta)
..- attr(*, "class")= chr "family"
$ linear.predictors: Named num [1:30] 0.0575 2.3311 0.0575 0.6096 0.1088 ...
..- attr(*, "names")= chr [1:30] "1" "2" "3" "4" ...
$ deviance : num 37.2
$ aic : num 73.7
$ null.deviance : num 88.3
$ iter : int 6
$ weights : Named num [1:30] 1.06 10.29 1.06 1.84 1.11 ...
..- attr(*, "names")= chr [1:30] "1" "2" "3" "4" ...
$ prior.weights : Named num [1:30] 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 ...
..- attr(*, "names")= chr [1:30] "1" "2" "3" "4" ...
$ df.residual : int 28
$ df.null : int 29
$ y : Named num [1:30] 0 10 1 4 0 0 0 0 4 0 ...
..- attr(*, "names")= chr [1:30] "1" "2" "3" "4" ...
$ converged : logi TRUE
$ boundary : logi FALSE
$ model :'data.frame': 30 obs. of 3 variables:
..$ COXIELA : num [1:30] 0 10 1 4 0 0 0 0 4 0 ...
..$ offset(log(N)): num [1:30] 2.94 3.14 2.94 3.50 3.00 ...
..$ EST : num [1:30] 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
..- attr(*, "terms")=Classes 'terms', 'formula' length 3 COXIELA ~
offset(log(N)) + EST
.. ..- attr(*, "variables")= language list(COXIELA, offset(log(N)), EST)
.. ..- attr(*, "offset")= int 2
.. ..- attr(*, "factors")= int [1:3, 1] 0 0 1
.. ..- attr(*, "dimnames")=List of 2
.. ..$ : chr [1:3] "COXIELA" "offset(log(N))" "EST"
.. ..$ : chr "EST"
.. ..- attr(*, "term.labels")= chr "EST"
.. ..- attr(*, "order")= int 1
.. ..- attr(*, "intercept")= int 1
.. ..- attr(*, "response")= int 1
.. ..- attr(*, ".Environment")=<R_GlobalEnv>
.. ..- attr(*, "predvars")= language list(COXIELA, offset(log(N)), EST)
.. ..- attr(*, "dataClasses")= Named chr [1:3] "numeric" "numeric"
"numeric"
.. ..- attr(*, "names")= chr [1:3] "COXIELA" "offset(log(N))" "EST"
$ call : language glm(formula = COXIELA ~ offset(log(N)) + EST,
family = poisson(link = "log"), data = eva)
$ formula :Class 'formula' length 3 COXIELA ~ offset(log(N)) + EST
.. ..- attr(*, ".Environment")=<R_GlobalEnv>
$ terms :Classes 'terms', 'formula' length 3 COXIELA ~
offset(log(N)) + EST
.. ..- attr(*, "variables")= language list(COXIELA, offset(log(N)), EST)
.. ..- attr(*, "offset")= int 2
.. ..- attr(*, "factors")= int [1:3, 1] 0 0 1
.. ..- attr(*, "dimnames")=List of 2
.. ..$ : chr [1:3] "COXIELA" "offset(log(N))" "EST"
.. ..$ : chr "EST"
.. ..- attr(*, "term.labels")= chr "EST"
.. ..- attr(*, "order")= int 1

```

```

.. ..- attr(*, "intercept")= int 1
.. ..- attr(*, "response")= int 1
.. ..- attr(*, ".Environment")=<R_GlobalEnv>
.. ..- attr(*, "predvars")= language list(COXIELA, offset(log(N)), EST)
.. ..- attr(*, "dataClasses")= Named chr [1:3] "numeric" "numeric" "numeric"
.. .. ..- attr(*, "names")= chr [1:3] "COXIELA" "offset(log(N))" "EST"
$ data : 'data.frame': 30 obs. of 77 variables:
..$ GRANJAS : num [1:30] 1 1 2 3 5 7 8 9 10 11 ...
..$ N°ANIMAL: num [1:30] 850 850 400 860 800 450 140 300 300 720 ...
..$ MACHOS : num [1:30] NA NA NA NA 8 12 4 3 5 35 ...
..$ HEMBRAS : num [1:30] NA NA NA NA 792 438 136 297 295 685 ...
..$ BAIFAS1 : num [1:30] NA NA NA NA 158 109 34 89 118 205 ...
..$ CABRAS : num [1:30] NA NA NA NA 634 329 102 208 177 480 ...
..$ MUNICIPI: Factor w/ 7 levels "Arrecife","Haría",...: 6 6 5 2 3 6 6 4 4 4
...
..$ ESTRATO : Factor w/ 3 levels "100 - 300","300 - 500",...: 3 3 2 3 3 2 1 2
2 3 ...
..$ EST : num [1:30] 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
..$ N : num [1:30] 19 23 19 33 20 13 5 10 10 12 ...
..$ V9 : num [1:30] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
..$ V10 : num [1:30] 0 23 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
..$ V11 : num [1:30] 19 0 0 33 0 6 0 10 10 12 ...
..$ V12 : num [1:30] 0 0 19 0 20 7 5 0 0 0 ...
..$ COXIELA : num [1:30] 0 10 1 4 0 0 0 0 4 0 ...
..$ TASA : num [1:30] 0.00 43.48 5.26 12.12 0.00 ...
..$ V13 : num [1:30] 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
..$ V14 : num [1:30] 0 10 0 0 0 0 0 0 0 0 ...
..$ V15 : num [1:30] 0 0 0 4 0 0 0 0 4 0 ...
..$ V16 : num [1:30] 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 ...
..$ Z.CUBIER: num [1:30] NA NA NA NA 0.53 0.23 5.6 0.6 0.34 1.8 ...
..$ Z.DESC : num [1:30] NA NA NA NA 0.13 0.15 1.4 0.2 0.68 0.9 ...
..$ VOL_CUBI: num [1:30] NA NA NA NA 0.18 0.08 1.87 0.3 0.17 0.6 ...
..$ ALTURACU: num [1:30] NA NA NA NA 3 3 3 2 2 3 ...
..$ ZPASTOR : num [1:30] NA NA NA NA 0.0103 0.0023 0.014 0.006 0.006 0.0023
...
..$ HORASPAS: num [1:30] NA NA NA NA 5 5 2 4 4 5 ...
..$ DENSI.ME: num [1:30] NA NA NA NA 0.09 0.07 1.03 0.13 0.19 0.48 ...
..$ NCMEDMUN: num [1:30] 300 NA 280 364 475 ...
..$ MAT.DE.C: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 2 2 2 2 ...
..$ HUM.CUB : num [1:30] NA NA NA NA 2 2 2 2 2 2 ...
..$ Tª.ZON.C: num [1:30] NA NA NA NA 2 1 1 1 1 2 ...
..$ OROGRAFÍ: num [1:30] NA NA NA NA 1 2 1 3 4 4 ...
..$ VIENTOS : num [1:30] NA NA NA NA 2 4 1 2 2 4 ...
..$ TASAREPO: num [1:30] NA NA NA NA 20 25 25 30 40 30 ...
..$ ORIGEN : num [1:30] NA NA NA NA 2 1 1 2 2 1 ...
..$ ORIGENGE: num [1:30] NA NA NA NA 2 NA NA 3 3 NA ...
..$ TASAMH : num [1:30] NA NA NA NA 100 ...
..$ VIDAUTIL: num [1:30] NA NA NA NA 4 4 2 4 5 5 ...
..$ COMPAR.M: num [1:30] NA NA NA NA 2 1 1 1 1 1 ...
..$ CUARENTE: num [1:30] NA NA NA NA 1 NA NA 1 1 NA ...
..$ DESPARIS: num [1:30] NA NA NA NA 2 NA NA 2 1 NA ...
..$ VACUNAS : num [1:30] NA NA NA NA 2 NA NA 2 1 NA ...
..$ NIGUNA : num [1:30] NA NA NA NA 2 NA NA 1 2 1 ...
..$ TIPO1 : num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 1 ...
..$ REG.VACÍ: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 2 1 1 ...
..$ FRE.REGU: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 3 3 3 3 ...

```

```

..$ FRE.MAN : num [1:30] NA NA NA NA 2 2 2 1 1 2 ...
..$ LIM.ORDE: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 2 2 1 ...
..$ AOTRAGAN: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 2 2 2 3 ...
..$ TIPO2 : num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 1 ...
..$ ESPECIE : num [1:30] NA NA NA NA 2 1 1 4 4 2 ...
..$ AOTRARUM: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 2 ...
..$ TIPO3 : num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 1 ...
..$ TIPOPAST: num [1:30] NA NA NA NA 2 2 2 2 2 1 ...
..$ ANTIGÜED: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 2 1 2 1 ...
..$ LIMPIEZA: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 1 ...
..$ FREC.LIM: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 2 1 ...
..$ TAREASD : num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 2 1 ...
..$ V59_A : num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 2 2 3 ...
..$ ROTACIÓN: num [1:30] NA NA NA NA 2 1 1 2 2 2 ...
..$ SER.VET : num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 3 ...
..$ PERSONAL: num [1:30] NA NA NA NA 1 2 3 3 4 3 ...
..$ GAN.PART: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 1 ...
..$ VET.PART: num [1:30] NA NA NA NA 1 2 1 1 2 2 ...
..$ OTRA.PAR: num [1:30] NA NA NA NA 2 1 1 2 1 1 ...
..$ DES.MANO: num [1:30] NA NA NA NA 1 4 2 4 4 3 ...
..$ GUANTES : num [1:30] NA NA NA NA 3 1 1 1 3 2 ...
..$ PLACENTA: num [1:30] NA NA NA NA 1 1 1 1 1 1 ...
..$ P.PRINCI: num [1:30] NA NA NA NA 2 2 2 2 2 5 ...
..$ P.SECUND: num [1:30] NA NA NA NA 3 3 1 2 NA NA ...
..$ BAIFAS : num [1:30] NA NA NA NA 30 70 20 30 90 10 ...
..$ ADULTAS : num [1:30] NA NA NA NA 5 1 30 15 10 5 ...
..$ INFERT : num [1:30] NA NA NA NA 20 10 NA 10 5 10 ...
..$ GARRAPAT: num [1:30] NA NA NA NA 2 1 1 1 1 1 ...
..$ GRAD.INF: num [1:30] NA NA NA NA NA 1 2 1 2 2 ...
..$ CONCEN : num [1:30] NA NA NA NA 3 2 2 1 1 2 ...
..$ FIBRALAR: num [1:30] NA NA NA NA 2 1 3 3 3 1 ...
$ offset : num [1:30] 2.94 3.14 2.94 3.50 3.00 ...
$ control :List of 3
..$ epsilon: num 1e-08
..$ maxit : num 25
..$ trace : logi FALSE
$ method : chr "glm.fit"
$ contrasts : NULL
$ xlevels : list()
  - attr(*, "class")= chr [1:2] "glm" "lm"

```

Como se podrá observar en el apartado de resultados, la variable zonificación o zona de las granjas no se pudo considerar como un factor de riesgo mediante una asociación entre variables de manera estadísticamente significativa en este primer análisis inferencial. Sin embargo, llamó poderosamente la atención que la tasa de granjas con animales positivos en la zona considerada de riesgo en el presente estudio fuera 3,3 veces superior a la tasa observada en la zona considerada de menor riesgo en la estación en la que se registró una menor tasa de presencia de *Coxiella* en las muestras de leche. Este hallazgo nos llevó a realizar un segundo estudio inferencial basándonos en los datos proporcionados por la encuesta realizada en el presente estudio, en el que se trató de hallar posibles factores de riesgo que puedan explicar las diferencias de tasas observadas

entre las zonas de riesgo propuestas de entre una serie de variables que tienen que ver con múltiples aspectos del manejo y del diseño de las explotaciones encuestadas.

En el siguiente apartado se describirá el procedimiento seguido para analizar los datos obtenidos tras la realización de la encuesta epidemiológica con el fin desarrollar un estudio estadístico descriptivo que serviría de base para la posterior realización del citado segundo estudio inferencial, en el cual, se trata de relacionar diferentes variables que tienen que ver con el manejo y la sanidad animal con las tasas de presencia de *C. burnetii* en leche del ganado caprino de Lanzarote, de una manera indirecta en esta ocasión, es decir, tras una clasificación previa de las granjas encuestadas en dos zonas en cuanto al riesgo de presencia de animales portadores eliminadores de *Coxiella* en leche se refiere.

3.2.7.2. EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y ANALÍTICA A PARTIR DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA. SEGUNDO ESTUDIO INFERENCIAL

Fruto de los resultados del análisis de las muestras de campo mediante Trans-qPCR, del estudio previo del censo caprino de la isla de Lanzarote, y del estudio de los resultados del cuestionario, se obtuvo una estadística descriptiva sobre la distribución de la población caprina en el territorio estudiado, condiciones de manejo y sanidad animal y, sobre la capacidad organizativa y formación de los ganaderos, que además permitirá apoyar los resultados estadísticos analíticos obtenidos. Concretamente, este estudio descriptivo servirá de base para la realización del segundo estudio inferencial.

Para ello, se organizó la información obtenida a partir de la encuesta en distintos apartados que trataban diferentes campos de la producción y la sanidad animal, con el fin de establecer una descripción de la realidad existente en cada uno de los campos tratados, así como de intentar establecer relaciones estadísticamente significativas con los potenciales factores de riesgo que serían estudiados en el segundo análisis inferencial. Por otra parte, para cada una de las variables cuantitativas tratadas en esta parte del estudio se calculó la media aritmética, la mediana (utilizada esta última como valor de referencia o indicador para alguna de las variables analizadas de cara al segundo estudio inferencial, debido al pequeño tamaño poblacional), la desviación estándar y el intervalo de confianza (Milton y Tsokos, 2001).

El total de granjas encuestadas (19 granjas) se dividieron en dos grupos: por un lado estaban las granjas situadas en la zona considerada de riesgo en el presente estudio

y que se corresponde, en este análisis, con la que comprende a los municipios de Haría, Teguiise y Tías, que se caracterizan por ser municipios que se sitúan en la zona centro y norte de Lanzarote; por otro lado estaban las granjas situadas en la zona de menor riesgo siendo o la que se corresponde con los municipios de Arrecife, San Bartolomé, Tinajo y Yaiza (zona centro-sur).

Asimismo, añadir que se elaboraron unas tablas para a mostrar los resultados obtenidos de cara al segundo análisis inferencial realizado a partir de los datos obtenidos tras la ejecución de la encuesta. En dichas tablas se muestran en la primera columna las variables a analizar y los límites propuestos para clasificar las granjas en situación de riesgo o no, mientras que en la columna del centro se muestran las frecuencias relativas y absolutas obtenidas para las granjas de cada una de la zonas de riesgo propuestas para el segundo estudio inferencial, mostrándose en la tercera columna el valor de p obtenido según el test de Fisher, recomendado para este tipo de estudios analíticos donde el tamaño poblacional, así como el muestral, son reducidos (Pértega y Pita, 2004).

A continuación se expondrá la relación de campos que tienen que ver con el manejo y la sanidad animal propuestos y la serie de hipótesis propuestas para cada una de las variables a tratar de cara a la realización del segundo estudio inferencial:

A. Densidad poblacional y dimensionamiento de las explotaciones ganaderas

Con el fin poder establecer sistemas de referencia para las **variables densidad poblacional animal en la zona cubierta (tanto en superficie como en volumen), densidad poblacional animal en la zona descubierta y altura de la cubierta**, se categorizaron las mismas según los valores citados por Buxadé y colaboradores (1996) para el dimensionamiento de las explotaciones de ganado caprino lechero, dividiendo a las diferentes explotaciones para cada una de las variables (ahora de tipo cualitativas dicotómicas) en dos grupos: las que cumplían los requisitos mínimos de dimensionamiento y las que no lo hacían (esta última situación considerada como de riesgo debido a que fomenta mayores tasas de contacto).

B. Orografía y climatología

En este caso, las variables propuestas serían de tipo cualitativo y las situaciones de riesgo propuestas en esta ocasión serían: **a.** El que las granjas tuvieran **cubiertas de uralita** debido a que se ha demostrado en estudios previos que éstas están relacionadas con la presencia de afecciones pulmonares, lo que podría traducirse en una mayor

oportunidad para *C. burnetii* de cara a la producción de de infección vía aerógena; **b.** El que tuvieran **cubiertas metálicas**, lo que se traduciría en un menor aislamiento de la temperatura exterior y temperaturas más bajas en invierno; **c.** Presencia de humedades en zona cubierta, lo que se traduciría en mayor probabilidad de creación de aerosoles contaminados por *Coxiella* en las épocas lluviosas además de empeorar la acción de las bajas temperaturas de cara a la producción de neumonías; **d.** Presencia de **altas temperaturas en la zona cubierta** lo cual una idea también de la capacidad de aislamiento térmico de la cubierta y de la idoneidad de la misma de cara a prevenir la aparición de neumonías; **e.** **La influencia de la orografía**, estimándose como riesgo que las granjas situadas en zonas con mayor relieve puedan tener una acción de los vientos, de las temperaturas y de la humedad relativa del aire; **f.** **La acción de los vientos**, estimándose como riesgo la mayor exposición de las granjas a los vientos dominantes ya que esta circunstancia podría predisponer a la aparición de neumonías y facilitar la transmisión aerógena de la fiebre Q entre los animales. (Buxadé y cols., 1996; Sesión Plenaria del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud, aprobación del protocolo de vigilancia sanitaria específica para los/as trabajadores/as expuestos a amianto, 25 de octubre de 1999; Tissot-Dupont y cols., 2004; Tissot-Dupont, 2009).

C. Reposición e introducción de ganado en la explotación. Medidas preventivas

Las variables y situaciones de riesgo propuestas con respecto a este campo serían las siguientes: **a. Proporción de primíparas**, ya que se ha podido observar en estudios anteriores que los animales jóvenes presentan una mayor presencia de anticuerpos contra la fiebre Q en las ganaderías estudiadas, con lo que, hipotéticamente, a mayor proporción primíparas, mayor riesgo de presencia de *Coxiella* en leche (Pascual, 1994; Kennerman y cols., 2010); **b. Tasa hembras/macho**, este índice es indicador del estrés que han de soportar los machos de la explotación durante la época de apareamientos, con lo cual, a mayor valor para esta tasa, mayor riesgo; **Vida útil de los machos**, este índice puede ser indicador también de estrés durante el apareamiento y promueve la endogamia, lo que puede traducirse en una menor resistencia a enfermedades (Buxadé y cols., 1996; Kruszewska y Tylewska-Wierzbanska, 1997; Álvarez-Ortí y cols., 1999; Leone y cols., 2004). Para todas las variables citadas en este apartado se ha propuesto como límite a las ganaderías encuestadas, para entrar en situación de riesgo, el superar el valor de la mediana.

Asimismo se propusieron otras variables que tienen que ver con el origen de la

reposición (“**origen de la reposición**” de las hembras y el “**intercambio de machos entre ganaderías**”) ya que la introducción de animales provenientes de otras ganaderías pueden alterar los equilibrios existentes para la fiebre Q en las diferentes poblaciones animales (Lennette y Welsh, 1951; Huebner y Bell, 1951; Biberstein y cols., 1974).

D. Ordeño: tipo y mantenimientos de las maquinarias en caso de ordeño mecánico

En este apartado se trató de determinar si determinados factores relacionados con el manejo y, más concretamente, con el ordeño del mismo, tienen relación con el incremento en las tasas de presencia *C. burnetii* en leche, ya que en un estudio previo realizado en vacas se relacionó a este agente causal con la producción de mamitis (Barlow y cols., 2007). Por ello, en la encuesta se realizaron preguntas que tienen que ver con posibles factores favorecedores de la aparición de mamitis y que guardan relación con el ordeño mecánico (Buxadé y cols., 1996). En este sentido tendríamos operaciones de mantenimiento de la máquina de ordeño tales como la periodicidad con la que se comprueba **la regulación de vacío y de frecuencia de pulsos**, periodicidad del **cambio de mangueras de conducción de la leche**, así como verificar si el **protocolo de limpieza** llevado a cabo era el indicado por el fabricante u otro distinto. Los límites propuestos para las dos primeras variables son los mínimos recomendados por la mayoría de fabricantes de máquinas de ordeño (6 meses). En el caso de la tercera variable, la situación de riesgo era que no se siguiera el protocolo de limpieza recomendado por el fabricante.

E. Entorno

En el presente apartado, los hipotéticos factores de riesgo propuestos son aquellos que contribuyen a aumentar la tasa de contacto entre los animales de diferentes explotaciones, ya sean de la misma o de distinta especie. Por tanto dichos factores de riesgo serían: menos de 5 Km de **distancia de las explotaciones encuestadas a explotaciones de otro tipo de producción**, que la **explotación de otra especie más cercana sea de ganado bovino** (ya que se trata de la segunda especie de rumiantes en importancia censal en Lanzarote y cuenta con importaciones de animales frecuentes, con lo que se pueden introducir nuevas cepas), que la **distancia a otras granjas de pequeños rumiantes** fuera inferior a 5 km y que compartan pastos con otras explotaciones (Martin y cols., 1997; Tissot-Dupont y cols., 2004; Maritnov, 2007; Kennerman y cols., 2010).

F. Datos de manejo general relacionados con la sanidad animal

En este apartado se muestran datos descriptivos de variables como el **tipo de manejo** llevado a cabo en las diferentes ganaderías, la importancia de las **Asociaciones de Defensa Sanitaria** en el asesoramiento en materia de sanidad animal de los ganaderos encuestados o la **edad de los responsables de las explotaciones**.

Además, se muestran los registros obtenidos para una serie de variables cualitativas relacionadas con el personal y las tareas de limpieza, desinfección y desparasitación de los corrales en las explotaciones ganaderas encuestadas, teniendo en cuenta la distribución por zonas en cuanto al riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche.

Los límites propuestos para las situaciones de riesgo se han basado, en esta ocasión, en la experiencia profesional del autor principal del presente estudio y en las referencias bibliográficas existentes al respecto (Polydorou, 1985; Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005).

G. Manejo reproductivo: control de la fertilidad, abortos y atención de partos

En este apartado se procedió a tratar diversos índices que nos hablan del manejo reproductivo, intentando relacionar a éstos con las tasas de presencia de *C. burnetii* indirectamente a través de la situación geográfica de las granjas. De entre las variables tenidas en cuenta se encuentran la **tasa de abortos en primerizas**, las cuales y según estudios anteriores, suelen presentar tasas de seroprevalencia superiores a los animales adultos (Kennerman y cols., 2010), la **tasa de abortos en hembras con dos o más partos**, ya que se ha observado que los animales afectados por la enfermedad puede expresar la misma en la siguiente paridera (Berri y cols., 2007) y la **tasa de infertilidad** en el total de animales de las ganaderías encuestadas. Los límites para entrar en situación de riesgo propuestos en estos casos se corresponden con superar los valores de la mediana detectados para las citadas variables.

Asimismo, se analizó de manera descriptiva la distribución anual de los partos para la muestra de la encuesta (perteneciente a la población diana del presente estudio), así como la existente para cada una de las zonas propuestas en el presente estudio de cara de cara al riesgo de presencia de *Coxiella* en leche (zonas centro-norte o de mayor riesgo y centro-sur). Con ello se pretendió estudiar en qué medida puede influir la concentración de partos en una época concreta en la presencia de *C. burnetii* en la leche durante la estación de menor riesgo (Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouvery y

Rodolakis, 2005). También se abordaron de manera descriptiva determinados aspectos relacionados con la asistencia de los partos en las granjas que pueden resultar de interés de cara a la sanidad animal y pública.

H. Presencia de artrópodos

Se intentó asociar las **zonas donde se percibe la presencia de garrapatas** con las zonas de riesgo propuestas en el presente estudio. También, de manera descriptiva, se muestra la relación entre la orografía y la presencia de estos artrópodos.

I. Alimentación: racionamiento

También se registraron datos sobre la alimentación del ganado caprino en las ganaderías encuestadas, los cuales se presentan en forma de frecuencias absolutas y relativas.

3.3. DISEÑO DE UN MÉTODO MATEMÁTICO PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD DE LA Trans-PCR A TIEMPO REAL EN LA DETECCIÓN DE *Coxilla burnetii* EN MUESTRAS DE LECHE DE GANADO CAPRINO

Para poder diseñar un método matemático para calcular la sensibilidad de la Trans-qPCR, partimos de la idea básica de que aquellas muestras de leche que realmente presenten el agente causal pero no hayan sido detectadas por la técnica como positivas, será debido a que cuentan con una concentración de ADN de *C. burnetii* inferior a la que es necesaria para alcanzar el valor de ciclo umbral máximo que es capaz de detectar la prueba. Por tanto, para proceder a ajustar correctamente una distribución de probabilidad en estas condiciones es necesario tener en cuenta la existencia de posibles valores no registrados a la derecha de la distribución.

Se procedió a realizar el ajuste para cinco tipos de distribuciones de probabilidad conocidas y con aplicaciones demostradas científicamente en los campos de la medicina y la microbiología. Dichas distribuciones fueron la Gamma, Normal, Weibull, Logística y Gumbel. Además, se han calculado los tests de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling y Chi-Cuadrado. Para ello se utilizó el paquete de "software" libre *R truncgof*, desarrollado precisamente para valorar el ajuste de distribuciones de probabilidad a datos censurados por la derecha. Se tomó como valor umbral el valor máximo de ciclo umbral detectado tras todos los análisis realizados durante el presente estudio (incluyendo los resultados de los análisis de las muestras de campo).

Se realizarán gráficos para valorar el ajuste de las distintas distribuciones, así como los valores de los tests de bondad de ajuste, parámetros estimados y estimaciones de tasas de falsos negativos. Asimismo, se procederá a calcular la probabilidad de falsos negativos en el supuesto de que detuviéramos el proceso de amplificación de ADN de la técnica de Trans-PCR a tiempo real en el ciclo 36 y en el 40 de la misma, tal y como se describe en la metodología de estudios previos que han utilizado la técnica de Trans-PCR (Lorenz y cols., 1998; Berri y cols., 2000; Klee y cols., 2006; Vaidya y cols., 2008), haciendo una estimación de la sensibilidad obtenida por la técnica para estos supuestos.

Para ello se llevaron a cabo dos series de ajustes a las distribuciones Normal, Gamma, Logística, Weibull, Gumbel y Lognormal, en todos los casos con truncamiento a la derecha (es decir, no era posible observar valores superiores a cierto umbral). En la primera serie (Supuesto A) se consideró que el número máximo

de ciclos que se pudieron detectar fueron 43.2 (ya que hay una muestra positiva en la que la emisión de fluorescencia supera el umbral de detección del ADN bacteriano de la técnica una vez transcurridos 43.19 ciclos). En la segunda serie (Supuesto B) se consideró que el valor máximo de ciclo umbral detectable por la técnica fue de 41.00, ya que los valores de ciclo umbral observados en las muestras positivas se distribuyen muy cerca unos de otros hasta el ciclo umbral 40.6, siendo en este valor donde se produce un salto hasta el único positivo que se detecta en el ciclo umbral 43.2. Asimismo, se ha calculado también la probabilidad de falsos negativos para otras tres hipotéticas situaciones: a. Si la técnica se detuviese en el ciclo 36; b. Si se detuviese en el ciclo 38; c. Si se detuviese en el ciclo 40. Dichos cálculos se han realizado para los supuestos A (ciclo umbral máximo detectado 43.2) y B (ciclo umbral máximo detectado 41.0 ciclos).

Para cada ajuste se proporcionan:

- Los parámetros estimados de la distribución.
- La probabilidad de falso negativo calculada como la *probabilidad de superar el umbral observable* (43.2 ciclos en la primera serie y 41 ciclos en la segunda).
- La probabilidad de falso negativo en los supuestos de detener la prueba a los 36, 38 y 40 ciclos.
- Los valores de los estadísticos de bondad de ajuste Komogorov-Smirnov (KS) y Anderson-Darling (AD), así como sus p-valores correspondientes (como siempre, un p-valor > 0.05 indicaría que puede aceptarse el ajuste a la distribución teórica observada, y un p-valor inferior indicaría que dicha distribución puede descartarse).
- La diferencia fundamental entre el estadístico KS y el AD es que el segundo asigna más peso a los valores de las colas de la distribución. Hay 3 estadísticos de Anderson-Darling: AD: Anderson-Darling estándar: la discrepancia entre la distribución observada y la teórica se mide en valor absoluto. Tiene en cuenta sólo la mayor discrepancia observada (igual que KS); AD2: Anderson-Darling Cuadrático: la discrepancia entre ambas distribuciones se mide en diferencias al cuadrado; la discrepancia global es un promedio ponderado de todas las diferencias observadas; ADup: test AD en el que se asigna más peso sólo a la cola superior de la distribución.

El código R empleado para realizar los cálculos de ajuste de los datos experimentales a curvas de probabilidad conocidas, estimación de tasa de falsos negativos y la realización de los distintos gráficos se muestra a continuación:

Figura 5. Código R empleado para realizar los cálculos de ajuste de los datos experimentales sobre ciclo umbral de las muestras positivas a curvas de probabilidad conocidas, estimación de tasa de falsos negativos y la realización de los distintos gráficos.

```

# Test de bondad de ajuste de Anderson-Darling
library(ADGofTest)
library(evd)

# Función de distribución para datos censurados
cpdist=function(x,dist,parms=c(0,1),umbral,censura)
{
  cpd=function(x) do.call(pdist,list(x,parms[1],parms[2]))
  pdright=function(x) if (x<umbral) return(cpd(x)/cpd(umbral)) else return(1)
  pdleft=function(x) if(x>umbral) return((cpd(x)-cpd(umbral))/(1-cpd(umbral))) else
return(0)
  pdist=paste("p", dist, sep = "")
  if (censura=="left") px=sapply(x,pdleft) else px=sapply(x,pdright)
  return(px)
}

# Función para estimar los parámetros
fitdist=function(X,dist,umbral,censura,ini)
{
  LL.left=function(parms) # Log-Verosimilitud de la distribución con censura por la
izqda.
  {
    a=parms[1];b=parms[2];n=length(X)
    ll=sum(log(do.call(ddist,list(X,a,b))))-n*log(1-do.call(pdist,list(umbral,a,b)))
    return(ll)
  }
  LL.right=function(parms) # Log-Verosimilitud de la distribución con censura por la
dcha.
  {
    a=parms[1];b=parms[2];n=length(X)
    ll=sum(log(do.call(ddist,list(X,a,b))))-n*log(do.call(pdist,list(umbral,a,b)))
    return(ll)
  }
  ddist <- paste("d", dist, sep = "") # Función de densidad
  pdist <- paste("p", dist, sep = "") # Función de distribución
  if (censura=="left") mv=optim(ini,LL.left,control=list(fnscale=-1))$par
  else if (censura=="right") mv=optim(ini,LL.right,control=list(fnscale=-1))$par
  return(mv)
}

# Función para simular datos con censura izqda o dcha
rcdist=function(n,dist,parms,umbral,censura)
{
  sim.right=function(a=Inf) while(a>umbral)
a=do.call(rcdist,list(1,parms[1],parms[2]))
  sim.left=function(a=-Inf) while(a<umbral)
a=do.call(rcdist,list(1,parms[1],parms[2]))
  rdist <- paste("r", dist, sep = "") # Generación de valores aleatorios
  if (censura=="left") sim=replicate(n,sim.left()) else sim=replicate(n,sim.right())
}

# Tests de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnov y Anderson-Darling

```

```

gof.test=function(y,dist,umbral,censura,ini,nsim=1000)
{
  n=length(y); sqn=sqrt(n)
  Fn=0:n/n; Fnu=Fn[-1]; Fnd=Fn[-(n+1)]
  adks.test=function(y,dist,umbral,censura,ini)
  {
    fd=fitdist(y,dist,umbral,censura,ini)
    x=sort(y)
    Fx=cpdist(x,dist,parms=fd,umbral,censura)
    ufx=(1-Fx)
    den=sqrt(Fx*ufx)
    dFnux=abs(Fnu-Fx); dFndx=abs(Fx-Fnd)
    ad=sqn*max(dFnux/den,dFndx/den)
    adup=sqn*max(dFnux/ufx,dFndx/ufx)
    ks=sqn*max(dFnux,dFndx)
    # Se obtiene lo mismo con:
    # ks=sqrt(n)*ks.test(x,cpdist,dist,fd,umbral,censura)$statistic
    ad2=ad.test(x,cpdist,dist,fd,umbral,censura)$statistic
    return(c(ks,ad,ad2,adup))
  }
  gof.sim=function(n,dist,parms,umbral,censura)
  {
    x=rctdist(n,dist,parms,umbral,censura)
    return(adks.test(x,dist,umbral,censura,parms))
  }
  adks=adks.test(y,dist,umbral,censura,ini)
  names(adks)=c("KS","AD","AD2","ADup")
  fd=fitdist(y,dist,umbral,censura,ini)
  gof.dist=replicate(nsim,gof.sim(n,dist,fd,umbral,censura))
  pv=c(0,0,0,0)
  for (i in 1:4) pv[i]=length(gof.dist[i,][gof.dist[i,]>adks[i]])/nsim
  gft=data.frame(cbind(adks,pv))
  names(gft)=c("statistic","p.value")
  return(gft)
}

# Gráficos de ajuste
graficos=function(X,dist,mv,umbral,censura,rangoX=NULL,br=8)
{
  ddist <- paste("d", dist, sep = "") # Función de densidad
  pdist <- paste("p", dist, sep = "") # Función de distribución
  rdist <- paste("r", dist, sep = "") # Generación de valores aleatorios
  par(mfrow=c(2,2))
  if (is.null(rangoX)) rangoX=range(X)
  # Histograma
  hist(X,freq=F,main="Densidad teórica estimada",xlab="Ciclo
umbral",ylab="Densidad de probabilidad",xlim=rangoX,breaks=br)
  base1=seq(rangoX[1],umbral,length=200)
  base2=seq(umbral,rangoX[2],length=200)
  if (censura=="left") {base=base2; bs=base1; Fc=1-
do.call(pdist,list(umbral,mv[1],mv[2]))}
  else if (censura=="right") {base=base1; bs=base2;
Fc=do.call(pdist,list(umbral,mv[1],mv[2]))}
  dt=do.call(ddist,list(base,mv[1],mv[2]))/Fc # Densidad
  lines(base,dt,lwd=2,col="red")
  abline(v=umbral,lty=2)
  # Distribución empírica

```

```

plot(ecdf(X),main="Función de distribución empírica")
pt=(do.call(pdlist,list(base,mv[1],mv[2])))
if (censura=="left") pt=pt-(1-Fc)
pt=pt/Fc # Distribución
lines(base,pt,lwd=2,col="red")
abline(v=umbral,lty=2)
# Q-Q Plot
dteo=do.call(rdist,list(10000,mv[1],mv[2]))
if (censura=="left") dteo=dteo[dteo>umbral]
else if (censura=="right") dteo=dteo[dteo<umbral]
qqplot(dteo,X,main="QQ-plot",ylab="Observados",xlab="Teóricos")
abline(0,1) # bisectriz primer cuadrante
# Gráfico densidad completa
base=seq(rangoX[1],rangoX[2],by=0.1)
dd=do.call(ddist,list(base,mv[1],mv[2]))
plot(base,dd,type="l",col="blue",lwd=2,xlab="Ciclo umbral",
      ylab="Densidad de Probabilidad",main="Densidad
ajustada",ylim=c(0,max(dd)))
# Área por fuera del umbral
ys=do.call(ddist,list(bs,mv[1],mv[2]))
for (k in 1:length(bs)) lines(c(bs[k],bs[k]),c(0,ys[k]),col="cyan")
lines(base,dd,type="l",col="blue",lwd=2)
lines(c(umbral,umbral),c(0,do.call(ddist,list(umbral,mv[1],mv[2]))),lty=2)
abline(h=0,lty=2)
}

pfn=function(dist,umbral,censura,mv) # Cálculo de la probabilidad de falso negativo
{
  pdist=paste("p",dist,sep="")
  if (censura=="left") area=do.call(pdlist,list(umbral,mv[1],mv[2]))
  else if (censura=="right") area=1-do.call(pdlist,list(umbral,mv[1],mv[2]))
  return(round(area,6))
}

ajuste=function(x,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br,nsim=1000,test=T)
{
  fd=fitdist(x,dist,umbral,censura,ini)
  fn=pfn(dist,umbral,censura,fd)
  graficos(x,dist,fd,umbral,censura,rangoX,br)
  if (test) gf=gof.test(x,dist,umbral,censura,ini,nsim) else gf=NULL
  p36=pfn(dist,36,censura,fd)

  return(list(dist=dist,parametros.estimados=fd,prob.falso.negativo=fn,tests.bondad.aj
  uste=gf,
          Prob.más.de.36.ciclos=p36))
}

library(xlsReadWrite)
setwd("C:/Datos/angelo/Mis documentos/Investigación/Coxiella")
setwd("d:/Coxiella")
coxi=read.xls("Coxiella-ciclo.xls")
nciclos=coxi$numciclos
dat=read.xls("concentraciones coxiella.xls")
lcon=dat$logCon

```

```
hist(nciclos)
hist(lcon)
```

```
# Ejemplos de uso de las rutinas:
# Ejecución de tareas por separado:
dist="norm"; umbral=3; ini=c(5,1); censura="left"; rangoX=c(2,8)
fd=fitdist(lcon,dist,umbral,censura,ini); fd
pfn(dist,umbral,censura,fd)
graficos(lcon,dist,fd,umbral,censura,rangoX)
gf=gof.test(lcon,dist,umbral,censura,ini,nsim=1); gf
# Ejecución global:
ajuste(lcon,dist,umbral,censura,ini,rangoX,nsim=1000,test=F)
ajuste(lcon,dist,umbral,censura,ini,rangoX,nsim=1000,test=T)
```

```
# Aplicación al número de ciclos
umbral=43.2; censura="right"; rangoX=c(25,47); nsim=1; br=8
dist="norm"; ini=c(37,3);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="gamma"; ini=c(100,3);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="logis"; ini=c(37,2);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="gumbel"; ini=c(37,5);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="weibull"; ini=c(15,37);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="lnorm"; ini=c(3.61,0.1);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
```

```
# Aplicación al número de ciclos con un umbral más bajo (se pierde una observación)
nciclos=nciclos[nciclos<41]
a0=27; delta=(41-27)/8; br=a0+(0:8)*delta # breaks del histograma
umbral=41; censura="right"; rangoX=c(25,47); nsim=1
dist="norm"; ini=c(37,3);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="gamma"; ini=c(100,3);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="logis"; ini=c(37,2);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="gumbel"; ini=c(37,5);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="weibull"; ini=c(15,37);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
dist="lnorm"; ini=c(3.61,0.1);
ajuste(nciclos,dist,umbral,censura,ini,rangoX,br=br,nsim=nsim,test=T)
```

Resultados

4. RESULTADOS.

“La vida no elige su mundo, sino que vivir es encontrarse, desde luego, en un mundo determinado e incanjeable: en este de ahora”.

José Ortega y Gasset.

4.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO (Trans-PCR-TR) REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Coxiella burnetii*.

4.1.1. EVALUACIÓN DEL CONTROL POSITIVO DE *C. burnetii*.

Siguiendo lo descrito en el apartado de material y métodos procedimos a determinar la concentración inicial de genoma de *C. burnetii* (aislamiento de referencia Nine Mile), haciendo uso de la espectrofotometría. El resultado obtenido tras esta medición fue de 14,1041 µg/ml.

Si tenemos en cuenta que el genoma de *C. burnetii* tiene un peso molecular medio de $1,04 \times 10^9$ Daltons (Myers y cols., 1980), o lo que es lo mismo $1,761 \times 10^{-9}$ µg, y si nos fijamos en la media obtenida tras las mediciones realizadas, tenemos que, la concentración de ADN del control positivo del que partimos equivaldría a una concentración bacteriana equivalente aproximadamente a $8,01 \times 10^9$ células/ml.

4.1.2. CEBADORES Y Trans-PCR A TIEMPO FINAL.

Se comprobó que los cebadores diseñados por Houver y cols. (1992) funcionaron correctamente al realizar la Trans-PCR a tiempo final. Las muestras positivas dieron una única banda claramente visible con un peso molecular correspondiente a 687 pb, mientras que las muestras negativas no produjeron ninguna banda.

4.1.3. Trans-PCR A TIEMPO REAL Y CURVA PATRÓN.

Una vez comprobada que el protocolo de la PCR a tiempo final y los cebadores funcionaban, se verificó que los mismos cebadores podían ser utilizados en la Trans-PCR a tiempo real, siguiendo un primer protocolo, el descrito en el apartado 3.1.4. (material y métodos). Se observó un resultado positivo, para el control positivo y negativo para el control negativo.

Para estandarizar la Trans-PCR a tiempo real, se llevó a cabo una curva patrón, con diluciones seriadas del control positivo inicial. Dichas diluciones seriadas (en base 10) presentaban valores situados entre 10^0 y 10^{-9} , o lo que es lo mismo, hablando en término de valores de concentración de células de *C. burnetii*, entre $8,01 \times 10^9$ y 8,01 células por ml. Además de para estandarizar la Trans-PCR a tiempo real, este ensayo tenía por objetivo obtener una curva patrón de la prueba diagnóstica que se iba a utilizar en nuestro estudio.

Figura 6. Gráfico de la emisión de fluorescencia obtenidos durante el ensayo para obtener la curva patrón de la Trans-PCR a tiempo real. Diluciones seriadas (de izquierda a derecha, y con concentraciones en células de Coxiella/ml): $8,01 \times 10^9$ (B3); $8,01 \times 10^8$ (B4); $8,01 \times 10^7$ (B5); $8,01 \times 10^6$ (B6); $8,01 \times 10^5$ (B7); $8,01 \times 10^4$ (B8); $8,01 \times 10^3$ (B9).

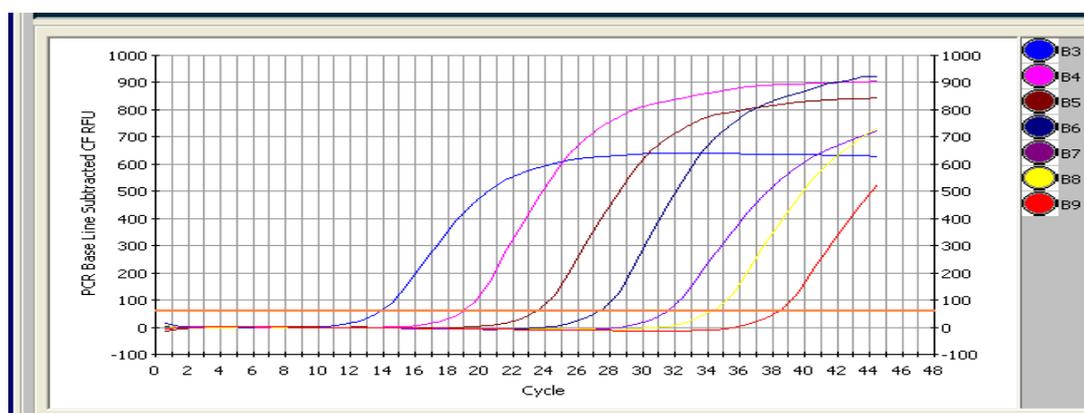
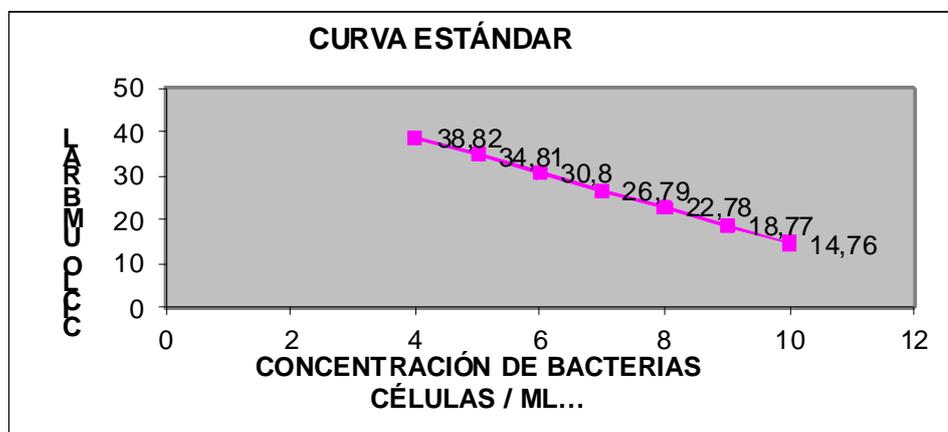


Figura 7. Curva estándar obtenida al comparar el ciclo umbral de los valores positivos de las diferentes diluciones del control positivo y la concentración bacteriana.



En la figura 6 se puede observar cómo 7 diluciones del ADN control positivo dan resultado positivo, mostrando un curva de fluorescencia por encima del valor umbral (línea naranja).

La elaboración de esta curva patrón nos permitió obtener unos valores de referencia en cuanto a la sensibilidad de la técnica, nos ha permitido hallar la concentración bacteriana mínima aproximada de la *C. burnetii* cepa Nine Mile que es capaz de detectar esta técnica diagnóstica. En la figura 7 se puede ver la curva patrón obtenida.

A continuación se muestran de manera simplificada los resultados obtenidos en este ensayo así como los valores para la curva estándar y el índice de correlación entre las variables (tabla 7).

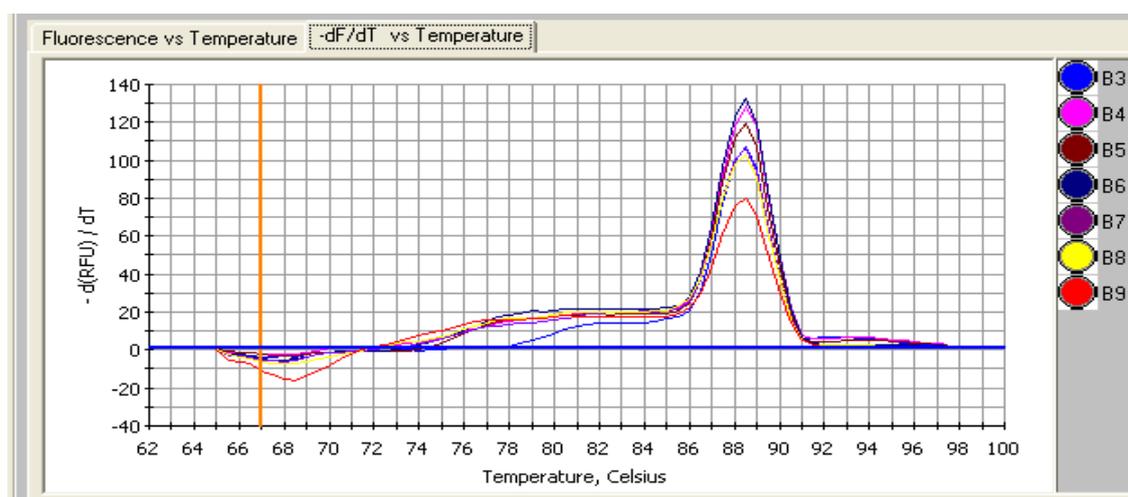
Tabla 7. Cálculo de la curva patrón: Concentración bacteriana enfrente a valores de ciclo umbral observado y esperado.

CONCENTRACIÓN BACTERIANA (CÉLULAS/ML)	CICLO UMBRAL OBSERVADO	CICLO UMBRAL ESPERADO
$8,01 \cdot 10^9$	13,85	14,76
$8,01 \cdot 10^8$	18,89	18,77
$8,01 \cdot 10^7$	23,41	22,78
$8,01 \cdot 10^6$	27,28	26,79
$8,01 \cdot 10^5$	31,50	30,80
$8,01 \cdot 10^4$	34,26	34,81
$8,01 \cdot 10^3$	38,35	38,82

* Índice de correlación: **R=-0.86.**

Como se puede apreciar, la concentración mínima de *C. burnetii* detectada utilizando la técnica de PCR a tiempo real en el presente ensayo fue de $8,01 \cdot 10^3$ bacterias/ml (valor que se corresponde con el valor de 38,82 para el ciclo umbral).

Figura 8. Gráfico de temperatura de fusión frente a la emisión de fluorescencia obtenido durante el ensayo para obtener la curva patrón de la TransPCR a tiempo real. Diluciones seriadas (con concentraciones en células de *Coxiella*/ml): $8,01 \cdot 10^9$ (B3); $8,01 \cdot 10^8$ (B4); $8,01 \cdot 10^7$ (B5); $8,01 \cdot 10^6$ (B6); $8,01 \cdot 10^5$ (B7); $8,01 \cdot 10^4$ (B8); $8,01 \cdot 10^3$ (B9). Temperatura de fusión de $88,5^\circ\text{C}$ para todos los positivos.



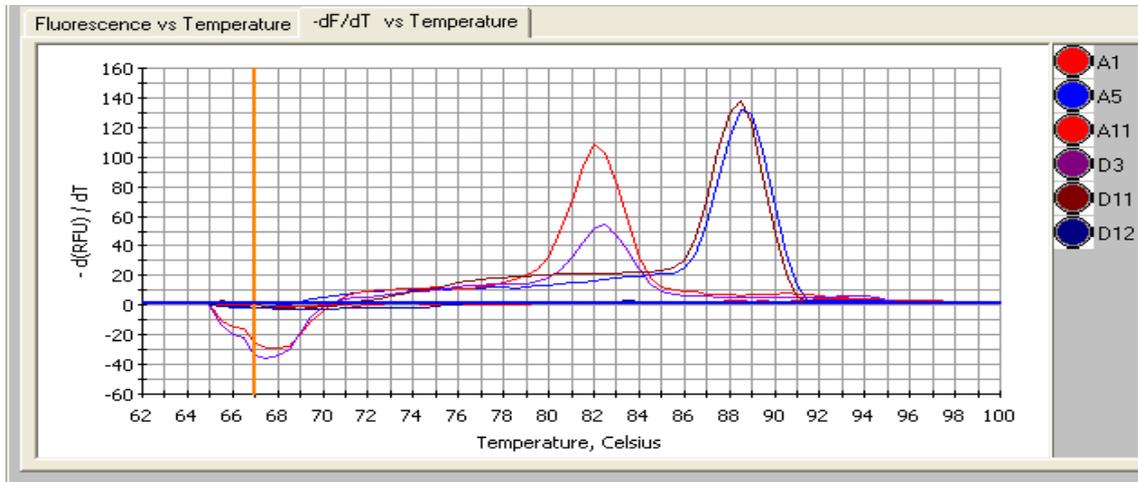
En la figura 8 se muestra el gráfico de temperatura de fusión (TM) (o de "melting fusión"), donde puede observarse una TM de $88,5^\circ\text{C}$.

4.1.4. ANÁLISIS DE LAS TEMPERATURAS DE FUSIÓN DE LAS MUESTRAS DE CAMPO.

La temperatura de fusión detectada para estas muestras positivas fue de $88,5^\circ\text{C}$, dándose este resultado también para las muestras positivas elaboradas con el aislamiento de *C. burnetii* Nine Mile utilizado para elaborar los controles positivos de la técnica utilizada en el presente estudio (figura 9).

A veces se observó que la amplificación del ADN existente en la muestra condujo a la producción de dímeros y/o productos inespecíficos. Los picos de temperaturas de fusión registrados para aquellas muestras consideradas como dímeros, que a su vez presentaban un valor para el parámetro $-d(\text{RFU})/dT$ superior a 50, se situaron en valores comprendidos entre el intervalo cerrado de temperaturas [$76^\circ\text{C} - 83,5^\circ\text{C}$]. A continuación se muestran en la figura 9, gráficos de temperatura de fusión obtenidos para el control positivo, el control negativo, muestra de campo positiva, muestra de campo negativa y de fragmentos inespecíficos amplificados.

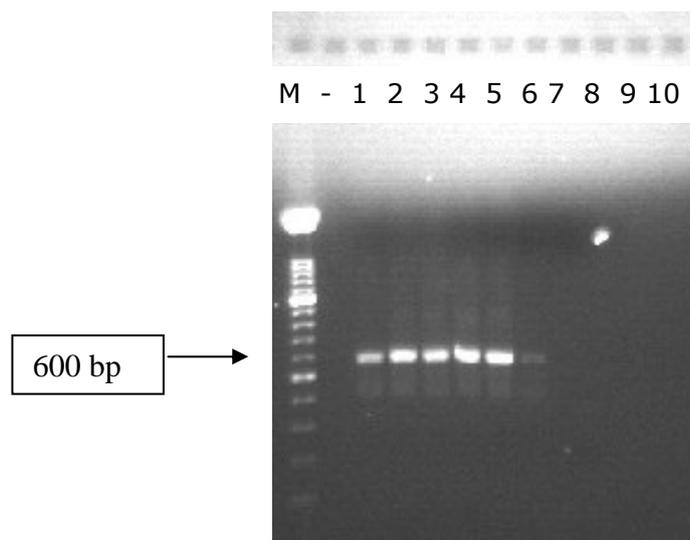
Figura 9. Gráficos de temperatura de melting. Dímeros (A11, D3), controles positivo (D11) y negativo (D12), muestra positiva de campo (A5) y muestra negativa de campo (A1).



4.1.5. COMPARACIÓN DE LA trans-PCR A TIEMPO REAL Y FINAL.

Tras la realización de la PCR a tiempo real, se procedió a realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%, el producto final de la amplificación de las diluciones analizadas y la imagen obtenida tras su tinción con bromuro de etidio y someterlo a la luz U.V. es la siguiente:

Figura 10. Imagen de los resultados de la Trans-PCR de producto final.



En esta fotografía se puede apreciar de derecha a izquierda el marcador molecular (M), el control negativo (-) y a continuación los resultados de la

electroforesis de los productos amplificados resultantes de la técnica de PCR para las diferentes muestras problema (diferentes diluciones de ADN del aislamiento de referencia Nine Mile, de más concentrado (1) a menos concentrado (10)). Examinando las bandas obtenidas, se puede apreciar positividad clara en las 5 primeras diluciones (es decir, para concentraciones de la bacteria que van de $8,01 \cdot 10^9$ a $8,01 \cdot 10^5$ células / ml) y una banda muy tenue (casi inapreciable) para la sexta dilución ($8,01 \cdot 10^4$ células / ml). Si nos remitimos a la tabla de resultados obtenidos en la PCR a tiempo real (tabla 7) y a los gráficos expuestos en las figuras 6 y 7, se puede observar que tenemos lectura de positivos clara, no solo para la sexta dilución, sino también para la séptima dilución (es decir $8,01 \cdot 10^3$ células / ml).

4.2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE *Coxiella burnetii* EN LECHE DE CABRA EN LA ISLA DE LANZAROTE.

El objetivo del presente apartado era mostrar los resultados obtenidos tras estudiar el censo caprino de Lanzarote utilizado para el presente estudio. La intención de este apartado es la de hacer una primera introducción sobre la realidad del subsector caprino en la Isla de Lanzarote.

Para ello se comenzó con un estudio general del subsector en la isla y se terminó con el estudio por municipios de la población diana (es decir, la constituida por granjas de más de 100 cabezas).

4.2.1. ANÁLISIS PREVIO DEL CENSO GANADERO CAPRINO DE LA ISLA DE LANZAROTE.

El subsector caprino de Lanzarote representa aproximadamente el 7% del total del censo de ganado caprino existente en Canarias (según el censo ganadero oficial de Canarias, año 2007). Según dicho censo, Lanzarote posee un total de 25.452 cabezas, mientras que el censo de Canarias asciende a 363.329 cabezas, que se distribuyen en dos provincias: Santa Cruz de Tenerife con 126.164 cabezas y Las Palmas con 237.165 cabezas.

La extracción de las muestras de leche de campo analizadas se realizó durante el año 2005. Como se ha podido apreciar en el capítulo de material y métodos, la población diana del presente estudio fue la de animales pertenecientes a explotaciones ganaderas de caprino con más de 100 cabezas de ganado. Según el censo ganadero oficial de Canarias del año 2005, el número de cabezas total de esta población diana ascendía aproximadamente a 14.005 cabezas, mientras que el total del censo de ganado caprino en la isla de Lanzarote durante dicho año ascendió a unas 24.778 cabezas. La población diana del presente estudio suponía el 56.5% de la población total del ganado caprino de la isla de Lanzarote en el año 2005. Véase en el próximo apartado el estudio por municipios.

4.2.1.1. ESTUDIO DEL CENSO POR MUNICIPIOS (POBLACIÓN DIANA).

A continuación y a modo de resumen, se presentan una serie de gráficos que intentarán explicar de una manera sencilla como se distribuye la población de ganado caprina de población diana del presente estudio (cabaña caprina englobada en explotaciones con más de 100 cabezas censadas). Se mostraran dos gráficos por municipio en los que se representa la distribución de las granjas del municipio por estratos (gráfico de la derecha) y el porcentaje del censo de reproductoras por estrato (gráfico de la izquierda). Estos gráficos tratan de dar una idea de cómo se distribuye la ganadería caprina y cuáles son las tendencias de manejo en los diferentes municipios de Lanzarote. En la parte inferior de los gráficos figura una leyenda con el siguiente significado (figuras de la 11 a la 17):

- Granjas con más de 100 y menos de 300 cabezas (estrato 1).
- Granjas con más de 300 y menos de 500 cabezas (estrato 2).
- Granjas con más de 500 cabezas (estrato 3).

Figura 11. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Arrecife.

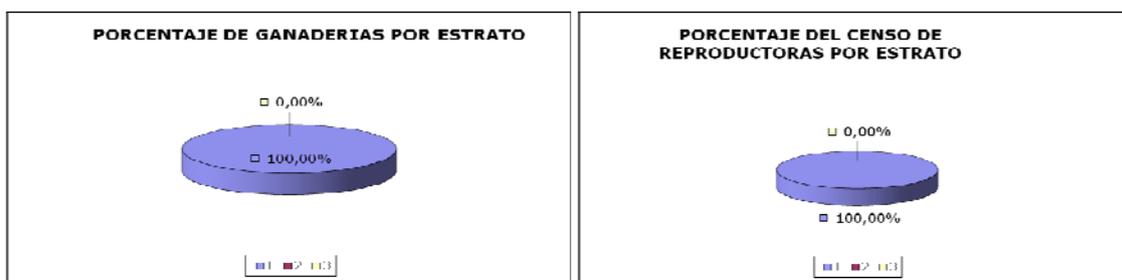


Figura 12. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Haría.

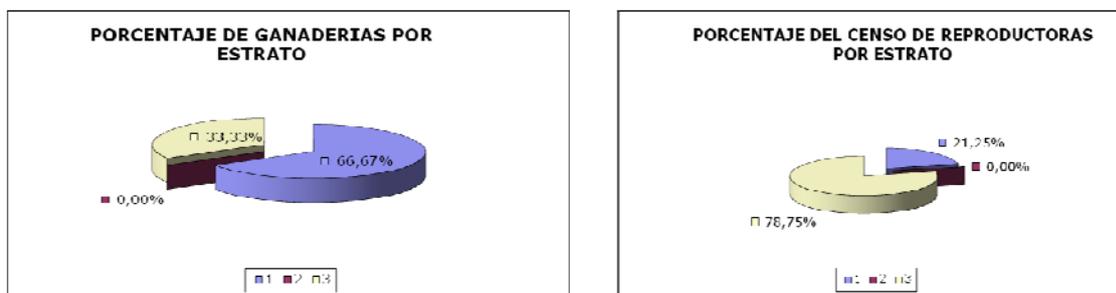


Figura 13. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de San Bartolomé.

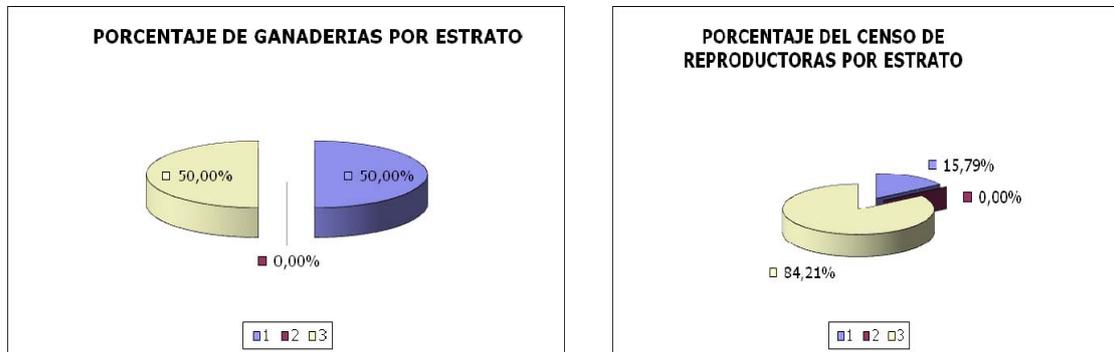


Figura 14. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Tegui.

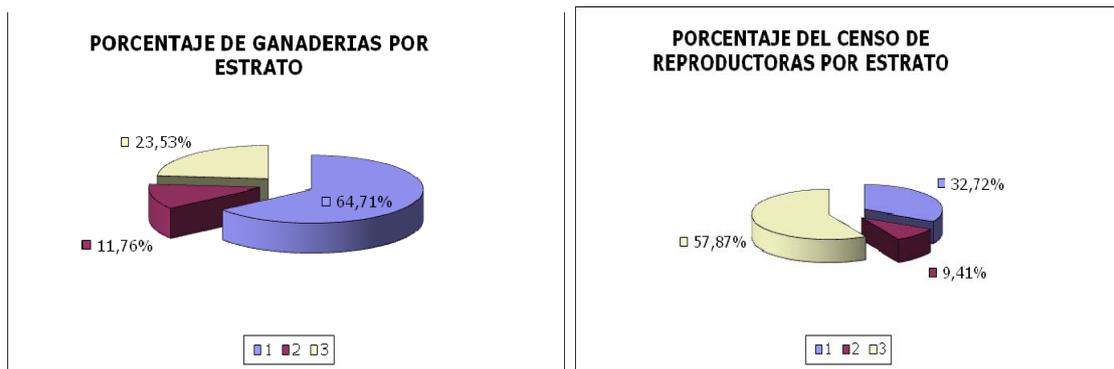


Figura 15. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Tías.



Figura 16. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Tinajo.**Figura 17. Gráficos resumen sobre el censo caprino del Municipio de Yaiza.**

Como se pudo apreciar en el capítulo de material y métodos, en la distribución geográfica de las granjas diseñada por el doctor Pascual (1994), las diferentes zonas se correspondían con un municipio, no siendo la zona centro, en la cual se englobaba a tres municipios diferentes, véase a continuación:

- ZONA NORTE: municipio de Haría.
- ZONA ESTE: municipios de Arrecife, San Bartolomé y Tías.
- ZONA CENTRO: municipio de Tegui.
- ZONA OESTE: municipio de Tinajo.
- ZONA SUR: municipio de Yaiza.

Luego, los gráficos expuestos de los municipios de Haría, Tegui, Tinajo y Yaiza se corresponden con la realidad censal de las zonas norte, centro, oeste y sur respectivamente. A continuación se expone el cuadro resumen para la zona este, según la clasificación realizada por Pascual (1994) (Fig. 18).

Figura 18. Distribución de la población diana por estratos.

Haciendo referencia a los cuadros resumen expuestos, se puede observar que en la zona norte, el censo caprino municipal, en cuanto a la población diana se refiere, se caracteriza por estar distribuido en tan solo tres explotaciones, de las cuales una de ellas (33,3% de las explotaciones del municipio), perteneciente al estrato de más de 500 cabezas, tiene el 78,75 % del censo. En la zona este, la dispersión del censo caprino es algo mayor pero aún así, el 33,34% de las explotaciones albergan al 68,18% del censo. La zona centro se corresponde con el municipio de Teguiise, el cual, presenta el censo caprino municipal más importante con diferencia de la isla (el 45,52% del censo de la población diana). En esta zona el 35,29% de las explotaciones representan el 67,28% del censo de la población diana. En la zona oeste el 28,58% de las granjas representa al 61,82% del censo municipal y en la zona sur, el 40% de las explotaciones contienen al 62,39% del censo municipal de la población diana.

Como se puede apreciar, en la distribución del censo en las diferentes zonas se cumple que un reducido número de explotaciones albergan a una parte considerable del censo de la población diana de la zona, concretamente y hablando en valores medios, el 33,1% de las explotaciones (casi un tercio de las mismas) albergan al 67,7% del censo de la zona (aproximadamente dos tercios de la población), no habiendo diferencias importantes entre las diferentes zonas en este sentido.

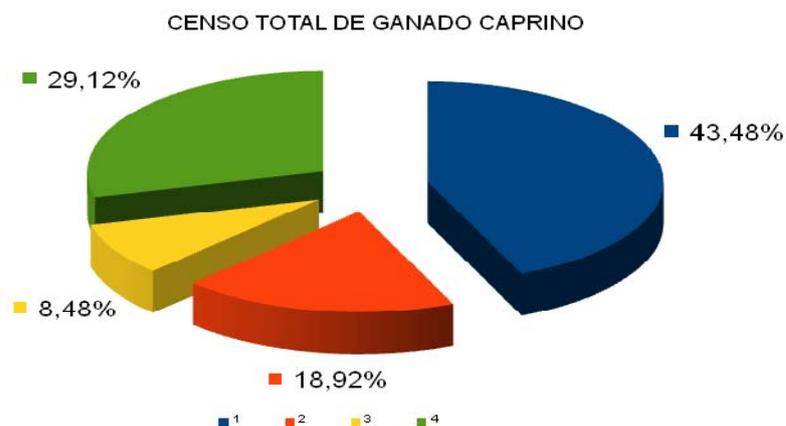
4.2.1.2. ESTUDIO DEL CENSO EN LA ISLA DE LANZAROTE (POBLACIÓN TOTAL Y DIANA).

A continuación se muestra un gráfico resumen sobre la distribución de la población total del ganado caprino en el año 2005 en la isla de Lanzarote en los

diferentes estratos (incluyendo el estrato de menos de 100 cabezas, fuera del presente estudio, véase la fig. 19). La leyenda del gráfico en este caso es la siguiente:

- Granjas con menos de 100 cabezas (estrato no incluido en este estudio).
- Granjas con más de 100 y menos de 300 cabezas (estrato 1).
- Granjas con más de 300 y menos de 500 cabezas (estrato 2).
- Granjas con más de 500 cabezas (estrato 3).

Figura 19. Gráfico del censo total de ganado caprino de la isla de Lanzarote distribuido por estratos.



Como se puede apreciar, el estrato de menos de 100 cabezas supone aproximadamente el 43,48% de la población total, tratándose de un estrato muy disperso que, si bien tiene un grado de relación importante con los núcleos de población humana, resulta muy difícil y costoso de estudiar.

En la siguiente tabla (Tabla 8) se puede apreciar las densidades poblacionales para el ganado caprino y para la población humana. Como se puede ver, la densidad poblacional humana de la zona este difiere en mucho del resto de zonas. Lógicamente, esto es debido al gran aporte de población (que no de territorio) de los núcleos urbanos pertenecientes a Arrecife, los cuales, en la mayoría de los casos, se encuentran aislados en mayor medida de las explotaciones ganaderas que en la realidad de otros municipios, en los que diversos núcleos de población están muy próximos a las ganaderías. Si no tuviéramos en cuenta los datos de Arrecife, los datos de densidad de población humana tenderían a ser similares a los del resto de

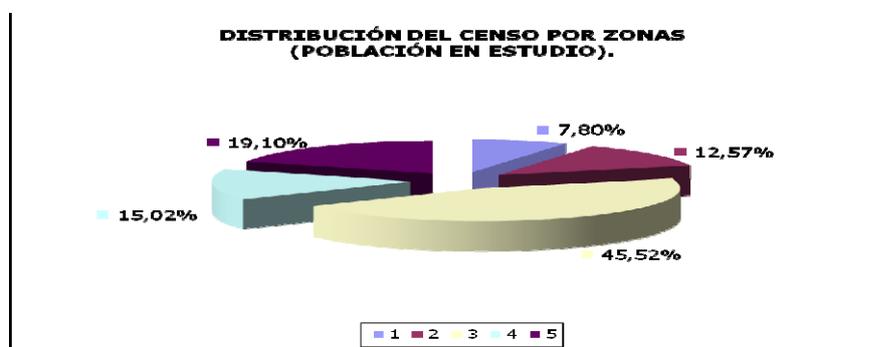
zonas (más rurales).

Tabla 8. Densidades poblacionales del ganado caprino y de la población humana en 2005 en las diferentes zonas según la zonificación establecida por Pascual (1994).

ZONA	SUPERFICIE (KM ²)	Nº ANIMALES / KM ²	HABITANTES / KM ²
NORTE	106,6	18,4	45,9
ESTE	128,2	32,8	688,2
CENTRO	264	33,8	59,9
OESTE	153	34,3	34,4
SUR	211,8	21,5	41,7

Véase ahora un cuadro resumen sobre la distribución del censo caprino de la población diana en la isla de Lanzarote distribuido en las diferentes zonas según la distribución espacial propuesta por Pascual (1994) (fig. 20). La leyenda del gráfico sería la que se expone a continuación:

Figura 20. Gráfico de la población diana distribuida por zonas.



1. Zona Norte; **2.** Zona Este; **3.** Zona Centro; **4.** Zona Oeste; **5.** Zona Sur.

4.2.2. TASAS DE PRESENCIA DE *Coxiella burnetii* EN LECHE DE CABRA DETECTADAS TRAS EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE Trans-PCR A TIEMPO REAL (ISLA DE LANZAROTE).

Tras la realización del estudio del censo del subsector caprino en la isla de Lanzarote y del correspondiente muestreo aleatorio estratificado, se procedió a extraer las muestras de las diferentes granjas, para su posterior remisión a nuestro laboratorio.

9) en función de la granja a la que pertenecían y a la época de recepción, de tal forma, que en la fila donde figura el título de totales, podemos observar el número total de muestras en cada fecha de recepción. Por otra parte, el cuadro muestra el número de muestras positivas en función de la granja muestreada y la época de recepción de muestras, pudiéndose apreciar, el dato total para cada época de recepción. Además, para ambas variables, se muestran los porcentajes sobre el total de muestras.

Por último, se expresan las tasas de eliminación o de presencia en leche de *C. burnetii* obtenidas en las diferentes épocas de recepción de muestras (datos expresados en porcentajes, tabla 9). Además, como se puede apreciar, existen datos de presencia en leche altos y similares en las dos primeras épocas de recepción (25 de mayo y 16 de junio) y sensiblemente inferiores para las muestras recibidas en las otras dos épocas (5 de agosto y 11 de noviembre).

En la tabla anterior (tabla 9) se muestran las tasas de presencia en leche absolutas y las medias de las tasas relativas de presencia en leche (expresadas en porcentaje) calculadas para la estación de presencia alta y presencia baja. También se muestra un valor de tasa de presencia media global para todas las épocas de recepción. Esta media global viene expresada como presencia media y su valor es de 22.9%.

Por otra parte, es de resaltar que en la estación de alta presencia sólo se analizaron un total de cuatro granjas, siendo el porcentaje de muestras analizadas el 24,2 %, frente al 75,8 % de muestras recibidas en la estación de baja presencia, provenientes de un total de 35 granjas. Si nos centramos en las granjas muestreadas en la estación de alta presencia o de mayor riesgo, se puede observar que las cuatro han sido muestreadas en ambas estaciones. Véase a continuación un cuadro de similares características al expuesto (tabla 9) pero esta vez solo con los datos de estas cuatro granjas (tabla 10).

Tabla 10. Tasas de presencia de *C. burnetii* en leche de las granjas muestreadas en la estación de mayor riesgo.

GRANJAS	Nº DE MUESTRAS RECIBIDAS FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS				TOTAL	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS				TOTAL
	25/05/05	16/06/05	05/08/05	04/11/05		25/05/05	16/06/05	05/08/05	04/11/05	
1		23	19		42		7	0		7
11	30		11		41	15		1		16
21	23		26		49	7		0		7
27		22		6	28		11		2	13
TOTALES	53	45	56	6	160	22	18	1	2	43
PORCENTAJE SOBRE TOTAL DE MUESTRAS	33,13	28,13	35	3,75		51,16	41,86	2,33	4,65	
PORCENTAJE SOBRE TOTAL DE POSITIVOS										
PRESENCIA POR ÉPOCAS DE MUESTREO (%)						41,51	40	1,79	33,33	
PRESENCIA ESTACIÓN PRES. ALTA		40,82				40,75				
PRESENCIA ESTACIÓN PRES. BAJA			4,84				17,56			29,16
MEDIA ESTACIÓN PRES. ALTA										
MEDIA ESTACIÓN PRES. BAJA										
PRESENCIA MEDIA										

Como se puede apreciar, la presencia media observada en la estación de alta presencia es sensiblemente superior a la observada en la estación de baja presencia de *C. burnetii* en leche (40,75 % enfrente al 4,84%, si nos remitimos a los valores absolutos de tasa de presencia y enfrente al 17,56 %, cuando nos referimos a valores de media de tasa de presencia observado entre las diferentes granjas) y en todas las granjas se produce la reducción de la eliminación del agente causal en leche de una estación a otra. Por otra parte, el incremento de la media de las tasas de presencia en la estación de baja eliminación en leche de *C. burnetii* es debido a la aportación de la granja 27 de 2 positivos entre las 6 muestras analizadas en la época de recepción correspondiente al 11 de noviembre de 2005, siendo esta granja la única de las cuatro muestreadas en el periodo de tiempo indicado.

Las siguientes tablas que se muestran a continuación (tablas 11, 12 y 13) siguen el patrón de diseño de la tabla 10, pero esta vez, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los tres estratos en los que se ha dividido a la población diana del presente estudio.

Como se puede apreciar en estas tablas, los datos de eliminación de *C. burnetii* en leche mostrados para las granjas de los estratos 1 y 2 corresponden únicamente a la estación de menor riesgo o de presencia baja, ya que no se muestrearon granjas pertenecientes a estos estratos en la estación de mayor riesgo. Si se presta atención a la evolución de la presencia de *C. burnetii* en leche en estos dos estratos, se puede apreciar que en ambos se produce una reducción de la eliminación del agente causal en leche desde la época de recepción del 5 de agosto a la del 4 de noviembre de 2005 (de 6,67 a 3,57 % en el estrato 1; de 12,5 a 3,03 % en el estrato 2). En el

Tabla 12. Resultados de presencia de *C. burnetii* en leche encontrados para el estrato 2.

GRANJAS	Nº DE MUESTRAS RECIBIDAS FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS				TOTAL	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS				TOTAL
	25/05/05	16/06/05	05/08/05	04/11/05		25/05/05	16/06/05	05/08/05	04/11/05	
2				9	9				1	1
7			6	7	13			0	0	0
9			10		10			0		0
10			10		10			4		4
13				7	7				0	0
25				10	10				0	0
39			6		6			0		0
TOTALES	0	0	32	33	65	0	0	4	1	5

PORCENTAJE SOBRE TOTAL DE MUESTRAS					PORCENTAJE SOBRE TOTAL DE POSITIVOS				
0	0	49,23	50,77		0	0	80	20	

PRESENCIA POR ÉPOCAS DE MUESTREO (%)			
NO	NO	12,5	3,03

PRESENCIA ESTACIÓN PRES. BAJA		MEDIA ESTACIÓN PRES. BAJA		PRESENCIA MEDIA	
	7,69		7,77		7,77

Tabla 13. Resultados de presencia de *C. burnetii* en leche encontrados para el estrato 3.

GRANJAS	Nº DE MUESTRAS RECIBIDAS FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS				TOTAL	Nº DE MUESTRAS POSITIVAS FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS				TOTAL	ESTRATO
	25/05/05	16/06/05	05/08/05	04/11/05		25/05/05	16/06/05	05/08/05	04/11/05		
1		23	19		42		7	0		7	3
3			33		33			4		4	3
5				20	20				0	0	3
11	30		11		41	15		1		16	3
15			23		23			0		0	3
21	23		26		49	7		0		7	3
27		22		6	28		11		2	13	3
28				11	11				0	0	3
TOTALES	53	45	112	37	247	22	18	5	2	47	

PORCENTAJE SOBRE TOTAL DE MUESTRAS					PORCENTAJE SOBRE TOTAL DE POSITIVOS				
21,46	18,22	45,34	14,98		46,81	38,3	10,64	4,26	

PRESENCIA POR ÉPOCAS DE MUESTREO (%)			
41,51	40	4,46	5,41

PRESENCIA ESTACIÓN PRES. ALTA		PRESENCIA ESTACIÓN PRES. BAJA		MEDIA ESTACIÓN PRES. ALTA		MEDIA ESTACIÓN PRES. BAJA		PRESENCIA MEDIA	
	40,82		4,7		40,75		4,93		22,84

A continuación se muestra un cuadro sobre los valores de la tasa de presencia en

leche de *C. burnetii* encontradas para cada una de las épocas de recepción, y para cada una de las estaciones (de alta y de baja presencia) para los tres estratos de la población diana. Obsérvese que los datos presentados en esta tabla son valores absolutos de la tasa de presencia de *C. burnetii* en muestras de leche, y no medias de valores de tasas de presencia observadas en las diferentes granjas muestreadas (tabla 14).

Tabla 14. Resultados de tasas de presencia para los diferentes estratos.

	TASAS DE PRESENCIA DE COXIELLA EN LECHE (%)					
	25/05/05	16/06/05	05/08/05	04/11/05	ESTACIÓN ALTO RIESGO	ESTACIÓN BAJO RIESGO
ESTRATO 3	41,5	40,00	4,46	5,41	40,82	4,70
ESTRATO 2	*	*	12,50	3,03	*	7,69
ESTRATO 1	*	*	6,67	3,57	*	4,65

Como se puede apreciar, el valor máximo de presencia por época de recepción de muestras en la estación de presencia baja es el encontrado para el estrato 2 (12,5 %; fecha de recepción 04/11/05), el cual supone tan solo el 30,62% del valor de presencia encontrado para la estación de presencia alta (40,82%). El resto de valores de presencia encontrados para las diferentes fechas de recepción y estratos en la estación de presencia baja son similares, con la característica general, independientemente del estrato que se estudie, de que las tasas de presencia de *C. burnetii* en leche encontradas son marcadamente inferiores a las encontradas en la estación de presencia alta o de mayor riesgo.

En cuanto a la distribución territorial de los datos de presencia en leche de *C. burnetii* y, siguiendo el mismo patrón de distribución geográfica que utilizó el Doctor Francisco Pascual, obtenemos el siguiente cuadro que muestra la distribución espacial de los datos de eliminación de *C. burnetii* en leche encontrados para las diferentes estaciones de muestreo (tabla 15).

Tabla 15. Distribución territorial de los datos de presencia obtenidos.

ESTACIÓN DE PRESENCIA ALTA				ESTACIÓN DE PREVALENCIA BAJA			
ZONAS	MUESTRAS RECIBIDAS	MUESTRAS POSITIVAS	PRESENCIA %	ZONAS	MUESTRAS RECIBIDAS	MUESTRAS POSITIVAS	PRESENCIA %
				NORTE	36	4	11,11
				ESTE	36	1	2,78
CENTRO	53	22	41,51	CENTRO	125	8	6,4
OESTE	23	7	30,43	OESTE	55	0	0
SUR	22	11	50	SUR	55	3	5,45
TOTALES	53	22	40,65 PROMEDIO 40,82 ABSOLUTA	TOTALES	307	16	6,7 PROMEDIO 5,21 ABSOLUTA

***Municipios pertenecientes a las diferentes zonas:** NORTE (Haria); ESTE (Arrecife, S. Bartolomé y Tías); CENTRO (Teguise); OESTE (Tinajo); SUR (Yaiza). (Pascual, 1994).

4.2.3. ANÁLISIS MATEMÁTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.

4.2.3.1. PRIMER ESTUDIO INFERENCIAL PARTIENDO DEL TOTAL DE LAS GRANJAS MUESTRADAS PARA EL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE LECHE MEDIANTE LA Trans-PCR-TR PARA LA DETECCIÓN DE *Coxiella burnetii*.

A continuación se procede a presentar una tabla en la que se presentan las frecuencias relativas y absolutas, así como los resultados obtenidos tras la realización del test exacto de Fisher, para las variables propuestas como supuestos factores de riesgo en esta primera parte del análisis inferencial del presente estudio epidemiológico (tabla 16).

Tras el análisis estadístico de estas variables (tabla 16), se consideró como factor de riesgo de presencia de portadores eliminadores de *C. burnetii* en leche en cada granja la estación de muestreo ($p < 0.009$). Por tanto, el hecho de que la estacionalidad influya en la presencia de portadores eliminadores de *C. burnetii* en leche en las granjas estudiadas hace que, dicha variable, pueda influir en el resultado del resto de variables estudiadas en este primer análisis. De ahí que, en el tratamiento estadístico de los datos, a las cuatro granjas estudiadas en ambas estaciones (las cuales pertenecen al estrato 3), las hayamos tratado como si fueran ocho granjas, cuatro muestreadas en la estación de riesgo y cuatro en la otra estación (de ahí que el total de granjas ascienda a 39 en este primer análisis), ya

que, si bien se trata de solo cuatro granjas, debido a la estacionalidad, han de ser tratadas como ocho granjas ya que, aunque iguales en el espacio, son diferentes en el tiempo y por tanto, diferentes en cuanto a la distribución temporal de la enfermedad y de la presencia de *C. burnetii* en leche se refiere. De hecho, como se ha visto en el apartado anterior, las tasas de presencia de *C. burnetii* en leche de estas granjas disminuyen claramente de una estación a otra.

Tabla 16. Resumen sobre frecuencias absolutas y relativas observadas, y los resultados del test exacto de Fisher para los factores de riesgo potenciales estudiados en la primera parte del análisis inferencial.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Estación de riesgo		
Si	4 / 4 (100)	0.009^{F*}
No	9 / 35 (25.7)	
Nº de cabezas (referencia: la mediana)		
> 200	5/19 (26.32%)	1.000^F
≤ 200	5/16 (31.25%)	
Estrato		
Estrato 3 > 500	4/20 (20.00%)	0.206^F
Estratos 1+2 ≤ 500	5/15 (33.33%)	
Zona de riesgo		
Centro-norte	7/18 (38.89%)	0.121^F
Centro-sur	2/17 (11.76%)	

*^F Test exacto de Fisher.

Todo lo citado hace que, de cara a realizar el resto de este primer estudio inferencial, se haya optado por tener en cuenta los datos observados en la estación de menor riesgo, ya que, en esta estación, se ha estudiado al total de granjas muestreadas (35 granjas).

La zona considerada de riesgo se corresponde, en este análisis, con la que comprende a los municipios de Haría, Tegui y Tías, que se caracterizan por ser municipios que se sitúan en la zona centro y norte de Lanzarote, siendo la zona de menor riesgo, la que se corresponde con los municipios de Arrecife, San Bartolomé, Tinajo y Yaiza (zona centro-sur). Como se puede apreciar en la tabla 16, sin ser la estacionalidad, no se ha podido establecer tras la realización del test exacto de Fisher una asociación con niveles estadísticamente significativos que permita establecer que el número de cabezas, el estrato en función del número de cabezas o la zona en la que está situada la granja influya como posible factor de riesgo, si bien es verdad que para la variable zona, llama poderosamente la atención que la frecuencia de granjas con animales positivos en la zona considerada de riesgo en el presente estudio sea 3,3 veces superior a la frecuencia observada en la zona considerada de menor riesgo en la estación en la que se registró una menor tasa de presencia de

Coxiella en las muestras de leche. De hecho, si sometiéramos los datos obtenidos a un análisis menos exigente mediante un test de ji-cuadrado (lo cual no procede en nuestro caso de cara a obtener un resultado fiable), de las tres variables analizadas negativas para el test exacto de Fisher, la única que mostraría una asociación estadísticamente significativa sería la variable zona ($p < 0.05$). Este hecho nos ha llevado a tomar como referencia esta clasificación de las granjas por zonas de cara a la realización del segundo estudio inferencial.

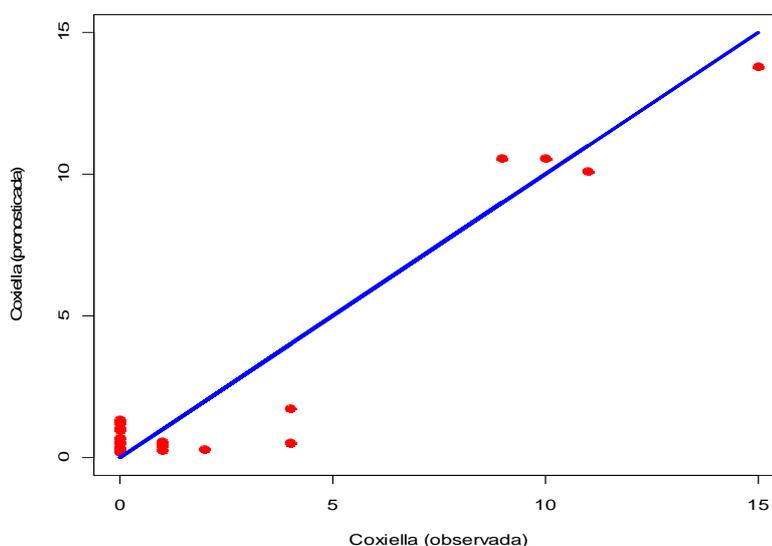
Finalmente, el único factor de riesgo potencial introducido en el modelo en este primer estudio inferencial fue la estacionalidad. La tabla 17 resume la estimación del modelo, el cual muestra una presencia de *C. burnetii* en muestras de leche de cabra muy superior en la estación 1 frente a la 2 (razón de riesgos = 8.786; IC95%= 4.4-14.5). El coeficiente de sobredispersión fue de 1.33 (muy próximo a la unidad).

Tabla 17. Estimación del modelo de Poisson.

Parámetros	Estimador (SE)	p	Razón de riesgos (IC 95%)
θ	-2.951 (0.258)	< 0.001	-
α_1	2.173 (0.298)	< 0.001	8.786 (4.849 ; 15.917)

La figura 21 muestra las tasas de presencia de *C. burnetii* pronosticadas por el modelo frente a las observadas (da una idea de la bondad de ajuste).

Figura 21. Relación entre lo observado y lo pronosticado por el modelo de Poisson en cuanto a la presencia de *C. burnetii* se refiere.



4.2.3.2. EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y ANALÍTICA A PARTIR DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA. SEGUNDO ESTUDIO INFERENCIAL.

Tras la realización de la encuesta epidemiológica se obtuvo información en un total de diecinueve granjas elegidas al azar de entre las que componían a la población diana.

A continuación se procede a presentar el estudio estadístico descriptivo de las diferentes variables analizadas en la encuesta epidemiológica, ordenando su estudio en diferentes apartados en virtud de los diferentes campos de la producción y sanidad animal de los que se ha obtenido información y dividiendo a las granjas encuestadas en granjas situadas en la zona centro-norte o de riesgo y la zona centro sur, según lo visto en el apartado anterior sobre el primer estudio inferencial.

A. *Densidad poblacional animal y dimensionamiento de las explotaciones ganaderas.*

A continuación se muestran los intervalos de confianza obtenidos para las variables densidad poblacional animal en la zona cubierta, calculada para cada granja en unidades que relacionan a los animales con la superficie (cabezas/m²) y con el volumen (cabezas/m³), densidad poblacional animal en la zona descubierta o patio de ejercicio (en este caso solo expresada en cabezas/m²), altura de la cubierta (expresada en metros), densidad poblacional animal en la zona de pastoreo (cabezas por hectárea) y tiempo de pastoreo (expresado en horas), variables todas ellas de tipo cuantitativas continuas (Tabla 18).

Tabla 18. Intervalos de confianza para las variables relacionadas con la densidad poblacional animal y el dimensionamiento de las explotaciones ganaderas de caprino.

VARIABLE	N	n	MEDIA	DS	IC 95%	MEDIANA
ZONA CUBIERTA SUP. (CAB/M ²)	43	19	1.17	1.23	1.17±0.59	1.05
ZONA CUBIERTA VOL. (CAB/M ³)	43	19	0.43	0.42	0.43±0.20	0.31
ZONA DESCUBIERTA SUP. (CAB/M ²)	43	19	0.49	0.43	0.49±0.21	0.26
ALTURA DE CUBIERTA (METROS)	43	19	2.79	0.71	2.79±0.34	3
ZONA DE PASTOREO (CAB/Ha)	43	19	52.46	43.18	52.46±20.73	26
PASTOREO (HORAS/DÍA)	43	19	4.93	1.53	4.93±0.73	5

Asimismo, en la tabla 19 se muestran los valores calculados para p . En este caso, la tabla de contingencia 2 x 2 realizada enfrenta a las granjas situadas o no en la zona de riesgo enfrente a cumplir o no los requisitos mínimos propuestos en los diferentes parámetros de densidad animal expuestos en el material y métodos.

Tabla 19. Variables relacionadas con el dimensionamiento de las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	p
Superficie de zona cubierta. Granjas que superan el límite propuesto (0.8 cab/m ²). Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	9/12 (75.00%) 2/7 (28.57%)	0.073 ^{F*}
Volumen de zona cubierta. Granjas que superan el límite propuesto (0.125 cab/m ³). Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	11/12 (91.67%) 1/6 (14.29%)	0.003 ^F
Superficie de zona descubierta. Granjas que superan el límite propuesto (0.4 cab/m ²). Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	6/12 (50.00%) 1/6 (14.29%)	0.315 ^F

*^F Test exacto de Fisher. Límites propuestos en Buxadé y cols, 1996.

Como se puede apreciar, los valores de las medias y medianas observadas para cada una de las tres variables categorizadas son superiores a los requisitos mínimos de referencia. En cuanto a la distribución por estratos de las granjas que incumplen con los requisitos mínimos propuestos para las variables categorizadas, resulta interesante señalar que las granjas del estrato 3 o de más de 500 cabezas son las que cumplen con menor frecuencia dichos requisitos, sobre todo en lo referente a la zona cubierta de las instalaciones e indistintamente de la zona a la que pertenezcan.

B. Orografía y climatología

En la tabla 20 se muestran las frecuencias absolutas y relativas observadas para una serie de variables cualitativas, así como los resultados obtenidos para el test de exacto de Fisher con el fin de buscar posibles asociaciones estadísticas entre las variables expuestas en el presente apartado y la zona. Estas variables serían el material de la cubierta de los corrales, si se registran humedades en invierno en la zona cubierta de los mismos, si aumenta la temperatura excesivamente en verano en

la zona cubierta, así como, la orografía de los terrenos en los que está situada la explotación y la exposición a los vientos predominantes por parte de las diferentes explotaciones. En este caso, la tabla de contingencia 2 x 2 realizada cruza a las granjas situadas o no en la zona de riesgo (primer estudio inferencial) enfrente a si la granja presenta el factor de riesgo propuesto o no.

Tabla 20. Variables relacionadas con la orografía y la climatología.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Material de la cubierta. Riesgo propuesto: cubierta de uralita. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	6/12 (50.00%) 3/7 (42.86%)	1.000 ^{F*}
Material de la cubierta. Riesgo propuesto: cubierta metálica. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	5/12 (41.67%) 4/7 (57.14%)	0.649 ^F
Humedades en zona cubierta. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	2/12 (16.67%) 1/7 (14.29%)	1.000 ^F
Altas temperaturas en la zona cubierta. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	6/12 (50.00%) 4/7 (57.14%)	1.000 ^F
Orografía. Riesgo propuesto: relieve enfrente a escaso relieve y planicie. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	7/12 (58.33%) 4/7 (57.14%)	1.000 ^F
Vientos dominantes. Riesgo propuesto: exposición enfrente a estar abrigada de vientos. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	9/12 (75.00%) 5/7 (71.43%)	1.000 ^F

*^F Test exacto de Fisher.

C. Reposición e introducción de ganado en la explotación. Medidas preventivas.

En la tabla 21 se exponen los intervalos de confianza determinados para una serie de variables relacionadas con el manejo de la reposición.

Tabla 21. Intervalos de confianza para las variables tasa de reposición, tasa hembra/macho y vida útil de los machos.

VARIABLE	N	n	MEDIA	SD	IC 95%
PROPORCIÓN DE PRIMIPARAS (%)	43	19	27.39	8.76	27.39±4.20
TASA HEMBRAS/MACHO	43	19	62.88	33.14	62.88±15.91
VIDA ÚTIL DE LOS MACHOS (AÑOS)	43	19	3.06	1.33	3.06±0.64

En la siguiente tabla (tabla 22) se representa la categorización de las variables expuestas en la tabla 22, dividiendo a las granjas encuestadas en función de si están situadas en la zona de riesgo o no, cruzando dicha información con las frecuencias absolutas y relativas halladas para las granjas que superan la mediana calculada para cada una de las variables relacionadas con el manejo de la reposición expuestas. También se expresan los resultados observados para el test exacto de Fisher calculado para cada una de las hipotéticas asociaciones estudiadas.

Tabla 22. Variables relacionadas con el manejo de la reposición en las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	p
Proporción de primíparas. Límite propuesto (25%).		0.147 ^{F*}
Zona de riesgo (centro-norte)	7/12 (58.33%)	
Zona centro-sur	1/7 (14.29%)	
Tasa de Hembras/Macho. Límite propuesto (55 H/M).		0.169 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	8/12 (66.67%)	
Zona centro-sur	2/7 (28.57%)	
Vida útil del macho. Límite propuesto (3 años).		0.349 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	5/12 (41.67%)	
Zona centro-sur	5/7 (71.43%)	

*^F Test exacto de Fisher.

Por otra parte, en cuanto a las variables relacionadas con el origen de la reposición en las granjas encuestadas, a continuación se muestra la tabla 23 que, siguiendo el patrón establecido en la tabla 22, muestra los resultados del análisis inferencial realizado para las variables relacionadas con la importación de animales en los cinco años previos a la realización de la encuesta, con el fin de estudiar el grado de asociación de las mismas con la distribución zonal de las granjas.

Tabla 23. Variables relacionadas con el origen de la reposición en las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Origen de la reposición. Riesgo propuesto: parte de reposición importada		0.128 ^{F*}
Zona de riesgo (centro-norte)	10/12 (83.33%)	
Zona centro-sur	3/7 (42.86%)	
Intercambio de machos entre ganaderías. Riesgo propuesto: intercambiar machos.		0.523 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	11/12 (90.91%)	
Zona centro-sur	5/7 (71.43%)	

*^F Test exacto de Fisher.

Por otra parte, en cuanto a las medidas preventivas adoptadas por las ganaderías importadoras de ganado, decir que el 35.71% de estas ganaderías encuestadas no realizaban ningún tipo de medida preventiva a la hora de introducir a los animales, estando todas estas granjas que no realizaban ninguna medida, situadas en la zona de riesgo. En cuanto a las medidas preventivas consultadas a los ganaderos importadores decir que, el 50% de las ganaderías importadoras no realizaban cuarentenas a los animales importados, y que el 71.43% de estas ganaderías no desparasitaban ni vacunaban contra enfermedad alguna a los animales importados antes de introducirlos en las mismas.

D. Ordeño y mantenimiento de los equipos de ordeño mecánico.

En la tabla 24 se muestran, expresados en frecuencias absolutas y relativas, los registros obtenidos para una serie de variables cualitativas relacionadas con el ordeño de los animales, teniendo en cuenta de nuevo, la distribución por zonas en cuanto al riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche de las granjas encuestadas. De las 19 granjas encuestadas, tan solo dos granjas pertenecientes al estrato 1 realizaban el ordeño de manera manual, siendo el ordeño en el resto de las granjas de tipo mecánico.

En este caso, los hipotéticos factores de riesgo propuestos de cara a un posible contagio de la enfermedad a través del ordeño mecánico de los animales serían el revisar la presión y la frecuencia de pulsos del sistema de vacío, así como el cambio de las mangueras del sistema de conducción de la leche de la máquina de ordeño, con una periodicidad superior a los seis meses. También se han obtenido registros

sobre qué granjas siguen las instrucciones de limpieza del fabricante de la máquina de ordeño y de los productos de limpieza, considerando en este caso como hipotético factor de riesgo, el que no se sigan dichas instrucciones.

Tabla 24. Variables relacionadas con el mantenimiento y la limpieza de la máquina de ordeño en las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Regulación de presión y frecuencia de pulsos del sistema de vacío. Riesgo: periodo entre revisiones superior a 6 meses. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	9/10 (90.00%) 3/7 (42.86%)	0.100 ^{F*}
Cambio de mangueras de conducción de la leche. Riesgo: periodo entre cambios superior a 6 meses. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	9/10 (90.00%) 3/7 (42.86%)	0.100 ^F
Protocolo de limpieza de la máquina. Riesgo: no seguir las instrucciones del fabricante Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	4/10 (40.00%) 1/7 (14.29%)	0.338 ^F

*^F Test exacto de Fisher.

E. Entorno de las explotaciones.

En la tabla 25 se muestran, expresados en frecuencias absolutas y relativas, los registros obtenidos para una serie de variables cualitativas relacionadas con el entorno de las explotaciones ganaderas encuestadas, teniendo en cuenta la distribución zonal de las granjas. De nuevo, se muestran los resultados del test exacto de Fisher calculado para cada una de las variables expuestas.

Como se puede apreciar en la tabla 25, se han obtenido registros sobre las distancias aproximadas que separan a las granjas encuestadas de las granjas de otro tipo de producción (ya fueran de monogástricos: gallinas ponedoras y/o cerdos, o grandes rumiantes: en nuestro caso, ganado bovino). También se expone en la citada tabla la frecuencia con la que las explotaciones encuestadas tienen como explotación de otra especie más cercana a una explotación de ganado bovino. Asimismo, se han registrado las distancias aproximadas de las granjas encuestadas a otras granjas de pequeños rumiantes (de ganado caprino) y si comparten pastos con otras explotaciones ganaderas.

Tabla 25. Variables relacionadas con el entorno de las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Distancia a explotaciones de otras especies. Riesgo: menos de 5 Km.		1.000 ^{F*}
Zona de riesgo (centro-norte)	6/12 (50.00%)	
Zona centro-sur	4/7 (57.14%)	
Tipo de explotación de otras especies más cercana. Riesgo: bovino.		1.000 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	1/12 (8.33%)	
Zona centro-sur	1/7 (14.29%)	
Distancia a otras explotaciones de caprino. Riesgo: menos de 5 Km.		0.508 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	10/12 (83.33%)	
Zona centro-sur	7/7 (100.00%)	
Tipo de pastos. Riesgo: comparten pastos.		0.245 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	4/12 (33.33%)	
Zona centro-sur	0/7 (0.00%)	

*^F Test exacto de Fisher.

Es de destacar la cercanía existente entre granjas, ya sean de la misma o de diferentes especies. El 52.6% de las granjas encuestadas tiene una explotación de otra especie a menos de 5 km de distancia (de monogástricos con más frecuencia que de ganado vacuno) y el 89.5 % de estas granjas tienen otra granja de ganado caprino a menos de 5 km. También es de destacar la frecuencia con la que las granjas encuestadas comparten pastos con otras ganaderías.

Estos datos nos hablan de una concentración importante de la ganadería existente en la isla de Lanzarote. Para las variables citadas no se apreciaron diferencias importantes entre las granjas situadas en la zona de riesgo y las situadas en la zona de menor riesgo.

Añadir por último, que el 100% de las granjas encuestadas se encuentran a menos de 5 km de un núcleo urbano con lo que, este dato da una idea de la cercanía de los núcleos de población a las ganaderías de ganado caprino.

F. Personal y tareas de limpieza, desinfección y desparasitación de los corrales.

De un total de 19 explotaciones encuestadas, tan solo una de ellas (5,26% del total de ganaderías) perteneciente al estrato 1 realizaba un manejo intensivo de los animales (estabulación permanente). El resto de las ganaderías realizaban un

sistema semiextensivo en el que el ganado salía a pastar, como se ha podido apreciar en otros apartados del presente capítulo, un número variable de horas en las zonas aledañas a la explotación. Realmente, más que de un sistema semiextensivo, se trata de un sistema intensivo con salida de los animales a pastizales cercanos con el fin de que realicen ejercicio y de que se disminuya el estrés que implica este tipo de producciones.

Por otra parte, una granja del estrato 2 de las 19 encuestadas (el 5,26% del total de las explotaciones) no contrataba servicios veterinarios de ningún tipo, otra granja perteneciente al mismo estrato contrataba los servicios de un veterinario particular y el resto, es decir, el 89,48% de las explotaciones encuestadas, tenían contratados los servicios del veterinario de la Asociación de Defensa Sanitaria (A.D.S.).

En cuanto a la antigüedad de las explotaciones resaltar que, el 73,68% de las explotaciones de ganado caprino encuestadas, tenían más de 20 años de antigüedad, siendo los estratos 2 y 3 los que presentan explotaciones con esta característica con más frecuencia (concretamente el 83,33% de las granjas encuestadas de ambos estratos).

La tabla 26 muestra los registros obtenidos para una serie de variables cualitativas relacionadas con el personal y las tareas de limpieza, desinfección y deparasitación de los corrales en las explotaciones ganaderas encuestadas, teniendo en cuenta la distribución por zonas en cuanto al riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche. También se muestra el resultado del test exacto de Fisher para cada una de las variables estudiadas.

En cuanto al resto de variables expuestas en la tabla 26, tenemos en primer lugar, el modo de realizar la limpieza de los corrales (figura en la tabla como "limpieza de corrales"), la cual, puede ser total (limpieza de todos los corrales en una sola etapa, por ejemplo: una semana determinada limpieza a fondo de todos los corrales) o parcial (en este caso, la limpieza se hace de varias veces hasta completar la totalidad de los corrales). La variable "frecuencia de limpieza" hace alusión al número de veces por año que se limpian la totalidad de los corrales, mientras que, la variable "frecuencia de las tareas DD de los corrales" hace alusión al número de veces por año que se desinfectan y/o se desparasitan los corrales al año en las diferentes explotaciones. La variable "tipo de tareas DD aplicadas en los corrales" hace alusión a si se desinfectan y desparasitan los corrales o si, por el contrario, solo se realiza una de estas dos acciones. La variable "rotación de productos" muestra en

que granjas se rotan los principios activos de los productos utilizados para las tareas DD de los corrales, mientras que la variable “contrata personal” expone que granjas contratan personal y, que granjas siguen un sistema tradicional familiar y no contratan a ningún tipo de personal.

Luego en el presente apartado, los factores de riesgo hipotéticos propuestos serían que la limpieza de los corrales se llevara a cabo de manera parcial (ya que permite una mayor persistencia de patógenos en el medio), con una frecuencia anual inferior a 4 veces por año, que se realizaran las tareas DD de los corrales con una periodicidad inferior a 4 veces por año, que se realizara una sola de las tareas DD en vez de las dos, que no se rotaran los productos y principios activos utilizados para realizar las tareas DD de los corrales y que se contratara a personal (esto último tiene como fin diferenciar entre el sistema tradicional familiar y el sistema industrial de producción).

Tabla 26. Variables relacionadas con las tareas de limpieza, desinfección y desinsectación de las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Antigüedad de la explotación. Riesgo: menos de 20 años.		0.616 ^{F*}
Zona de riesgo (centro-norte)	3/12 (25.00%)	
Zona centro-sur	3/7 (42.86%)	
Tipo de limpieza de los corrales. Riesgo: limpieza parcial.		0.508 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	2/12 (16.67%)	
Zona centro-sur	0/7 (0.00%)	
Frecuencia de limpieza de los corrales. Riesgo: menos de 4 veces al año.		1.000 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	2/12 (16.67%)	
Zona centro-sur	1/7 (14.29%)	
Frecuencia de las tareas D.D. Riesgo: menos de 4 veces al año.		1.000 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	2/12 (16.67%)	
Zona centro-sur	1/6 (16.67%)	
Tipos de tareas D.D. Riesgo: realizar solo una de las tareas D.D.		0.376 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	8/12 (66.67%)	
Zona centro-sur	3/7 (42.86%)	
Rotación de principios activos. Riesgo: no rotarlos.		0.049 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	8/11 (72.73%)	
Zona centro-sur	1/7 (14.29%)	
Personal. Riesgo: contratar personal.		0.616 ^F
Zona de riesgo (centro-norte)	3/12 (25.00%)	
Zona centro-sur	3/7 (42.86%)	

*^F Test exacto de Fisher.

Sin embargo, no ocurre lo mismo con las tareas DD, las cuales, se realizan con menos frecuencia en general entre las granjas encuestadas, siendo las granjas del estrato 1+2 las que menos realizan este tipo de tareas. En cualquier caso, los productos utilizados con más frecuencia para la desinfección de las instalaciones por las granjas encuestadas son la cal viva y el zotal® (cuya composición es a base de fenoles y cresoles con emulgentes que potencian su capacidad de penetración durante su aplicación).

El único factor de los expuestos en la tabla 26 que parece estar relacionado con las granjas situadas en la zona de riesgo de manera estadísticamente significativa es precisamente la rotación de los principios activos de los productos destinados a la realización de las tareas D.D. ($p < 0.049$). Concretamente, las granjas situadas en la zona de riesgo no rotan los principios activos de estos productos con una frecuencia 5.9 veces superior a las granjas situadas en la zona de menor riesgo.

G. Manejo reproductivo: control de la fertilidad, abortos y atención de los partos.

En la tabla 27 se exponen los intervalos de confianza determinados para una serie de variables relacionadas con el manejo reproductivo.

Tabla 27. Intervalos de confianza para las variables tasa de abortos en baifas (o animales primerizas), tasa de abortos en adultas (o cabras de dos o más partos) y tasa de infertilidad.

VARIABLE	N	n	MEDIA	DS	IC 95%
ABORTOS EN PRIMERIZAS (%)	43	19	45.83	28.04	45.83±13.46
ABORTOS EN CABRAS DE DOS O MÁS PARTOS (%)	43	19	12.06	12.06	12.06±5.22
INFERTILIDAD (%)	43	19	10.29	10.29	10.29±3.62

En la siguiente tabla (tabla 28) se representa la categorización de las variables expuestas en el cuadro anterior, dividiendo a las granjas encuestadas según la zona a la que pertenecen y cruzando dicha información con las frecuencias absolutas y relativas halladas para las granjas que superan la mediana calculada para cada una de las variables expuestas. También se expresan los resultados observados para el

test exacto de Fisher.

Tabla 28. Variables relacionadas con el manejo reproductivo en las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Abortos en primerizas (%). Riesgo: superar el 40%. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	5/12 (41.67%) 3/6 (50.00%)	1.000 ^{F*}
Abortos en cabras de dos o más partos (%). Riesgo: superar el 7.5%. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	6/12 (50.00%) 3/6 (50.00%)	1.000 ^F
Infertilidad (%). Riesgo: superar el 10 %. Zona de riesgo (centro-norte) Zona centro-sur	2/12 (16.67%) 2/5 (40.00%)	0.537 ^F

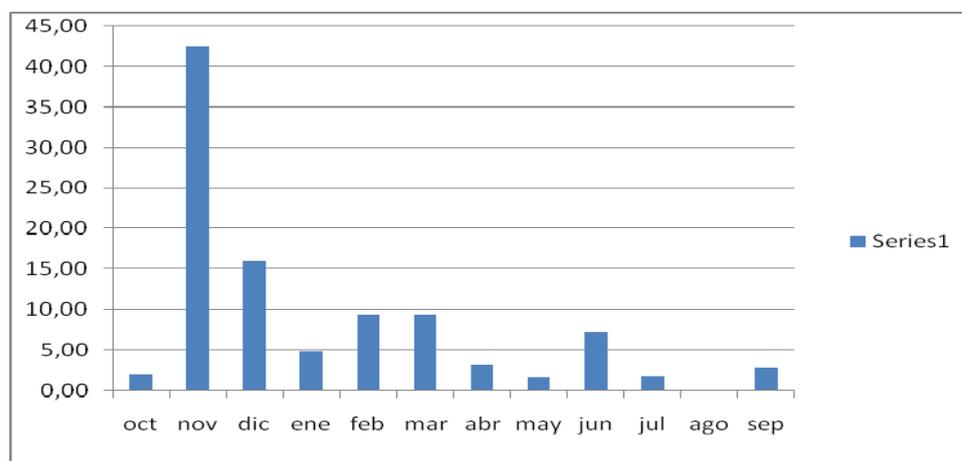
*^F Test exacto de Fisher.

El 100% de los ganaderos encuestados atienden partos complicados en su ganadería y el 47.37% atienden partos complicados en otras ganaderías además de hacerlo en la suya. El 63.15% de los ganaderos encuestados no contratan a veterinarios en ninguna ocasión para atender los partos complicados de sus ganaderías. El 47.36% de los ganaderos encuestados utilizan guantes siempre que atienden los partos complicados enfrente al resto, que los utilizan a veces o no los utilizan nunca. En cuanto al lavado y desinfección de las manos antes de atender los partos complicados, decir que el 26.32% de los ganaderos encuestados se limpian las manos con agua y jabón, y luego, se las desinfectan con povidona yodada o con alcohol etílico, un 21% únicamente se lavan las manos con agua y jabón, y el resto de los ganaderos encuestados, aplican povidona yodada diluida en agua o sin diluir directamente sobre las manos. En el 95% de las ganaderías encuestadas se eliminan las placentas siempre que es posible.

En cuanto a la distribución temporal de los partos es necesario recordar primero que, la muestra para la presente encuesta incluía a un total de 19 ganaderías que albergaban un total de 8153 cabezas de la población diana del presente estudio (ganaderías con más de 100 cabezas). El 68.42% de las ganaderías encuestadas distribuyen los partos en dos parideras, mientras que el resto (el 31.58%) concentran sus partos en una única paridera. De media, las ganaderías que distribuyen los partos en dos parideras tienen una paridera principal (meses de octubre a marzo) en la que tiene lugar, de media, el 65% de los partos y, una

secundaria (meses de abril a julio), en la que ocurren aproximadamente el 35% de los partos. En el siguiente gráfico se muestra la distribución mensual aproximada de los partos de la muestra de explotaciones escogidas para esta encuesta (fig. 22).

Figura 22. Distribución mensual de partos en las ganaderías encuestadas.



En este gráfico (fig. 22) se puede apreciar una concentración muy fuerte de partos entre los meses de noviembre y marzo (aproximadamente el 82.26% de los partos tienen lugar en esta época), registrándose el pico máximo de partos en los meses de noviembre y diciembre (aproximadamente el 42.54% y el 16.08% del total de partos, respectivamente, se dan ambos meses). Luego, en abril y mayo, la tasa de partos disminuye, habiendo un ligero repunte en el mes de junio (aproximadamente tiene lugar el 7.29% del total de partos) para volver a disminuir las tasas de partos durante el verano, repuntando ligeramente en los meses de septiembre y octubre para entrar de nuevo en noviembre, el mes de máxima presentación de partos.

En el siguiente gráfico (fig. 23) se puede observar la relación encontrada en el presente estudio entre la distribución porcentual aproximada de los partos en el año para las ganaderías de la población diana del presente estudio y la tasa de positivos a la transPCR para la detección de *C. burnetii* en muestras de leche en cada una de las fechas de recepción.

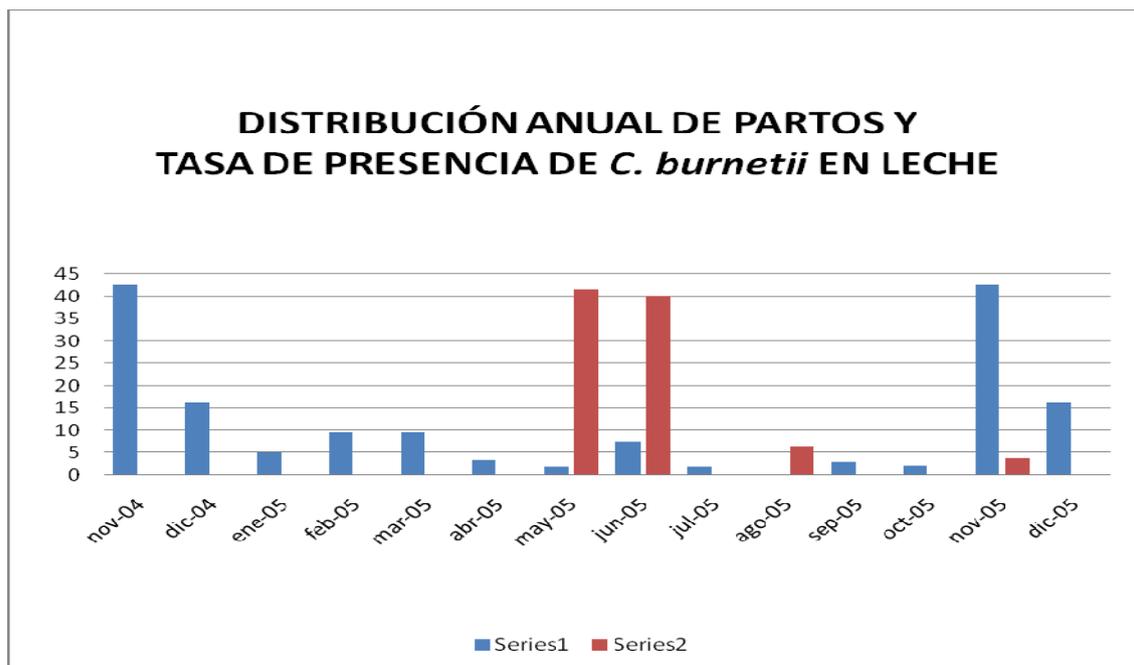
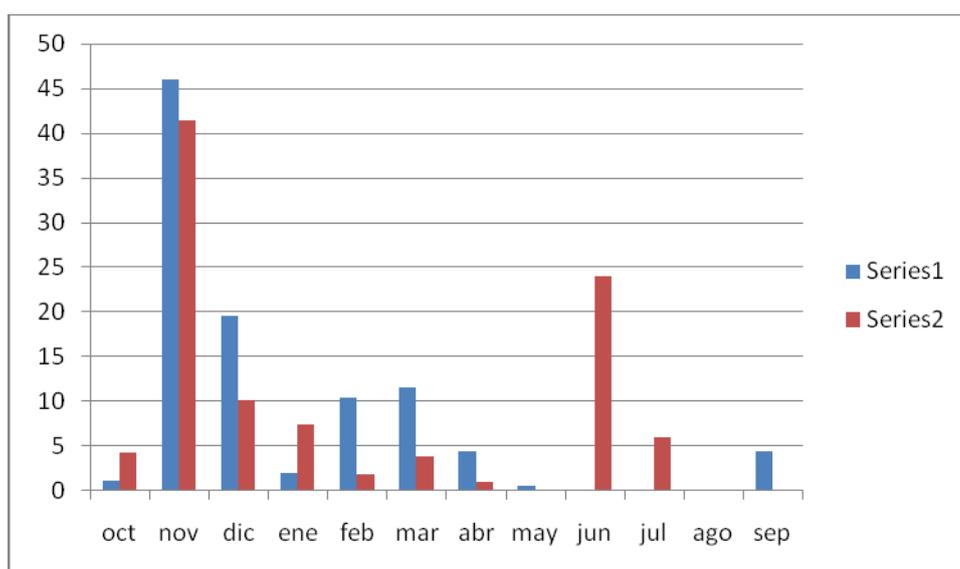


Figura 23. Distribución anual de partos (serie azul) y tasa de presencia de *C. burnetii* en muestras de leche (serie roja) en Lanzarote. Datos expresados en porcentaje.

En el gráfico representado en la figura 24 se puede observar la distribución de los partos en las granjas encuestadas englobadas en la zona de riesgo o centro-norte (serie azul) y en la zona de menor riesgo o centro-sur (serie roja).

Figura 24. Distribución mensual de partos en las ganaderías encuestadas por zonas.



Zona de riesgo (azul); zona de menor riesgo (rojo).

H. Presencia de artrópodos.

En la tabla 29 se relacionan las zonas de presencia de artrópodos con las zonas en las que están situadas las granjas encuestadas, según la zona y la orografía de la zona, mostrándose en la tabla 30 el análisis estadístico realizado para cada una de las variables propuestas.

Tabla 29. Presencia de artrópodos frente a orografía y a situación geográfica de las ganaderías encuestadas.

OROGRAFÍA	FREC. ABSOLUTA/(%)	ZONA*	FREC. ABSOLUTA/(%)
PLANICIE	3/7 (42.9)	NORTE	2/2 (100.0)
VALLE	3/4 (75.0)	ESTE	0/2 (0)
MONTAÑA	2/4 (50.0)	CENTRO	5/10 (50.0)
HOYA	2/2 (100.0)	OESTE	2/3 (66.7)
RELIEVE SUAVE	0/2 (0)	SUR	1/2 (50.0)

*F. Pascual, 1994.

Tabla 30. Presencia de garrapatas en las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	<i>p</i>
Zona con presencia de garrapatas.		
Zona de riesgo (centro-norte)	7/12 (58.33%)	0.649 ^{F*}
Zona centro-sur	3/7 (42.86%)	

*^F Test exacto de Fisher.

I. Alimentación

También se han registrado datos sobre la alimentación del ganado caprino en las ganaderías encuestadas, los cuales se presentan en la tabla 31 en forma de frecuencias absolutas y relativas. De nuevo, se cruzan los datos de alimentación en cuanto al aporte de alimentos concentrados y de forrajes de fibra larga frente a la zona que pertenecen las granjas, siendo los hipotéticos factores de riesgo propuestos en este caso, el que se suministren más de 2 kg de concentrado por animal y día y, que no se aporte fibra larga, con lo cual, los animales han de obtener este recurso

mediante el pastoreo, lo cual, dado lo árido de los pastos, es imposible (Plan Director Ganadero de Canarias, capítulo XIV, Subsectores Caprino de Leche y de Caprino de Carne, 2000).

Tabla 31. Variables relacionadas con el racionamiento en las explotaciones ganaderas encuestadas.

FACTORES DE RIESGO POTENCIALES	FRECUENCIAS ABSOLUTAS / FRECUENCIAS RELATIVAS (%)	p
Racionamiento de concentrados. Riesgo: Más de 2 Kg/animal/día.		
Zona de riesgo (centro-norte)	7/12 (58.33%)	0.333 ^{F*}
Zona centro-sur	6/7 (85.71%)	
Racionamiento de forrajes. Riesgo: que no haya aporte de forrajes		
Zona de riesgo (centro-norte)	8/12 (66.67%)	1.000 ^F
Zona centro-sur	4/3 (57.14%)	

*^F Test exacto de Fisher.

4.3. MÉTODO MATEMÁTICO PROPUESTO PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD DE LA TRANS-PCR A TIEMPO REAL TRAS SU APLICACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE *Coxiella burnetii* EN MUESTRAS CLÍNICAS DE LECHE DE CABRA EN LA ISLA DE LANZAROTE.

Según los datos observados de ciclo umbral para las muestras de campo positivas (56 muestras de un total de 405 analizadas), la media poblacional para los animales positivos para esta variable se situaría en el siguiente intervalo de confianza (IC 95%; 36.26 ± 0.79), siendo el valor mínimo detectado (máxima concentración de *C. burnetii*) de 27.27 ciclos y el máximo (mínima concentración de *C. burnetii*) de 43.19 ciclos.

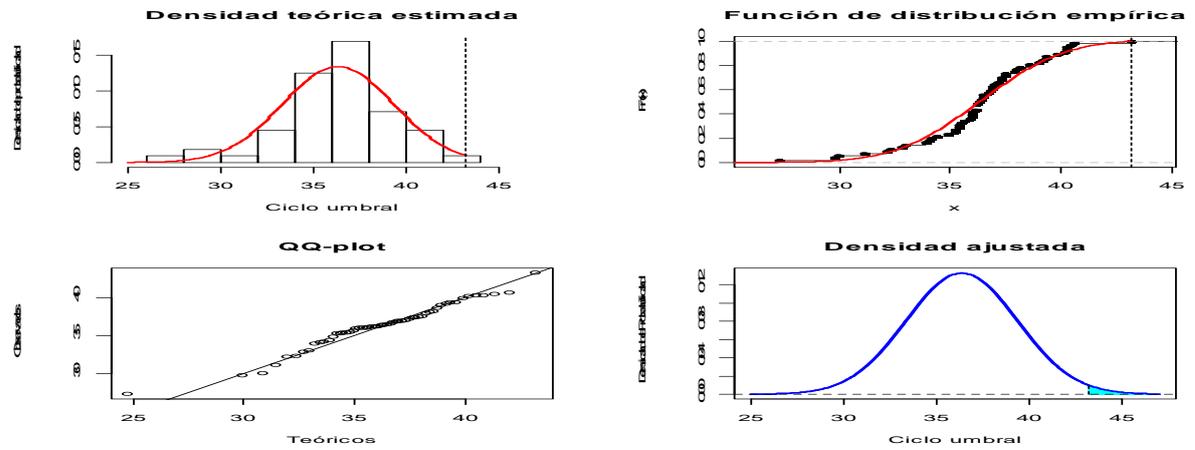
A continuación se muestra un resumen de los resultados obtenidos, mostrándose para los supuestos a y b sendas tablas resumen (tablas 31 y 32) y los gráficos obtenidos para el ajuste de cada tipo de distribución de probabilidad conocida (figuras 25 y 26).

Tabla 32. (Supuesto A) Estudio del ajuste estadístico de los datos observados a distribuciones de probabilidad conocidas teniendo en cuenta todos los datos, siendo el ciclo umbral máximo observado 43.2.

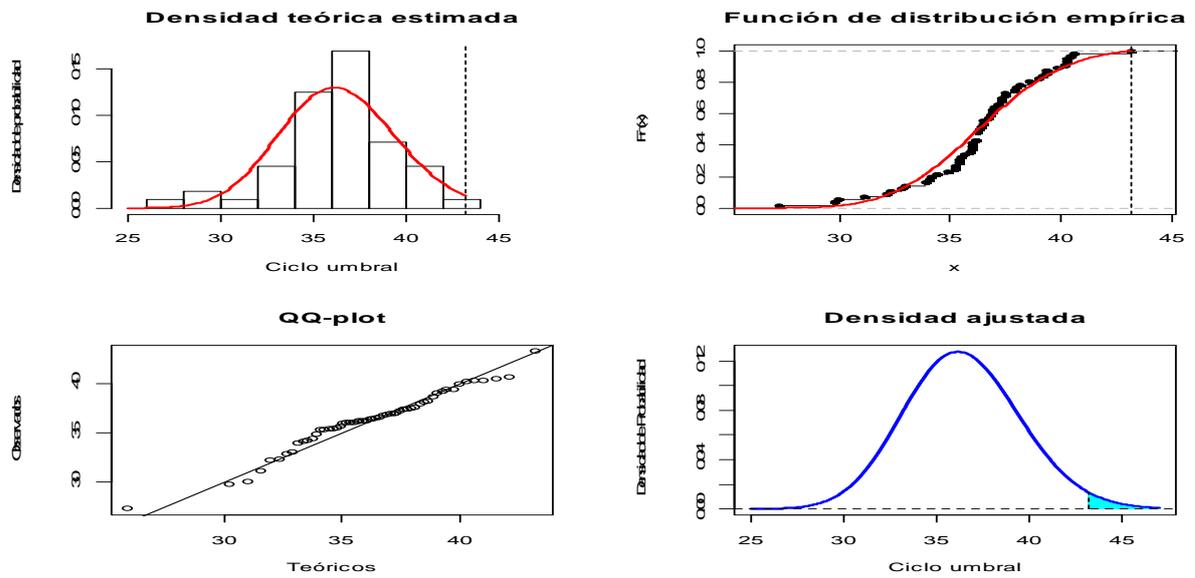
DISTRIBUCIÓN DE PROBABILIDAD	PARÁMETROS ESTIMADOS	PROBABILIDAD DE FALSOS (-)	Komogorov-Smirnov (valor p)	Anderson-Darling (valor p)	HIPOTÉTICAS DETENCIONES DE LA Trans-PCR a tiempo real (PROBABILIDAD FALSO (-))
"NORMAL"	36.355048 3.009514	0.01147	0.9352885 (0.0154)	AD 13.2002619 (0.0058) AD2 0.7881648 (0.0276) ADup 1311.2532207 (0.0048)	36 ciclos (0.546956) 38 ciclos (0.292332) 40 ciclos (0.11292)
"GAMMA"	134.694232 3.698067	0.01938	1.0091174 (0.0078)	AD 11.3214834 (0.0094) AD2 0.9367325 (0.0146) ADup 966.4754621 (0.0066)	36 ciclos (0.542414) 38 ciclos (0.30011) 40 ciclos (0.128607)
"LOGÍSTICA"	36.482171 1.649292	0.016739	0.6792086 (0.1530)	AD 13.1703884 (0.0098) AD2 0.4916801 (0.1578) ADup 1305.3578169 (0.0052)	36 ciclos (0.572571) 38 ciclos (0.284899) 40 ciclos (0.105937)
"GUMBEL"	35.677065 4.110796	0.148203	1.136154 (0.0004)	AD 6.614785 (0.0278) AD2 1.862796 (0.0000) ADup 334.627023 (0.0224)	36 ciclos (0.60325) 38 ciclos (0.43352) 40 ciclos (0.294872)
"WEIBULL"	14.14388 37.55607	0.000714	0.7825614 (0.1116)	AD 32.2579852 (0.0008) AD2 0.7427837 (0.0502) ADup 7794.3125620 (0.0002)	36 ciclos (0.577165) 38 ciclos (0.307028) 40 ciclos (0.087226)
"LOGONORMAL"	3.59279353 0.08840189	0.025144	1.042833 (0.0050)	AD 10.532147 (0.0124) AD2 1.020836 (0.0066) ADup 837.380832 (0.0092)	36 ciclos (0.541778) 38 ciclos (0.306185) 40 ciclos (0.138536)

Figura 25. Supuesto A. Gráficos obtenidos para cada tipo de distribución de probabilidad en el ajuste. Ciclo umbral máximo observado 43.2.

"NORMAL".



"GAMMA".



"LOGÍSTICA".

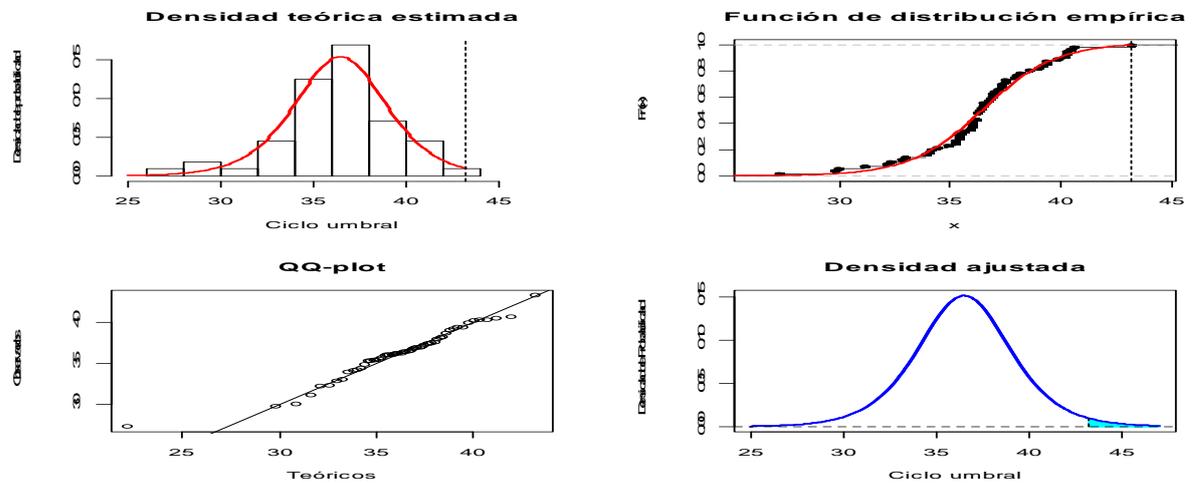
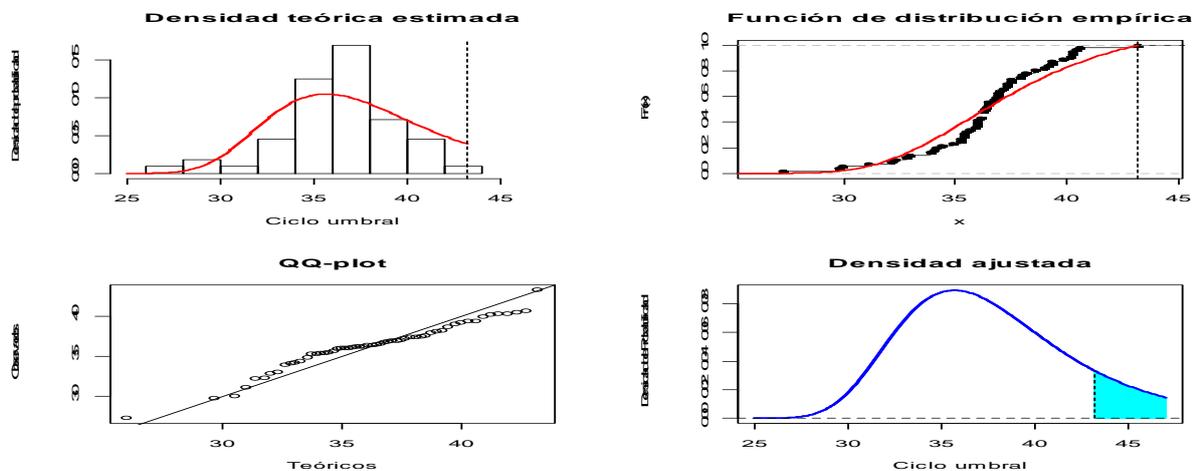
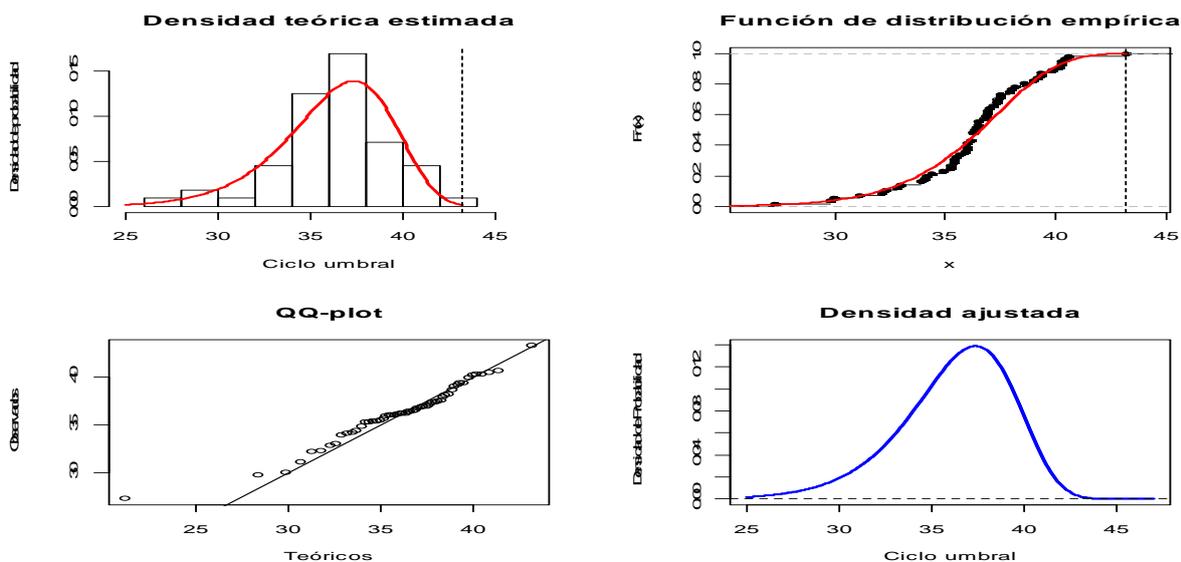


Fig. 25. Supuesto A. Gráficos obtenidos para cada tipo de distribución de probabilidad en el ajuste. Ciclo umbral máximo observado 43.2 (continuación).

"GUMBEL".



"WEIBULL".



"LOGONORMAL".

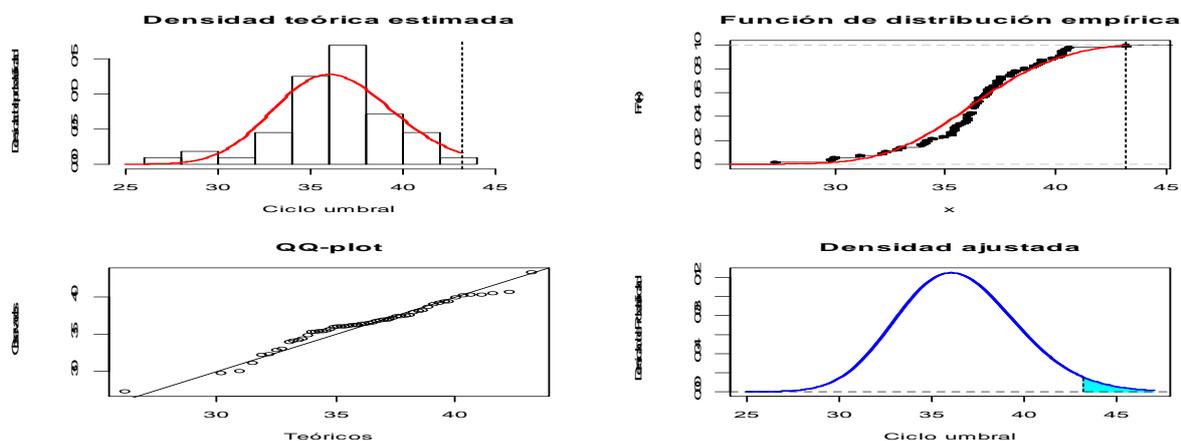
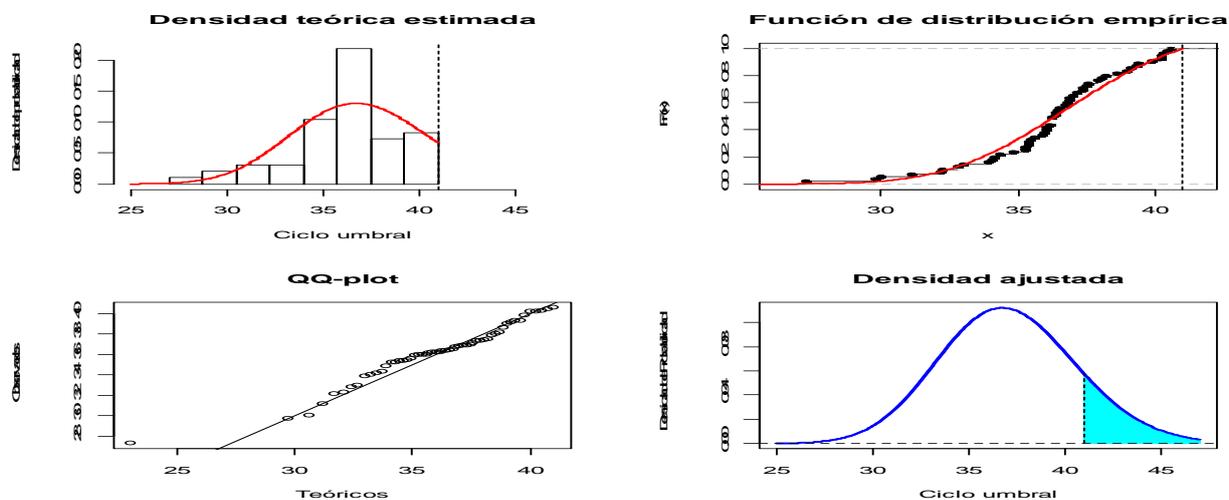


Tabla 33. (Supuesto B) Estudio del ajuste estadístico de los datos observados a distribuciones de probabilidad conocidas teniendo en cuenta todos los datos, siendo el ciclo umbral máximo observado 41.0.

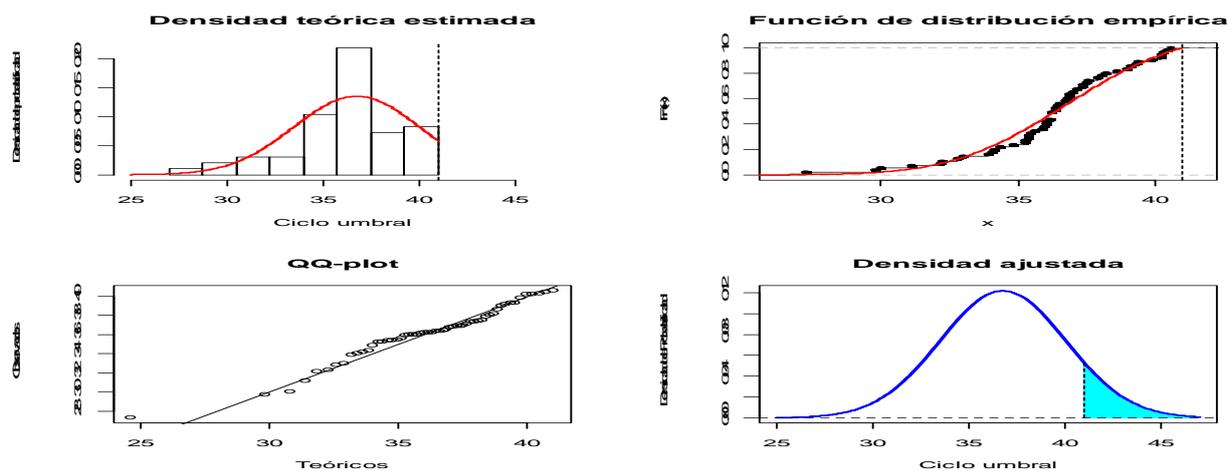
DISTRIBUCIÓN DE PROBABILIDAD	PARÁMETROS ESTIMADOS	PROBABILIDAD DE FALSO (-)	Komogorov-Smirnov (valor p)	Anderson-Darling (valor p)	HIPOTÉTICAS DETENCIONES DE LA Trans-PCR a tiempo real
"NORMAL"	36.769888 3.280718	0.098632	0.8660628 0.0360	AD 2.6063245 0.2388 AD2 0.6743581 0.0618 ADup 7.4161985 0.5104	36 ciclos 0.592768 38 ciclos 0.353848 40 ciclos 0.162417
"GAMMA"	107.642940 2.903048	0.137314	0.9087566 0.0184	AD 3.1168017 0.1646 AD2 0.7609069 0.0364 ADup 7.4161985 0.5038	36 ciclos 0.607481 38 ciclos 0.38683 40 ciclos 0.203652
"LOGÍSTICA"	36.704782 1.765937	0.080746	0.6784077 0.1540	AD 1.6136109 0.6876 AD2 0.4639496 0.1836 ADup 7.4161985 0.5064	36 ciclos 0.598471 38 ciclos 0.324439 40 ciclos 0.134007
"GUMBEL"	37.397285 5.216624	0.394236	0.9301463 0.0146	AD 3.1305218 0.1548 AD2 1.1327514 0.0118 ADup 7.4161985 0.4966	36 ciclos 0.729411 38 ciclos 0.589708 40 ciclos 0.455116
"WEIBULL"	15.20569 37.49905	0.020541	0.7185369 0.1750	AD 2.0761082 0.3950 AD2 0.6016365 0.0940 ADup 10.4986154 0.4052	36 ciclos 0.584055 38 ciclos 0.294173 40 ciclos 0.069315
"LOGONORMAL"	3.6138862 0.1012029	0.16231	0.9273720 0.0174	AD 3.3400795 0.1414 AD2 0.8089102 0.0308 ADup 7.4161985 0.5180	36 ciclos 0.617935 38 ciclos 0.407422 40 ciclos 0.229341

Figura 26. Supuesto B. Gráficos obtenidos para cada tipo de distribución de probabilidad en el ajuste. Ciclo umbral máximo observado 41.0.

“NORMAL”.



“GAMMA”.



“LOGÍSTICA”.

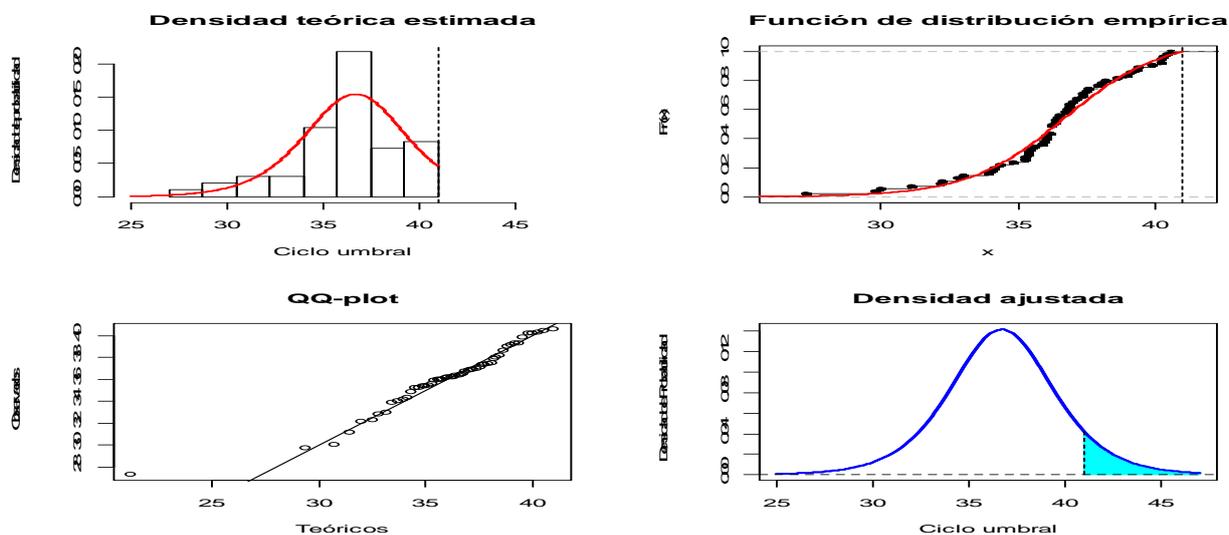
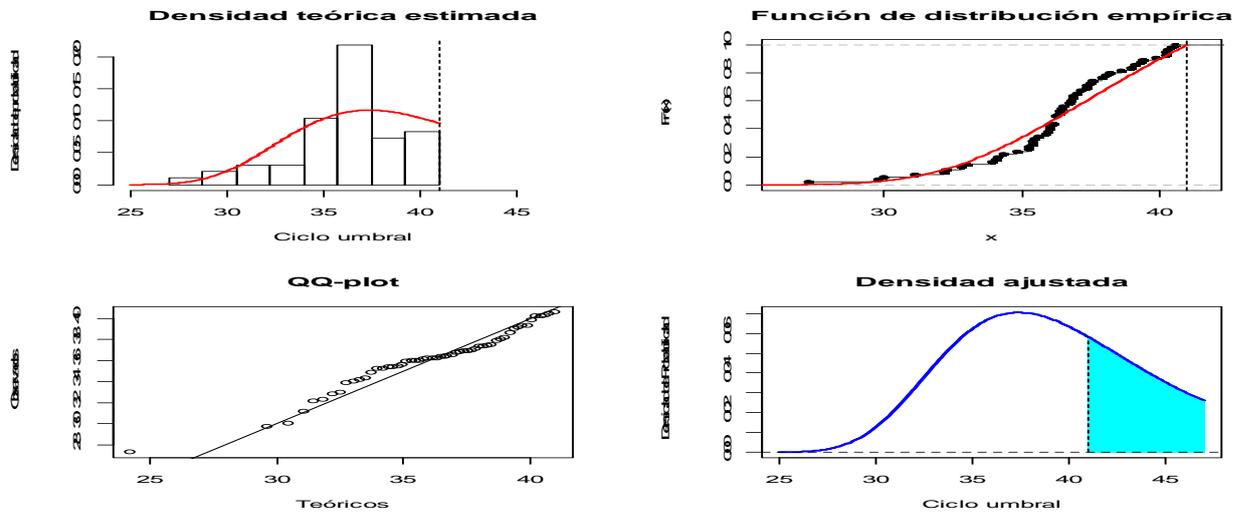
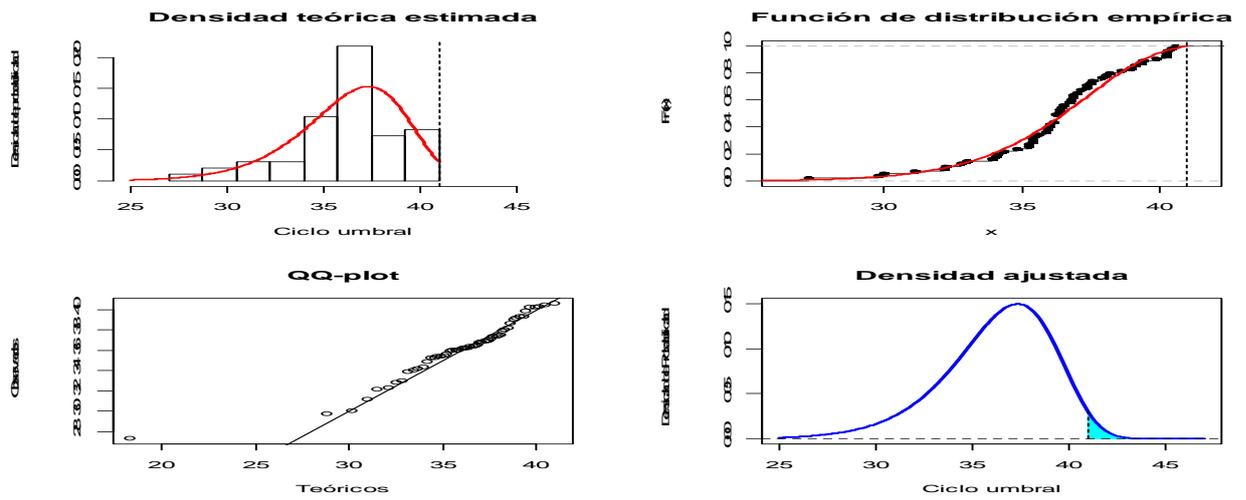


Figura 26. Supuesto B. Gráficos obtenidos para cada tipo de distribución de probabilidad en el ajuste. Ciclo umbral máximo observado 41.0.

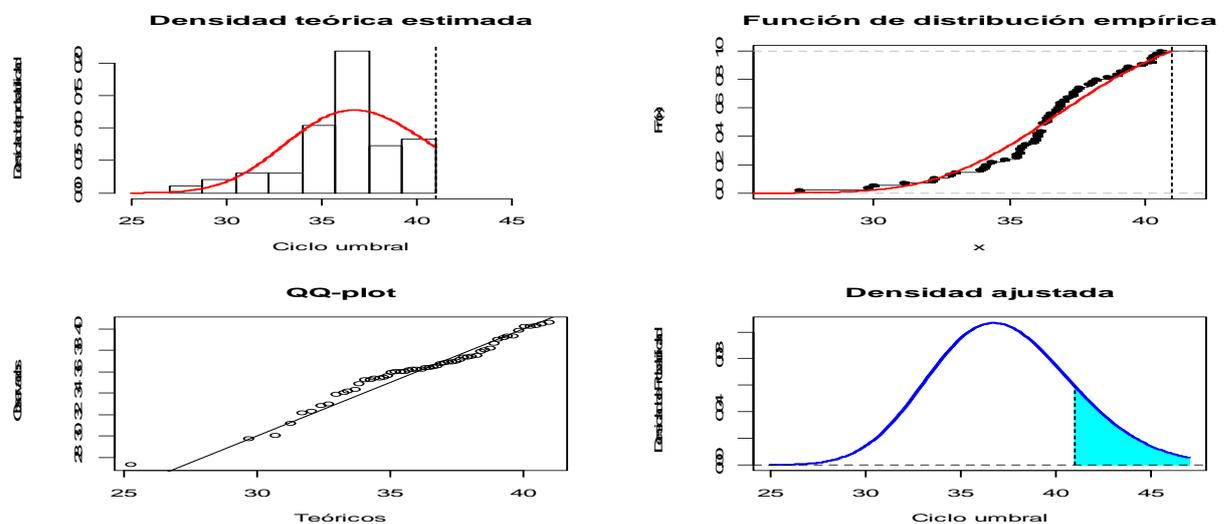
"GUMBEL".



"WEIBULL".



"LOGONORMAL".



Tras la realización de los diferentes ajustes obtenemos los siguientes resultados:

- En general el grado de ajuste es peor cuando se fija el umbral en 43.2 ciclos. En cualquier caso, la distribución que mejor se ajusta es la logística, con p-valores del orden de 0.15 tanto para KS como para AD2. También podría aceptarse que los datos siguen una distribución de Weibull, si bien en este caso el p-valor es sensiblemente peor (0.11 para KS, 0.0502 para AD2) (tabla 33).
- El grado de ajuste mejora cuando se consideran sólo los valores observados hasta el ciclo umbral 41.00. En este caso, el mejor ajuste vuelve a obtenerse cuando se utiliza la distribución logística, seguida de nuevo por la Weibull (tabla 34).
- Como resumen de los dos puntos anteriores, lo más razonable parece asumir que los datos del ciclo umbral se ajustan a una distribución logística, siendo la tasa de falsos negativos en este caso del 8.07%, con lo cual, tendríamos una sensibilidad para la Trans-PCR a tiempo real en nuestro caso concreto del 91.93%.
- Si en vez de realizar 45 ciclos en la fase de amplificación del ADN muestral como hemos realizado en nuestro estudio, o 41 ciclos, que es el valor al que se ajusta mejor los datos observados a una distribución de probabilidad de tipo logístico, realizáramos protocolos con menor número de ciclos, se puede observar que los valores de sensibilidad de la Trans-PCR a tiempo real empeoran considerablemente (tablas 33 y 34). Concretamente, y teniendo en cuenta los datos obtenidos por nosotros en el ajuste para la distribución logística en el Supuesto A (ciclo umbral máximo 41.0 ciclos), la probabilidad de obtener falsos negativos tras el análisis de las muestras mediante Trans-PCR a tiempo real aumentaría a medida que disminuimos el número de ciclos en el protocolo de amplificación de la siguiente manera (tabla 30): a. disminución a 40 ciclos la probabilidad de obtener falsos negativos aumentaría hasta el 13.40%; a 38 ciclos la probabilidad de obtener falsos negativos aumentaría hasta el 32.44%; a 36 ciclos la probabilidad de obtener falsos negativos aumentaría hasta el 59.85%.

Discusión

5. DISCUSIÓN

“El azar no existe; Dios no juega a los dados”

Albert Einstein

5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA A TIEMPO REAL (Trans-qPCR) PARA LA DETECCIÓN DE *Coxiella burnetii*

5.1.1. EVALUACIÓN DEL CONTROL POSITIVO DE *Coxiella burnetii*

La concentración de ADN determinada tras los ensayos de evaluación mediante espectrofotometría del control positivo de *Coxiella burnetii* Nine Mile ($8,01 \times 10^9$ células/ml) está cercana a la descrita por Berri y cols. (2000) que obtienen este tipo de controles a partir de cultivos celulares y que citan concentraciones aproximadas de ADN de *Coxiella* equivalentes a 10^{10} células/ml.

5.1.2. CEBADORES Y Trans-PCR A TIEMPO FINAL

Los cebadores utilizados en el presente estudio fueron diseñados para la realización de Trans-PCRs convencionales o de punto final (Houver y cols., 1992). Como era de esperar y en base a lo descrito por los anteriores autores, el producto de la PCR convencional dio como resultado una única banda de peso molecular de 687 bp, no produciendo ninguna banda para las muestras negativas.

5.1.3. ANÁLISIS DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN. SENSIBILIDAD OBTENIDA EN AMBOS TIPOS DE Trans-PCR (DE PUNTO FINAL Y A TIEMPO REAL)

La utilización de fluorocromos inespecíficos como el Syber-Green® permiten el uso de cebadores diseñados para las PCRs convencionales en las PCRs a tiempo real (Costa, 2004). Por un lado, hemos podido apreciar que la temperatura de fusión detectada para las muestras positivas de campo y para el control positivo han permitido una clara diferenciación entre las muestras positivas y aquellas muestras cuya amplificación dio lugar a la aparición de dímeros y/o productos inespecíficos, lo cual se muestra de interés de cara a la especificidad de la prueba (Costa, 2004). Por otra parte, las bandas obtenidas tras la Trans-PCR a punto final se han correspondido con los pesos moleculares esperados (Berri y cols., 2000).

En la adaptación de la PCR de tiempo final a tiempo real se optó por ampliar el número de repeticiones del ciclo 2 de 40 a 45 veces. Esta segunda versión se mostró, tras una serie de ensayos previos, como la mejor opción para la amplificación de las muestras de ADN problema para nuestro caso concreto.

En cuanto a los resultados de sensibilidad hallados en el presente estudio tenemos por un lado, los obtenidos con el aislamiento de referencia *C. burnetii* cepa Nine Mile durante la fase de puesta a punto de la técnica y, por el otro, los obtenidos tras el análisis probabilístico realizado con los datos de ciclo umbral detectados en las muestras positivas durante la aplicación de esta técnica al diagnóstico de las muestras de campo (ver punto 3.3).

Como se pudo apreciar en el capítulo de resultados, la concentración mínima de *C. burnetii* cepa Nine Mile detectada durante los ensayos realizados en la puesta a punto de la Trans-PCR a tiempo real fue de aproximadamente 8.01×10^3 células de *C. burnetii* por ml, siendo el ciclo umbral detectado para esta concentración bacteriana de 38.82. De otro lado, los valores mínimos de concentración de *C. burnetii* Nine Mile detectados en el ensayo de la Trans-PCR de punto final, es decir, una vez se corrieron los productos de las diferentes muestras amplificadas en el gel de agarosa al 1,5%, se situaron en torno a 8.01×10^4 células/ml. Luego, según los resultados obtenidos, la Tras-PCR a tiempo real se ha mostrado más sensible que la Trans-PCR de punto final. Esto ha sido constatado también por otros autores que afirman que este fenómeno se debe a que, a medida que van transcurriendo los ciclos de amplificación del ADN muestral, aumenta la probabilidad de que el producto de la amplificación se vaya degradando, con lo cual, cuando se intenta detectar este producto haciéndolo correr en un gel de agarosa y tras la tinción del mismo con bromuro de etidio, se corre el riesgo de que una parte del ADN amplificado se haya perdido previamente, redundando esto, lógicamente, en una disminución de la sensibilidad de la técnica de la Trans-PCR de punto final (Freeman, 1999; Raeymaekers, 2000; Costa, 2004).

Sin embargo, los resultados de sensibilidad obtenidos tras la puesta a punto en el laboratorio de la técnica, tanto a punto final como a tiempo real, son mejorables. Probablemente, esto se deba a una mejora en el diseño de los cebadores de cara a su utilización en la PCR a tiempo real y a la utilización de métodos de extracción más eficaces, entre otras mejoras posibles (Berri y cols., 2000; Costa, 2004; Klee y cols., 2006; Vaidya y cols., 2008).

Lorenz y colaboradores en 1998, situaban el límite de detección de *C. burnetii* en muestras de leche de vaca con la Trans-PCR-sílíce de punto final en 5×10^2 células/ml. Por otra parte, Berri y colaboradores (2000), compararon los resultados de la Trans-PCR de punto final variando el método de extracción del ADN muestral. En este estudio se utilizaron tres métodos de extracción: en primer lugar, realizaron un tratamiento de las muestras con proteinasa K obteniendo una sensibilidad que permitía detectar hasta 10^6 células/ml, en segundo lugar, procedieron a realizar la centrifugación de las muestras a 13000 g. durante 60 minutos + tratamiento con proteínasa K, pudiendo detectar una concentración mínima de 10^4 células/ml y, por último, procedieron realizando una purificación previa con el kit QIAmp Tissue + centrifugación a 13000 g durante 60 min. + el tratamiento con proteínasa K, método de extracción con el que lograron detectar muestras de leche de oveja contaminadas con tan solo 10 bacterias/ml.

Siguiendo con este estudio comparativo de la sensibilidad de la Trans-PCR a tiempo real, Vaidya y colaboradores (2008) analizaron un total de 368 muestras de 74 mujeres que mostraron aborto espontáneo y, realizaron una comparación entre la sensibilidad de la Trans-PCR convencional, la Trans-PCR a tiempo real, la inmunofluorescencia indirecta (IFA) y el cultivo bacteriano, de cara al diagnóstico de *C. burnetii* en este tipo de muestras. La inmunofluorescencia detectó que el 25.68% de las mujeres que abortaron eran positivas mientras, que ambos tipos de Trans-PCR (de punto final y a tiempo real) solo detectaban al 21.62% de los casos de aborto como positivos. En este estudio también se comparó la sensibilidad de la Trans-PCR de punto final y a tiempo real con los resultados obtenidos para el cultivo de *C. burnetii*, tomando como referencia a la técnica más sensible en este caso, la inmunofluorescencia indirecta, obteniendo que ambos tipos de PCR eran más sensibles que el cultivo bacteriano (84.21% enfrente a 26.31%, respectivamente). Asimismo, se observó que la Trans-PCR a tiempo real era ligeramente más sensible que la Trans-PCR convencional o de punto final. Esta última observación también ha podido ser avalada en este estudio. El método de extracción utilizado en esta ocasión, fue el descrito por Berri y colaboradores (2000): kit QIAmp Tissue + centrifugación a 13000 g durante 60 min. + tratamiento con proteínasa K. El tipo de PCR a tiempo real utilizado en este caso se basó en la acción de fluorocromos inespecíficos.

Klee y colaboradores (2006), aplicando la técnica Taqman-PCR a tiempo real, basada en la amplificación de la región IS1111, lograron detectar una concentración

mínima de genoma equivalente a detectar 17 células de *C. burnetii* por μl y reacción (ensayo realizado con el aislamiento de referencia Nine Mile RSA493), cuando aplicaban un método en el que se creaba una curva estándar para cuantificar el número de células de la dilución problema basado en el análisis de diluciones seriadas de plásmidos estándar clonados que contenían fragmentos IS1111. El método de extracción en esta ocasión fue el siguiente: aplicación de solución amortiguadora de lisis ATLTissue Lysis Buffer + inactivación + extracción con DNeasy Tissue Kit.

Al analizar las muestras de campo, se vio que era crucial el análisis de la temperatura de fusión de las diferentes diluciones seriadas analizadas. Este parámetro nos permite diferenciar, de entre las muestras amplificadas que han pasado el umbral de fluorescencia, cuales son realmente positivas a la prueba y cuales presentan una amplificación de un producto de ADN que no se corresponde con la región de ADN que se está intentando identificar (Costa, 2004). Es decir, nos permite diferenciar aquellas muestras verdaderamente positivas de los dímeros de cebadores o muestras en las que se han obtenido, fruto de la amplificación de ADN realizada, productos inespecíficos de ADN que no se corresponden con los deseados (falsos positivos). Dicho análisis se completó con el análisis de la temperatura de fusión realizado para las muestras de campo .

5.2. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA PRESENCIA DE *Coxiella burnetii* EN LECHE DE CABRA EN LA ISLA DE LANZAROTE.

En este estudio, el total de granjas de más de 100 cabezas de la isla por municipios se dividió en estratos diferentes: de 100 a 300 cabezas; de más de 300 y menos de 500; de más de 500 cabezas. Esta división se efectuó con el fin de diferenciar los tipos de manejos del ganado caprino existentes en esta isla: el primer estrato representaría una caprinocultura más tradicional mientras que el tercer estrato representaría una caprinocultura más industrial, siendo el segundo estrato, un estrato de transición.

Se pretendió realizar un cuestionario que economizara el tiempo de respuesta con el fin de abordar todos los aspectos incluidos en el mismo en un tiempo no superior a media hora. De esta manera se pretendió no abusar de la amabilidad dispensada por el encuestado y de no causar un cansancio que se pudiera traducir en una mala interlocución y/o falta de interés de cara a las respuestas. Esto se logró, en gran medida, gracias a que muchas preguntas fueron diseñadas con respuestas cerradas que, en determinadas preguntas, se abrían para casos que luego se mostrarían como excepcionales con la típica categoría de volcado de OTRAS RESPUESTAS POSIBLES. Esto a su vez facilitó el posterior ordenamiento y almacenamiento de los datos obtenidos (Thrusfield, 1990; Lithg-Pereira y cols., 2004).

Por otra parte, las preguntas se leyeron de manera literal y se explicaron aquellos conceptos más complicados en la jerga típica del gremio ganadero con el fin de facilitar la interlocución, no dando pie a diálogos, expresiones o comportamientos que pudieran influir en la respuesta del encuestado. En todo caso, se ha procurado en la estructuración de las preguntas, buscar sencillez y claridad. En todo momento se pretendió lograr un ambiente distendido que aumentara la tasa de respuesta pero a la vez, tranquilo, con el fin de lograr una máxima concentración en las tareas de interlocución (Thrusfield, 1990; Lithg-Pereira y cols., 2004).

En cuanto a la secuencia de preguntas llevada a cabo en el diseño del cuestionario, decir que esta se ha organizado en bloques en función de los diferentes temas abordados. Esto ha propiciado que, en cada momento, el encuestado se concentrara en los diferentes temas tratados, con lo cual, se economizaba tiempo sin entrar en indeseadas rutinas que pudieran llevar a respuestas poco rigurosas o inválidas. Esta secuencia facilitó posteriormente la informatización y/o análisis de los

datos registrados (Thrusfield, 1990; Lithg-Pereira y cols., 2004).

La elección del título del presente cuestionario buscó, ante todo, el ser claro, sencillo y en ningún momento se relacionó este con la enfermedad. La razón por la que se optó por no hacer figurar el nombre de la enfermedad en el título era básicamente la de evitar alertar al ganadero innecesariamente. En cualquier caso, en las presentaciones previas a la realización de las entrevistas, además de informar sobre quiénes éramos se daba una breve información sobre nuestros objetivos y cuál era la finalidad del presente cuestionario, siempre en un marco que hiciera que el encuestado se sintiera copartícipe del trabajo que realizábamos (Thrusfield, 1990; Lithg-Pereira y cols., 2004).

5.2.1. EVOLUCIÓN DE LOS CENSOS DE LAS POBLACIONES HUMANA Y CAPRINA Y DE LA PRESENCIA DE FIEBRE Q EN LA ISLA DE LANZAROTE.

Un aspecto de la población caprina de Lanzarote que resulta de interés destacar con respecto a su probable importancia en la epidemiología de la fiebre Q es la evolución del censo de esta especie en la isla desde el año 1991 hasta el año 2005 (año en el que se realizó el muestreo del presente estudio). En el año 1991, cuyo censo oficial sirvió de referencia para el estudio seroepidemiológico de fiebre Q de PASCUAL (1994), el censo total del subsector caprino de Lanzarote era de 9.787 cabezas, mientras que en el año 2005, el censo total ascendía 24.778 cabezas aproximadamente (es decir, 2.53 veces el censo de 1991). A este incremento importante del censo hemos de añadir la concentración del mismo en explotaciones de más de 100 cabezas ya que, el 56.52% del censo total de 2005 pertenece a este tipo de explotaciones y, como se ha visto, según los datos de la encuesta realizada en el presente estudio, el 89.5 % de estas explotaciones tienen a otra ganadería de caprino a menos de 5 km, el 52.6% tiene a una explotación de otra especie a menos de 5 km y el 100% tienen a un núcleo de población humana a menos de 5 km. Además, y como se ha visto en el apartado de resultados, en la población diana del presente estudio, el 33.1% de las granjas albergan al 67.7% del ganado censado para las granjas de más de 100 cabezas (Censos Oficiales de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación del Gobierno de Canarias).

Por otro lado, tenemos la evolución del censo de la población humana en Lanzarote entre los años 1992 y 2005 (Instituto Canario de Estadística, 2009). La población de Lanzarote creció en este periodo de tiempo desde los 68.581 habitantes del año 1992 hasta los 123.039 habitantes registrados en el año 2005 (es decir, el

número de habitantes residentes oficiales se incrementó en 1,79 veces en este periodo de tiempo). Estos datos demográficos unidos a los citados en el párrafo anterior en relación a la evolución y distribución de las poblaciones de ganado caprino en la isla de Lanzarote, nos sitúan en un escenario en el que es lógico pensar que las tasas de presencia de la fiebre Q, tanto en las poblaciones animales como en la humana, tenderán a mantenerse o inclusive, a incrementarse en Lanzarote de no aplicar un Plan de Lucha y Control contra la enfermedad que incluya medidas específicas contra la misma como la aplicación de planes vacunales para la inmunización de las poblaciones de ungulados domésticos y del personal de alto riesgo laboral y otras, más de carácter general, como las relacionadas con el manejo y las tareas L.D.D. citadas hasta ahora (Htwe, y cols., 1993 ; Arricau-Bouvery y Rodolakis, 2005; Delsing y Kullberg, 2008).

Como se ha podido apreciar en el apartado de resultados, en la primera parte del estudio inferencial realizado, se observó que la zona formada por los municipios de Haría, Teguise y Tías presentaban una tasa de presencia en leche de *C. burnetii* que triplicaba (3,3 veces) a la de las granjas situadas en la zona centro-sur (municipios de San Bartolomé, Tinajo, Arrecife y Yaiza). Luego la distribución zonal de las granjas propuesta en el presente estudio con respecto al riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche en la estación de menor presencia de *C. burnetii* en leche, es otro factor que, junto a la estacionalidad ($p < 0.009$), se ha podido relacionar directamente con las tasas de presencia del agente causal de la Fiebre Q en leche obtenidas en el presente estudio, si bien para la distribución zonal propuesta no se ha logrado obtener una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.121$) mediante el test exacto de Fisher.

En el estudio seroepidemiológico sobre la fiebre Q realizado por Pascual (1994), tras analizar un total de 2.328 sueros que fueron extraídos en 25 ganaderías de caprino de la isla de Lanzarote, que contaban con más de 100 cabezas, el autor llegó a la conclusión de que la enfermedad era endémica en el ganado caprino de la isla, con una seroprevalencia media detectada del 32.73%, siendo la técnica utilizada la inmunofluorescencia indirecta, habiendo muestreado sobre el 23.7% de las cabezas censadas en el año 1991 y realizándose la extracción de las muestras durante el primer semestre de 1992. Asimismo, se observó que las granjas del municipio de Haría presentaban una seroprevalencia significativamente menor a la encontrada en el resto de zonas de la isla (19.70% detectada en Haría frente al 34.51% detectada en el resto de zonas de la isla; Ji^2 24.00, $p < 10^{-6}$). Dicha diferencia de seroprevalencias entre zonas se explicó, por parte del autor, argumentando que

existían ganaderías que no importaban cabras de otras localizaciones y que dichos animales se explotaban en un régimen extensivo, suponiendo estas ganaderías, el 50 % de las analizadas en Haría, mientras que, en el resto de zonas, no existían granjas con estas características. El régimen de explotación extensivo y el aislamiento de estos ganados, eran propuestos por el autor, como factores que disminuían el riesgo de los mismos a padecer la fiebre Q.

Sin embargo, en la encuesta realizada en el presente estudio, el régimen de explotación de los ganados encuestados era el intensivo (tan solo en 1 de las 19 explotaciones encuestadas) y el intensivo con salidas al campo de los animales (presente en el resto de explotaciones encuestadas). Es probable que estos cambios de los sistemas de manejo y del tráfico de animales hayan influido en la distribución geográfica de la enfermedad hasta llegar a la situación observada en el presente estudio. En cualquier caso, las seroprevalencias diagnosticadas en las cuatro granjas de Haría analizadas por Pascual en 1992 fueron del 5.68%, 3.70%, 44.87% y 40.74%. Estos resultados nos hablan de una clara influencia de las dos granjas con características excepcionales, citadas en el apartado anterior, en el resultado global calculado para la zona norte o municipio de Haría (Pascual, 1994). Si solo tenemos en cuenta los valores de las granjas analizadas en el citado estudio con características de manejo y de importación de animales similares a las actuales, tendríamos un valor medio para la seroprevalencia de ambas granjas del 42.81%, con lo cual, se observa un valor que es claramente superior a la seroprevalencia media encontrada en dicho estudio para el resto de zonas de la isla.

Por otra parte, resaltar una vez más que, los cálculos realizados para hallar las zonas de riesgo establecidas en el presente estudio, se han hecho a partir de los datos registrados en la estación de menor riesgo. Estudios futuros deberán establecer cuál es la situación de riesgo en las diferentes zonas estudiadas en la estación de mayor riesgo y determinar si esta se mantiene con respecto a los resultados hallados para la estación de menor riesgo en nuestro trabajo. En nuestro caso concreto, tras analizar un total de 98 muestras provenientes de 4 granjas de más de 500 cabezas (estrato 3) en la estación de mayor riesgo, hemos observado una tasa de presencia de *C. burnetii* en leche muy similar entre la zona estimada de mayor riesgo (centro-norte) para la estación de baja presencia de *C. burnetii* en leche y la zona de menor riesgo (centro-sur), siendo dichas tasas de presencia del 41,51% para la zona centro-norte y del 40% para la zona centro-sur.

Como se puede apreciar, el valor detectado para la tasa de presencia de *C.*

burnetii en leche en el presente estudio en la estación de mayor riesgo supera el valor de la seroprevalencia determinado por Pascual en 1992. Lógicamente, el número de granjas chequeadas en el presente estudio durante la estación de mayor riesgo es inferior al número de granjas chequeadas por Pascual durante su estudio (4 enfrente a 25 explotaciones). Veamos a continuación, una tabla comparativa que enfrenta a las tasas de presencia en leche de *C. burnetii* detectadas en el presente estudio enfrente a la seroprevalencia diagnosticada por Pascual, según las zonas establecidas por este autor en dicho estudio (tabla 33).

ZONA	TASA DE PRESENCIA DE <i>C. burnetii</i> EN LECHE (2005) (%)	SEROPREVALENCIA F. PASCUAL (1994) (%)
NORTE	-	19.70
CENTRO	41.51	34.10
ESTE	-	34.32
OESTE	30.43	35.55
SUR	50.00	35.18

Tabla 34. Tasa presencia en leche (año 2005) enfrente a seroprevalencia diagnosticada en el año 1992 por Pascual (1994).

Resulta interesante añadir que, la época de muestreo en el estudio de Pascual (1994), primer semestre del año de 1992, se correspondería con la época de máxima seroprevalencia esperada según Tissot-Dupont y colaboradores (1994). Por tanto, estos resultados serían comparables, dentro de las limitaciones lógicas al tratarse de técnicas diagnósticas diferentes, con los resultados de tasas de presencia en leche obtenidos en el presente estudio para la estación de mayor riesgo ya que, por una parte, en la estación de menor riesgo y de acuerdo con los estudios realizados sobre el patrón de eliminación por la leche de *C. burnetii* en el ganado caprino (Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007; Rousset y cols., 2009), es de esperar que muchos animales que se mantengan seropositivos en sangre sean negativos a la detección de *C. burnetii* en leche mediante PCR y, de otro lado, nuestra estación de riesgo se prolonga hasta el final del primer semestre del año 2005. Como se ha mencionado, la media establecida para la seroprevalencia determinada en el estudio de Pascual (1994) fue del 32.74%, mientras que la establecida en la estación de riesgo en el presente estudio para la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche fue del 40.82%, siendo el 100% de las cuatro granjas analizadas, positivas a la presencia de *C. burnetii* en leche. En cuanto a la comparación establecida entre los datos de presencia de *C. burnetii* en leche obtenidos en el presente estudio y los de seroprevalencia obtenidos por Pascual, hay que tener en cuenta que, en los datos de

seroprevalencia expuestos en la tabla 35, se incluyen a los animales jóvenes (menores de 1 año), que cuentan con una seroprevalencia relativamente menor a los animales adultos, lo cual redundará en una lógica disminución de la seroprevalencia global, mientras que en el presente estudio, analizamos a animales adultos en el periodo de lactación. Eso sí, dicha disminución no es muy importante (la media global de la seroprevalencia calculada por Pascual para los animales adultos fue del 33.69%, siendo el 100% de las granjas analizadas seropositivas a la fiebre Q).

Por otra parte, volver a recalcar que, en el estudio que nos ocupa, no se detecta presencia de enfermedad, sino presencia del agente causal en la leche y que, entre la época de extracción de las muestras del estudio de Pascual (año 1992) y el de las muestras del presente estudio (año 2005), han transcurrido aproximadamente trece años. Sin embargo, si bien ha habido determinados cambios globales en el sistema de producción caprina de Lanzarote, a la luz del cuestionario realizado en este estudio, acompañado además, de un aumento significativo del censo, las realidades en cuanto a los sistemas de manejo existentes en la isla de Lanzarote siguen siendo bastante similares a las existentes en 1992, con la excepción de que no hemos detectado a ganaderos que lleven a cabo un manejo extensivo (Pascual, 1994).

Luego, si se observan los resultados de estudios en los que se han comparado técnicas serológicas con sensibilidad-especificidad cercana a la técnica de I.F.I., utilizada por Pascual (Pascual, 1994), con técnicas de Trans-PCR (Berri y cols., 2007; Vaidya y cols., 2008), se puede llegar a la conclusión de que la fiebre Q continúa siendo endémica en el ganado caprino de Lanzarote, y probablemente, y esto no deja de ser una estimación, la seroprevalencia de la enfermedad en la población caprina de Lanzarote se sitúe en valores medios cercanos o incluso superiores a los establecidos por Pascual (1994). De hecho, en estudios seroepidemiológicos más recientes desarrollados en la isla de Gran Canaria mediante ELISA, se ha observado un valor de seroprevalencia en cabras frente a *C. burnetii* del 60,4% (Rodríguez y cols., 2010).

5.2.2. PRIMER ESTUDIO INFERENCIAL. ESTACIONALIDAD DE LA ELIMINACIÓN POR LA LECHE DE *Coxiella burnetii* EN EL GANADO CAPRINO DE LANZAROTE (ISLAS CANARIAS). APORTACIONES DE CARA A LA SALUD PÚBLICA.

El objetivo principal de este estudio analítico era el identificar factores de riesgo asociados con la presencia de *C. burnetii* en muestras de leche del ganado caprino en

la isla de Lanzarote. Y se hace mención expresa al concepto de presencia del agente causal con el fin de ahondar en el concepto de prevalencia en lo que se refiere a estudios del tipo que nos ocupa. Si nos remitimos a la definición de prevalencia como animales enfermos en un periodo de tiempo concreto en relación con el número de animales existentes en la población en riesgo de desarrollar la enfermedad en ese mismo periodo, se puede caer en el grave error de considerar a todos los animales secretores del agente causal a través de la leche como individuos enfermos, cuando realmente es probable que no se dé tal fenómeno, ya que podemos estar ante portadores asintomáticos del agente causal o incluso, puede darse la circunstancia de que portadores excretores de *Coxiella burnetii* no sean seropositivos a la enfermedad o, que animales seropositivos no muestren presencia del agente causal en leche (Berri y cols., 2007). Por ello, a partir de ahora y para evitar confusiones, hablaremos de presencia en leche de *C. burnetii* o de *C. burnetii* excretada en vez de utilizar el término prevalencia.

Respecto a este estudio, es importante resaltar la definición de prevalencia y adaptarlo a nuestras circunstancias, ya que no medimos presencia de enfermedad sino presencia de agente causal y por tanto, medimos número de portadores excretores del agente causal en un momento determinado en relación con el número de animales existentes en la población en riesgo de ser portadores en dicho periodo de tiempo. En nuestro caso, dicho espacio de tiempo fue el comprendido entre el 10 de mayo y el 1 de noviembre del año 2005.

Como se ha podido apreciar en el capítulo de resultados del presente estudio, tras el tratamiento inferencial de los datos obtenidos tras el análisis de las muestras de campo, la eliminación de *C. burnetii* en la leche en el ganado caprino de la isla de Lanzarote, y más concretamente, en la población diana del presente estudio (explotaciones de más de 100 cabezas), sigue un patrón estacional. Luego, esta variable, la estacionalidad, se muestra como un factor de riesgo.

En nuestro caso, hemos visto que las muestras recogidas entre los meses de mayo y junio, las cuales se corresponden con las fechas de recepción 25/05/05 y 16/06/05, mostraban una mayor presencia de *C. burnetii* (un mayor número de muestras positivas) que las muestras recogidas durante la segunda quincena de julio y principios de agosto (fecha de recepción 05/08/05) y las recogidas durante la segunda quincena del mes de octubre y principios de noviembre (fecha de recepción 04/11/05). Tomando como estación 1 a las dos primeras épocas de recepción y, como estación 2, a las épocas de recepción restantes, hemos observado que en las

muestras pertenecientes a la estación 1 se detecta una presencia de *C. burnetii* en leche mucho mayor que la estación 2 (razón de riesgos = 8.025 ; IC95%= 4.4; 14.5), ajustándose los datos observados a un modelo lineal de Poisson ($p < 0.001$), siendo el ajuste del modelo muy aceptable, mostrando un coeficiente de sobredispersión de 1.33 (McCullagh y Nelder, 1989).

La estacionalidad de la fiebre Q ha sido abordada en diversos trabajos de investigación. Así, Raoult y colaboradores (2000), en un estudio serológico retrospectivo realizado sobre un total de 1383 pacientes de fiebre Q aguda y crónica humana, que fueron hospitalizados entre 1985 y 1998 en Francia, reveló que la mayor proporción de casos observada ocurría durante la primavera. En otro trabajo realizado por Tissot-Dupont y colaboradores (2004), se demuestra cómo los cambios bruscos en las condiciones meteorológicas pueden contribuir a producir cambios en la estacionalidad de la enfermedad en zonas donde ésta es hiperendémica. En la zona estudiada, a 40 km al noroeste de Marsella, un estudio previo realizado entre 1990 y 1995 demostró que esta enfermedad era hiperendémica en la zona, la cual, se caracterizaba por ser una región en la que existían varias ganaderías de ovino en régimen extensivo. Durante este estudio, se observó que la mayor parte de los casos en las poblaciones humanas aparecían entre los meses de abril y mayo, un mes después de la segunda paridera, época en la que además, los vientos de la zona son más intensos. La paridera principal (octubre – noviembre) se da en una época en la que los vientos no suelen soplar con fuerza. Sin embargo, en el invierno de 1998 a 1999, los autores detectaron un aumento inesperado en el número de casos de fiebre Q que coincidía con cambios meteorológicos anormales en cuanto a la fuerza de los vientos Mistral y las precipitaciones se refiere, cambios estos que se estimó que fueron los desencadenantes de esta situación epidémica (Tissot-Dupont, 1999; Tissot-Dupont, 2004).

En otro estudio desarrollado en Francia (Caron y cols., 1998), concretamente en el hospital universitario de Poitiers, consistente en una revisión de 80 casos clínicos de neumonía provocados por la fiebre Q humana, registrados entre 1982 y 1996, se observó que el 80% de los casos se registraron entre febrero y mayo. Como se puede apreciar, en estas dos regiones diferentes de Francia, con diferentes climas (Marsella, en la costa sur y con clima mediterráneo, mientras que Poitiers, se sitúa en la costa este y presenta un clima oceánico), los casos clínicos diagnosticados de fiebre Q tienden a concentrarse, en mayor medida, en torno a la primavera. Eso sí, en el caso de Poitiers, ocurren en la transición del invierno a la primavera, mientras que en Marsella, ocurren en la transición entre la primavera y el verano. Además, la

forma clínica más frecuente de la fiebre Q en Poitiers fue la neumónica, mientras que en la zona del distrito de Bouches-du-Rhone, cercana a Marsella, la forma más frecuente fue la hepática (Caron y cols., 1998; Tissot-Dupont, 2004).

En Holanda, Delsing y Kullberg (2008), realizaron un estudio sobre un brote en el que se detectaron un total de 808 casos antes de agosto del 2008 (el brote epidémico de fiebre Q humana de mayor repercusión mundial hasta la fecha). Los veterinarios estatales holandeses detectaron la enfermedad en las granjas intensivas de ganado caprino de la zona del brote en los años 2006 – 2007, y se estableció que existía una relación entre la alta concentración ganadera de la zona y la alta presencia de la enfermedad. La época en la que se observó la mayor prevalencia de casos de fiebre Q humana en este brote fue entre los meses de diciembre y mayo, momento que se correspondía con el de la manipulación del estiércol de las citadas granjas. El clima de Nijmegen, región de Holanda afectada por este brote, es de tipo oceánico y, la presentación más frecuente de la fiebre Q humana en este caso, fue la neumónica.

En el País Vasco, zona norte de España, de clima oceánico, al igual que la región de Poitiers (Francia) y que la de Nijmegen (Holanda), la presentación neumónica de la fiebre Q humana es más frecuente que la hepática (79% frente a 21% de casos respectivamente). La mayor concentración de casos de fiebre Q humana se da entre los meses de marzo y junio (64.3%). Esta época se corresponde con la de las principales parideras de ganado caprino y ovino del lugar. Además, se trata de la época en la que se suele visitar con más frecuencia, por parte de la población en general, las zonas rurales como actividad de ocio (Cilla y cols., 2008).

Un caso curioso de contraste en cuanto al clima y la presentación clínica de la fiebre Q en las poblaciones humanas lo tenemos en Galicia, región del noroeste de España. Según un estudio serológico realizado por Sesma (1990) en el Ferrol, provincia de la Coruña, en una muestra de donantes de sangre, se registró una prevalencia del 11% mediante FC y del 18% mediante IFI. En ese mismo periodo se habían diagnosticado 11 neumonías en nueve meses (el 10.8% del total de neumonías diagnosticadas en la zona durante dicho periodo). Sin embargo, en la provincia de Orense, entre 1992 y 1995 se diagnosticaron 31 casos de fiebre Q aguda, siendo la presentación más frecuente, la hepatitis acompañada de cuadro febril (74% de los casos), frente a tan solo el 6 % que presentó neumonía (Latorre y cols., 1995). Si bien, estas dos provincias de Galicia presentan un clima de tipo oceánico, en esta comunidad autónoma, existen dos variantes de este tipo de clima.

En el norte de Galicia se da un clima marítimo típico de la costa oeste continental europea (es el caso de la Coruña), mientras que en el sur, existe un clima que, sin dejar de ser oceánico y tener una fuerte influencia marítima, tiene una tendencia al clima mediterráneo (es el caso de Orense). Además, la temperatura media anual es ligeramente más alta en Orense (14.3°C frente a 14.1°C de la Coruña), mientras que la humedad relativa media es claramente inferior en Orense (71% frente a 78% en la Coruña; Guía resumida, según la guía resumida del clima en España 1971 - 2000).

En Nueva Escocia, Canadá, Marrie y colaboradores (1985), tras un estudio serológico en el que se analizaron muestras de ganado vacuno, ovino, caprino, además de analizar muestras de gatos de la región, se observó que los principales reservorios animales de la enfermedad eran el ganado bovino y los gatos, habiéndose detectado anticuerpos contra la enfermedad en el ganado ovino de forma estacional, de tal manera que, según la reacción de fijación del complemento, el 55% de los animales positivos mostraron anticuerpos en el mes marzo, mientras que el pico mínimo fue detectado en el mes de septiembre (18% de los positivos). En esta región no se observa estacionalidad en la fiebre Q humana. Esto puede ser debido a que el ciclo productivo del ganado bovino es más continuo que el de los pequeños rumiantes, teniendo los partos repartidos a lo largo del año y no concentrados en parideras, como ocurre en el caso de los ganados ovino y caprino. Probablemente, la influencia en la contaminación ambiental del ganado bovino con *C. burnetti*, en esta región de Canadá, será superior a la de cualquier otra especie, si bien, en ocasiones puntuales y debido al mayor grado de contacto con los animales de compañía, se han descrito brotes epidémicos en Nueva Escocia asociados a gatas parturientas infectadas por *C. burnetii*. La forma clínica más frecuente de fiebre Q observada en humana en esta región son cuadros de neumonía atípica. Nuevamente, estamos ante un clima oceánico marítimo, fuertemente influido por las corrientes atlánticas.

Sin embargo, en Ontario, también en Canadá, la epidemiología de la fiebre Q difiere bastante respecto a lo observado en Nueva Escocia. En Ontario entre los años 1975 y 1980 no se diagnosticaron casos de fiebre Q en humana, pero a partir de 1980, la importación de diversos ganados de caprino y ovino infectados en la zona se relacionó con la aparición de más de cien casos de fiebre Q humana en tres años, la mayoría de ellos fueron diagnosticados en el sur de la región, donde el clima es templado y continental. En este caso, el cuadro clínico de la fiebre Q humana más frecuentemente detectado fue la hepatitis granulomatosa acompañada de fiebre (Simor, 1987).

En Israel, Ergas y colaboradores (2006), realizaron un estudio clínico y serológico sobre 100 pacientes hospitalizados en seis centros del país (Soroka, en Beer Sheva; Kaplan en Rehovot; Meir en Kfar Saba; Haemek en Afula; Poriyah en Tiberias y Bnei Zion en Haifa), en el que determinaron que la mayoría de casos tenían lugar en el verano, concretamente entre los meses de abril y septiembre (64 % de los casos registrados). En este estudio, la forma clínica más frecuente de la fiebre Q humana fue la hepatitis (67%) frente al 32% de casos registrados como neumónicos. Este país presenta un clima que varía de templado continental (zonas norte y centro), a mediterráneo en la costa y subtropical al sur del país.

En el sur de la península de Italia, Parisi y colaboradores (2006), mediante un estudio basado en la aplicación de una técnica de nested-PCR sobre una serie de muestras de un total de 514 fetos abortados de ganado bovino, ovino y caprino, determinaron que la mayoría de los abortos sucedían entre los meses de octubre y abril.

Por otra parte, Yanase y colaboradores (1997), en un estudio realizado en Hokaido, Japón, en el que se analizaron un total de 364 sueros, mediante una técnica de inmunofluorescencia indirecta, de un total de 28 vacas pertenecientes a dos lotes diferentes de una misma explotación, mostró que los niveles de anticuerpos detectados aumentaban en invierno y decrecían en verano. Los animales que mostraron seroconversión durante la experiencia, presentaban anticuerpos durante 5 meses.

Otro factor importante en la epidemiología de la fiebre Q que se ha estudiado en la última década mediante la aplicación de técnicas de PCR, ha sido el de las rutas de eliminación de *C. burnetti* en las diferentes especies de rumiantes domésticos, así como la duración y la distribución temporal de la eliminación de este microorganismo por las diferentes vías estudiadas. Estos estudios han demostrado que existen diferencias entre las distintas especies de rumiantes domésticos en cuanto a los patrones de eliminación de *C. burnetii* al medio.

Así, Guatteo y colaboradores (2007), estudian la rutas de eliminación en un total de 145 vacas de 5 ganados diferentes usando una técnica de PCR a tiempo real combinada con serología de sueros sanguíneos mediante ELISA. En dicho estudio, se procedió a realizar un seguimiento en el patrón de eliminación de *C. burnetii* por las diferentes rutas, para lo cual, se tomaron muestras semanalmente, desde el día cero hasta el noventa, de leche, flujo vaginal y heces. Los autores observaron que el 40%

de los animales muestreados eliminaban coxiellas por la leche, existiendo dos tipos de patrones: animales que lo hacían de manera persistente y animales que lo hacían esporádicamente. En el caso del flujo vaginal, la eliminación era intermitente o esporádica y se daba en algo más del 50% de los animales. La frecuencia de expulsión por las heces era minoritaria entre los animales monitorizados y, en cualquier caso, los animales que eliminaban por esta ruta lo hacían de manera esporádica. También se llegó a la conclusión de que, los animales que presentaban un alto grado de excreción de coxiellas al medio eran animales con títulos de anticuerpos altos, no presentándose una vía de eliminación que predominara sobre las demás. El 65.4% de los animales excretaba por una sola de las tres rutas señaladas, mientras que menos del 7% lo hacían por las tres a la vez.

En otro trabajo, Rodolakis y colaboradores (2007) llevaron a cabo un estudio en el que compararon los patrones de eliminación de *C. burnetii* en el ganado vacuno, ovino y caprino. Para ello, eligieron una serie de granjas positivas a la detección de *C. burnetii* a partir de muestras de leche extraídas del tanque de refrigeración mediante la trans-PCR, utilizando los métodos descritos por Berri y colaboradores (2000). Se analizaron 95 vacas, 120 cabras y 90 ovejas de un total de 9 explotaciones (3 explotaciones por especie). Se extrajeron muestras de leche (individuales y de tanque de refrigeración) durante 16 semanas y, se realizó un chequeo inicial y otro a los dos meses, de flujo vaginal y de heces. Las vacas se mostraron asintomáticas y eliminaban *C. burnetii* por la leche casi exclusivamente, mientras que en el caso de las cabras, en una de las granjas estudiadas se presentaron múltiples casos de abortos por fiebre Q y eliminaban coxiellas principalmente por la leche. En cambio, en los ganados ovinos se detectaron abortos con más frecuencia que para los ganados caprinos y el patrón de excreción fue diferente, eliminando *C. burnetii* de manera más frecuente por las heces y por el flujo vaginal. En cualquier caso, la excreción al medio de *C. burnetii* fue infrecuente en fechas cercanas al parto. La duración de la eliminación del agente causal en leche varió de una especie a otra: en vacas desde el día 0 hasta el 421; en cabras desde el día 5 hasta el 119; en ovejas, desde el día 11 al 238. El patrón de eliminación en leche se caracterizó, en las diferentes especies, por ser intermitente en varios de los animales monitorizados. Curiosamente, la duración media del periodo de eliminación de *Coxiella* en leche por parte del ganado caprino coincide con la media de días que dura el periodo de recuperación de las lesiones de cabras que abortan tras ser inoculadas experimentalmente con este agente causal, cuya duración fue de 120 días (Sánchez y cols., 2007).

En cuanto a los estudios sobre la eliminación de *C. burnetii* al medio en el ganado caprino, tenemos el estudio publicado en 2006 por Berri y colaboradores, en el que se investigó un brote de abortos causado por la fiebre Q que tuvo lugar en un ganado de 60 cabras. La totalidad de los animales fueron sometidos a serología sanguínea mediante ELISA y a la detección de eliminación de *C. burnetii* en leche, secreciones vaginales y heces mediante PCR. Los resultados obtenidos mostraban que el 80% de los animales eran seropositivos durante una media de 6 semanas. Se observó que los animales eliminaban coxiellas por la leche durante más de cuatro meses, así como, que el 23.3% y el 20% de los animales, eliminaban *C. burnetii* por secreciones vaginales y por heces, respectivamente, durante los dos años que duró la experiencia.

En otro estudio realizado a partir de un brote de aborto infeccioso en ganado caprino causado por fiebre Q, Rousset y colaboradores (2009) analizan la eliminación al medio de *C. burnetii* mediante PCR en dos grupos de animales de manera comparativa: abortadas (50 animales) frente a no abortadas (70 animales). Se analizan muestras de leche, secreción vaginal y heces extraídas a los 15 y 30 días de los partos. Los resultados mostraron para las cabras abortadas que el 44%, 21% y 38% de los animales eliminaban *C. burnetii* por secreción vaginal, heces y leche respectivamente. Estos resultados no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo de cabras que no abortaron (27%, 20% y 31% respectivamente), si bien, los resultados para este grupo son más bajos. Por otra parte, se observó que el 81% de los animales que eliminaban *Coxiella* al medio lo hacían por las heces y las secreciones vaginales a la vez, mientras que tan solo el 49%, lo hacía por la leche y alguna de las otras dos rutas.

En el capítulo de resultados se mostraba un gráfico el que se podía apreciar la evidente relación entre las épocas de parto o parideras y el grado de eliminación de *C. burnetii* al medio mediante la leche, en el ganado caprino de Lanzarote (fig. 23). Como se ha podido apreciar anteriormente, el periodo de eliminación de *C. burnetii* en la leche, por parte del ganado caprino, se ha estimado que puede ser de aproximadamente 4 meses (día 5 al 119 postparto) o incluso mayor en portadores eliminadores crónicos (Rodolakis y cols., 2007; Rousset y cols., 2009). Esto hace que, en cada época de recepción estemos detectando a un porcentaje de positivos en relación directamente proporcional al número de animales que empiezan a eliminar *C. burnetii* tras el parto durante, aproximadamente, los 4 meses anteriores a la época de extracción de las muestras. Lógicamente, existirá un número menor de animales portadores eliminadores crónicos que eliminarán *C. burnetii* por la leche

durante más de 4 meses y habrán animales con un patrón de eliminación intermitente, que crean un acumulativo diferente al expuesto de cara al número de portadores eliminadores de *C. burnetii* en leche detectados en las diferentes épocas de muestreo, pero se trata de hacer una aproximación a la realidad existente.

Por otra parte, y como se ha podido apreciar en el apartado de resultados, entre los meses de noviembre y marzo se concentran el 82.26% de los partos en la población diana del presente estudio. De los partos registrados en esta época, el 51.71% de los mismos se registran en el mes de noviembre, el 19.55% en diciembre y el resto, el 28.74%, se distribuyen de enero a marzo.

Según estos datos, los resultados en cuanto a las tasas de presencia de *C. burnetii* en leche en las épocas de recepción correspondientes al 25/05/05 y al 16/06/05 podrían indicar el inicio del descenso, tras una fase previa casi de meseta, en cuanto a la curva de la tasa de presencia de *C. burnetii* en la leche se refiere. Esta estimación se basa en que, la diferencia en la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche entre estas dos épocas es mínima y tiende al descenso levemente (la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche pasa del 41.51% al 40%, lo que significa un descenso del 3.4% en 22 días, aproximadamente). Sin embargo, en tan solo 50 días, la tasa de presencia del agente causal en leche pasa del 40% al 6.32%. El descenso en este caso es del 84.2%, mientras que el intervalo de tiempo transcurrido era tan solo 2.7 veces mayor que en el periodo anterior. Esto se traduce en que, el descenso de la tasa de presencia de *Coxiella* en leche de este periodo aumentó 11.23 veces con respecto al periodo anterior, con lo cual, se puede deducir que la curva de presencia de *C. burnetii* en leche entra, en esta época en la población diana del presente estudio, en una fase de descenso exponencial pronunciado. Entre la tercera y la cuarta época de recepción de las muestras, la curva de la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche continúa descendiendo, siendo el número de días transcurridos de 91 días en este caso y, el descenso registrado en la mencionada tasa, sería del 40.51% (2.08 veces menos cuando, el tiempo transcurrido, es 2.25 veces mayor). En cualquier caso, el descenso continúa en una fase exponencial pero de una manera menos acusada que en el periodo anterior, pero, aún así, sigue siendo más acusado que en el primer periodo entre épocas de recepción (3.4% en 22 días en el primer periodo enfrente al 40.51% en 91 días en el tercero, es decir, el descenso es 2.93 veces mayor en el tercer periodo que en el primero).

Como se ha podido apreciar, los datos registrados del presente estudio reflejarían la fase del descenso de la tasa de presencia de *C. burnetii* en la leche del ganado

caprino que conforma la población diana del presente estudio. En cualquier caso, deberán realizarse futuros estudios de incidencia o de evolución estacional de la tasa de presencia en leche de este agente causal en la población diana, con muestreos representativos de dicha población en diferentes épocas del año, con el fin de afinar en el ajuste de la curva epidémica sobre la tasa de presencia en leche de *C. burnetii* y, poder determinar la fase ascendente y de meseta de dicha curva, de manera experimental.

En cuanto a las otras fases de la curva epidémica en el caso que nos ocupa, es preciso decir que, aunque no contamos con datos empíricos sobre la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche en estas épocas, sí contamos con datos empíricos sobre la distribución anual de los partos que, unidos a los datos sobre los patrones de eliminación del agente causal en leche para el ganado caprino existentes previamente en la bibliografía (Berri y cols., 2006; Rodolakis y cols., 2007; Rousset y cols., 2009) y a los datos empíricos del presente estudio al respecto (los cuales dibujan la fase descendente de la curva), nos permite hacer una aproximación de lo que ocurre en la fase ascendente y de meseta de la curva, siempre, claro está, suponiendo una situación endémica para la enfermedad en la población.

Como se ha visto, el valor mínimo para la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche fue del 3.76% (fecha de recepción 04/11/05). Noviembre es el mes el que se registran el mayor número de partos en todo el año. Las muestras analizadas en la citada fecha de recepción se ha visto que se corresponden con muestras extraídas durante la segunda quincena del mes de octubre. De julio a octubre tienen lugar el 6.8% de los partos de la población diana. Además, en el mes de agosto no se registran partos y se empiezan a registrar partos de nuevo en el mes de septiembre. Luego, es muy probable, que el valor registrado en esta época de recepción para la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche esté próximo al valor de un punto de inflexión de la curva. Según estas suposiciones, durante el mes de noviembre, el crecimiento de la curva se supone claramente exponencial (sobre todo en la segunda quincena del mes) y esta fase de crecimiento de la curva se estima que se prolongaría hasta alcanzar valores máximos en la primera quincena del mes de marzo, suavizando su crecimiento en torno a la segunda quincena del mes de enero (debido a un descenso importante en el número de partos en este mes).

Tras esta fase de ascenso, empezaría otra de descenso muy suave, casi de meseta, que conectaría con los resultados hallados tras el análisis de las muestras de las épocas de recepción del 25/05/05 y del 16/06/06. Esta fase casi de meseta

estaría condicionada por los picos en el número de partos existentes en los meses de febrero, marzo y junio. Lógicamente, tras esta fase tendríamos la fase de descenso estudiada anteriormente, para la que si se dispone de datos empíricos.

Como se ha visto anteriormente (Berri y cols., 2006; Rodolakis y cols., 2007; Rousset y cols., 2009), un alto porcentaje de animales portadores eliminadores de *C. burnetii* por la leche lo hacen también por otras vías (fetos abortados, placentas contaminadas, secreciones vaginales, heces, etc). Luego, a partir de estas estimaciones, es muy probable que la época de máxima contaminación del medio con *C. burnetii* por parte de la población diana del presente estudio se concentre en los meses de noviembre a junio, siendo el periodo comprendido entre marzo y mayo, el que se estima de máximo riesgo de cara al contagio de la fiebre Q en las poblaciones humanas.

Bolaños y colaboradores (2003) realizaron una revisión de un total de 40 casos de fiebre Q aguda registrados en el sur de Gran Canaria durante los años 1998 al 2000. Esta zona presenta un grado de analogía importante con la isla de Lanzarote en cuanto al clima y a la orografía de las zonas rurales se refiere, donde la ganadería caprina es, sin duda, la de mayor importancia, contando esta zona con la mayor parte del censo ganadero caprino de la isla de Gran Canaria. El diagnóstico de la enfermedad se realizó mediante serología (IFI, detectando IgG e IgM) y se contaba con la historia clínica de los pacientes. El 65% de los casos se produjeron entre los meses de abril y julio. Si tenemos en cuenta los resultados del presente estudio en cuanto a la estimación del periodo de máximo riesgo de contaminación ambiental con *C. burnetii* debida al ganado caprino (meses de abril a mayo) y, teniendo en cuenta que el manejo del ganado en cuanto a la distribución de partos en la isla de Gran Canaria es muy similar al llevado a cabo en la isla de Lanzarote (dato este basado en la experiencia profesional del autor principal de esta investigación), además de que el periodo de incubación para la fiebre Q aguda en humanos se estima que dura de 2 a 6 semanas, dependiendo de la dosis infectante (Delsing y Kullberg, 2008), resulta muy probable que exista una relación entre el patrón de eliminación de *C. burnetii* en leche (por parte del ganado caprino) presentado en este estudio y la distribución temporal de los casos de fiebre Q en las poblaciones humanas.

Por otra parte, en el estudio citado en el párrafo anterior (Bolaños y cols., 2003), se observó que la fiebre Q aguda se presentaba como un síndrome febril acompañado de una elevación de las enzimas hepáticas en el 87.5% de los casos, mientras que la forma neumónica, solo se pudo detectar en 3 casos (7.5%). También

se observó que el 65% de los pacientes procedían de áreas rurales.

En Lanzarote, en un estudio epidemiológico en el que se revisaron 23 casos de fiebre Q aguda en el periodo de tiempo comprendido entre 1985 y 1992, se observó que el 56.5% de los afectados (13 casos) habían tenido contacto directo con el ganado caprino. En cinco casos (26%) se dio contacto indirecto con el ganado caprino: en 3 de estos casos (13%) se observó que se trataba de personas habían realizado paseos en zonas de pastoreo o que vivían en zonas próximas a estas, otro afectado había asistido a una feria ganadera y otro, había manipulado un contenedor de basuras. Otro afectado era manipulador de carne congelada, con lo cual, podría ser un ejemplo de enfermedad profesional. Por último, tan solo dos pacientes (8.7%) tenían como único antecedente de contacto con el agente causal, el hecho de haber consumido leche de cabra o queso fresco y, en otros dos casos, no se encontró antecedente alguno (Pascual, 1994).

Hasta 1994, de 130 casos registrados en las islas de Lanzarote, Gran Canaria, Tenerife y La Palma, en menos de un tercio de los mismos se diagnosticó neumonía atípica, siendo el cuadro clínico de fiebre Q aguda humana más frecuente en Canarias, la hepatitis acompañada de un síndrome febril (Pascual, 1994).

Como se ha visto anteriormente, la vía aerógena se estima como el principal modo de transmisión de la fiebre Q, si bien hay autores que no descartan la vía oral como una vía de transmisión con menor importancia, la cual estaría presente, sobre todo, en poblaciones rurales en las que se consumen leche y derivados sin pasteurizar, si bien es cierto, que hasta el momento no se ha podido demostrar experimentalmente la infección mediante esta vía de transmisión (Benson y cols., 1963; Krumbiegel y Wisniewski, 1970; Fishbein y Raoult, 1992; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Asimismo, se ha especulado sobre la posibilidad de que la vía de transmisión pueda influir sobre el cuadro clínico en la fiebre Q humana, de tal manera que, las formas hepáticas podrían deberse a infecciones vía oral y las formas neumónicas a la infección vía aerógena (Marrie y cols., 1996; La Scola y cols., 1997). En este sentido, en estudios experimentales en los que se han realizado infecciones vía inhalatoria con personas voluntarias, se ha demostrado que no siempre se producen casos de neumonía. Es más, en el estudio de Tigertt y Benenson (1957), de las personas infectadas vía inhalatoria, tan solo la mitad mostró neumonía y, en otro estudio realizado por Dupont y colaboradores (1971), todos los voluntarios inoculados vía aerógena mostraron únicamente un cuadro febril acompañado de hepatitis.

Por otra parte, se ha demostrado la influencia de los vientos y de la lluvia en la transmisión de la enfermedad en zonas donde la fiebre Q es endémica (Tissot-Dupont y cols., 2004). También se ha demostrado que el proceso de pasterización (71.7 °C durante 15 segundos) es suficiente para eliminar las células viables de *C. burnetii* en los productos lácteos (Enright y cols., 1957).

Entre 1998 y el año 2000, años en los que se presentaron los 40 casos de fiebre Q humana descritos por Bolaños y colaboradores (2003), muchos productores de queso artesanal de Canarias en general y, de Gran Canaria en particular, que contaban con Registro Sanitario Oficial, elaboraban sus productos a partir de leche cruda (sin tratar térmicamente). Al tratarse de un territorio indemne de brucelosis (concretamente, libre de *Brucella mellitensis* y *Brucella abortus*), la normativa permitía la elaboración de derivados lácteos a partir de leche cruda, ya que las Autoridades Sanitarias de Canarias realizaban controles periódicos para monitorizar la calidad microbiológica y para detectar la presencia de otros microorganismos patógenos y alterantes (*salmonella*, *staphylococos*, coliformes, microorganismos totales, etc) en las producciones de las industrias de queso artesanal (Real Decreto 1941/2004; Directiva 91/68/CEE del Consejo). Por otra parte, Canarias es la región de España que tiene el mayor consumo de queso per cápita de todo el estado. Sin embargo, la mayor parte de los casos de fiebre Q humana registrados en Gran Canaria durante el estudio de Bolaños y colaboradores (2003) eran pacientes que provenían de zonas rurales (65%), cuando lo lógico sería que, si la transmisión por la vía oral tuviera un papel importante en la difusión de la enfermedad, el mayor número de casos tendría que provenir de los núcleos urbanos más poblados, ya que en éstos, el número de consumidores potenciales es mucho mayor. Una situación similar la encontramos también en la revisión de los 23 casos de fiebre Q aguda realizada por Pascual (1994), donde, como se ha visto, en el 82% de los casos se observó un contacto directo o indirecto con el ganado caprino.

Por tanto, los resultados hallados para la fiebre Q humana en Gran Canaria por Bolaños y colaboradores (2003) y, por Pascual (1994) en la isla de Lanzarote apuntan a que la cercanía a las explotaciones ganaderas en las zonas rurales y el contacto directo o indirecto con el ganado, pueden ser los principales factores de riesgo de cara a la transmisión de la enfermedad, siendo la vía aerógena en este escenario, la más probable. De hecho, un factor importante que se suma a la hipótesis de que la vía aerógena es el principal modo de expansión de la enfermedad en Canarias es la variación de la velocidad media del viento (cuyo valor puede ser calculado a partir del

recorrido del viento medio mensual) (Tissot-Dupont y cols., 2004). Tomando como centros de observación de referencia a los situados en los aeropuertos internacionales de Telde (centro de referencia de la zona sureste de Gran Canaria) y de Arrecife (centro de referencia de Lanzarote), se observa que la velocidad media del viento aumenta de manera importante en el mes de marzo (el aumento es del 26% en la zona sureste de Gran Canaria y del 18% en Lanzarote, con respecto a los valores registrados en el mes de febrero) y continua haciéndolo hasta el mes de agosto, mes en el que se alcanza la máxima velocidad media del viento. Tras el mes de agosto, la velocidad media del viento comienza a disminuir, siendo los meses de septiembre y octubre, de transición, hasta llegar al periodo menos ventoso, comprendido entre los meses de noviembre a febrero (Guía resumida del clima de España, 1971-2000).

Todos los datos expuestos en el párrafo anterior hacen pensar de nuevo que en Canarias, la principal vía de transmisión de la enfermedad, es la aerógena, ya que la época de mayor riesgo para las poblaciones humanas se correspondería con el periodo de máxima contaminación por *C. burnetii* en el medio y con el incremento de la actividad de los vientos. Luego, cuando se habla de una relación entre los datos estimados y detectados para la eliminación de *C. burnetii* en la leche de cabra en el presente estudio, dicha relación ha de entenderse desde el punto de vista de que, en la estación de máximo riesgo de eliminación del agente causal por la leche, tenemos también, el número máximo de portadores capaces de eliminar *Coxiella* al medioambiente mediante diversas vías de eliminación (Berri y cols., 2007; Rodolakis y cols., 2007; Rousset y cols., 2009).

En Canarias, la leche de cabra se dedica principalmente a la producción de queso (Bresno y cols., 1993; Plan Director Ganadero: Capítulo XIV. Subsector caprino, 2000), si bien existe también una pequeña cantidad que se dedica al consumo directo. Parte de esta producción láctea que se dedica al consumo directo, es consumida sin haber sido pasterizada previamente. Una práctica tradicional en Canarias, en cuanto a la manipulación de la leche de cabra por parte de sus consumidores se refiere, es el hervir la leche en recipientes abiertos, manipulación que tiene por objetivo, disminuir la carga microbiana de este alimento para su posterior conservación en refrigeración. Esta manipulación podría originar aerosoles contaminados con *C. burnetii* que podrían ser inhalados por el consumidor y que, con una alta probabilidad y, a razón de los datos de ciclo umbral obtenidos en las muestras positivas del presente estudio y, a la alta capacidad infectante de este patógeno por inhalación, contarían con un número suficiente de unidades infectantes

de *C. burnetii* como para producir la fiebre Q (Tigertt y Benenson, 1957). Afortunadamente, esta es una práctica minoritaria y en desuso en la actualidad.

Otro posible factor de riesgo de fiebre Q en humanos que se ha tratado de relacionar con la aparición de esta enfermedad, es el consumo de queso fresco de cabra (Pascual, 1994). En este producto se produce, frecuentemente, un fenómeno que podría suponer un factor de riesgo para los consumidores y los manipuladores de queso fresco elaborado a partir de leche cruda: se trata de la pérdida de suero durante la elaboración y el almacenamiento de dicho producto. A la luz de los resultados del presente estudio, este suero puede estar contaminado con *C. burnetii* y, en condiciones ambientales favorecedoras de la evaporación, podría producir aerosoles que, probablemente, transporten una dosis suficiente como para producir la infección (Tigertt y Benenson, 1957). Esta situación, en ambientes cerrados y calurosos, podría originar situaciones de riesgo para los consumidores y manipuladores de este alimento.

Por otra parte, en cuanto al riesgo de infección por ingestión de leche o quesos contaminados con *C. burnetii* decir que, a pesar de que los datos de ciclo umbral registrados para las muestras positivas en el presente estudio auguran concentraciones altas del agente causal en estas muestras, esta vía de infección se presenta como muy improbable. A parte de lo mencionado anteriormente con respecto a la importancia de la vía aerógena en la expansión y transmisión de esta enfermedad, existen estudios sobre determinadas características intrínsecas de este agente infeccioso que ponen en duda la probabilidad de infección por ingestión de alimentos contaminados. Por un lado, la capacidad endotóxica del liposacárido de cubierta (LPS) de *C. burnetii*, en cualquiera de sus fases, es mucho menor que el de determinados patógenos intestinales, como puede ser el caso de determinadas enterobacterias (10^2 y 10^3 veces menos tóxico que el de *Escherichia coli* y el de *Salmonella typhimurium*, respectivamente) (Baca y Paretsky, 1983; Hackstadt y cols., 1985; Amano y cols., 1987). Por el otro, estaría la cercanía filogenética de *C. burnetii* a microorganismos como *Legionella pneumophila*, parásito intracelular y patógeno facultativo cuya vía de transmisión es la aerógena, con el que *Coxiella* tiene muchas similitudes en cuanto a sus mecanismos fisiopatológicos se refiere, además de contar con un ciclo vital y unas capacidades de persistencia en el medio que recuerdan mucho a las estrategias evolutivas de *Coxiella* (Maurin y Raoult, 1999; Seshadri y cols., 2003; Bandyopadhyay y cols., 2004; Chen y cols., 2007; Tiaden y cols., 2007; Tiaden y cols., 2008; Franco y cols., 2009).

Por tanto, entendemos que la explicación de la presentación clínica de la fiebre

Q aguda en humanos en Canarias, donde menos de un tercio de los casos estudiados presentan la forma neumónica de la enfermedad (Pascual, 1994), siendo la presentación clínica principal un cuadro febril acompañado de hepatitis subclínica (presentación más frecuente en todas las islas donde se ha estudiado la fiebre Q humana), hemos de buscarla en la vía de transmisión aerógena, en la amplia contaminación del medio, la cual, cuenta con un carácter estacional debido a que el principal reservorio animal son los ganados ovino y caprino, en la evolución estacional de los vientos (Tissot-Dupont y cols., 2004) y en las condiciones climáticas propias de este archipiélago, además de otros factores asociados a la población humana como pueden ser la predisposición genética (Helbig y cols., 2005), edad y sexo (Maurin y Raoult, 1999), residencia habitual (Maurin y Raoult, 1999; Delsing y Kullberg, 2008), hábitos de ocio (Cilla y cols., 2008) y culinarios (ante la posibilidad de crear aerosoles contaminados con el agente causal), y de dedicación profesional de los afectados (Marrie, 1990; Maurin y Raoult, 1999; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005).

En cuanto a las condiciones climáticas de Canarias, hemos de decir que este archipiélago cuenta con un clima subtropical húmedo con muchas variantes. Así, en las islas de menor relieve (Lanzarote y Fuerteventura) y en la zona sur de las islas de mayor relieve (Gran Canaria, Tenerife, Gomera, La Palma y el Hierro), el clima es más seco (contando con menos humedad relativa en el aire) y más caluroso que en la zona norte de las islas con más relieve (Guía resumida del clima de España, 1971-2000).

Como se ha visto anteriormente en este apartado, parece existir una relación entre la climatología de las regiones donde la fiebre Q es endémica y la presentación clínica de esta enfermedad en las poblaciones humanas (Marrie y cols., 1985; Simor, 1987; Sesma, 1990; Latorre y cols., 1995; Caron y cols., 1998; Raoult y cols., 2000; Tissot-Dupont y cols., 2004; Ergas y cols., 2006; Cilla y cols., 2008; Delsing y Kullberg, 2008). En virtud de los diferentes trabajos expuestos en el presente apartado sobre este tema, se puede llegar a la conclusión de que cuanto más frío y húmedo es el clima, mayor será la presencia de cuadros neumónicos por fiebre Q en las poblaciones humanas, mientras que, en climas calurosos y con menor humedad relativa en el aire, habrá más tendencia a la presentación de cuadros hepáticos de esta enfermedad.

Por otra parte, y siguiendo con el tema de las diferencias en la presentación clínica de la fiebre Q humana, diversos autores han teorizado sobre la posibilidad de

que este fenómeno se deba a la existencia de diferentes genotipos de *C. burnetii*, que como consecuencia de su adaptación al medio en el que se desarrollan, causarían diferentes cuadros clínicos en las poblaciones humanas (Marrie, 1995; Raoult y Marrie, 1995; Klee y cols., 2006; Tissot-Dupont, Raoult y cols. 2008).

Es evidente que existen diferentes cepas que cuentan con diferentes capacidades de virulencia, pero nosotros entendemos que esta capacidad de virulencia ha de ser entendida como la capacidad de los diferentes aislamientos para producir la infección con la menor dosis infectante posible y, sobre todo, como la capacidad de producir enfermedad crónica, ya que, la mejor estrategia de supervivencia para *C. burnetii* es la de mantenerse en el organismo del huésped reproduciéndose, creando así, portadores eliminadores crónicos de *Coxiella* al medio, ya que, en el medio externo, la *Coxiella* no tiene capacidad para replicarse, tan solo tiene capacidad para resistir en busca de un medio de propagación y de replicación (La Scola y cols., 1997; Glazunova y cols., 2005; Stein y cols., 2005; Beare y cols., 2006; Russell-Lodrigue y cols., 2009).

Por último y siguiendo con el estudio de los factores asociados a las diferencias observadas en la presentación clínica de fiebre Q aguda humana, añadir que en una revisión que contaba con un total de 1383 casos de infección por *C. burnetii* diagnosticados en Francia entre los años 1985 y 1998, se pudo observar que los cuadros neumónicos de fiebre Q eran más frecuentes en las personas mayores e inmunodeprimidas, mientras que la presencia de un cuadro hepático era más frecuente en los individuos jóvenes (Raoult y cols., 2000).

Por otra parte, la estrategia de infección de *C. burnetii*, una vez entra en contacto con el organismo hospedador, es muy probable que se base en crear un estímulo inicial del sistema inmune que logre atraer a la puerta de entrada, o lo que es lo mismo, a los alveolos pulmonares, una cantidad de células dianas (o monocitos) con el fin de lograr una parasitación suficiente para poder proseguir con su ciclo vital en el interior del hospedador. Esto es logrado, probablemente, mediante el desarrollo en un equilibrio de bacterias en fase I y fase II que, en la naturaleza, se equilibra hacia la fase I, sin que deje de existir un número menor de estos microorganismos en fase II (Stoker y Fiset, 1956; Brezina, 1958).

La fase II es más agresiva pero menos efectiva, y su papel es muy probable que consista, aunque no se ha demostrado aún, en crear una afluencia de células dianas al foco de infección, las cuales, son parasitadas de una manera más efectiva por la

fase I, siendo esto debido, probablemente, a diferencias en el mecanismo de internalización en la célula hospedadora (menos invasivo en la fase I que en la fase II) y a su capacidad para mantener un crecimiento sostenido en el tiempo en las células hospedadoras, lo que logra una situación que propicia la migración de la bacteria a otros órganos diana por el torrente sanguíneo (como pueden ser el hígado, el aparato reproductor, las articulaciones, etc...) (Hackstadt y Williams, 1981; Golenbock y cols., 1991; Mege y cols., 1997; Meconi y cols., 1998; Capo y cols., 1999; Maurin y cols., 1999; Honstetter y cols., 2004; Toman y cols., 2004; Zamboni y cols., 2003; Shannon y cols., 2005; Lubick y cols., 2007).

En este sentido, hay que decir que esta afluencia de monocitos al foco inicial de infección no ha de traducirse en la aparición de signos clínicos de neumonía en las poblaciones humanas. Por el contrario, nosotros entendemos que la aparición de neumonía clínica por fiebre Q, diagnosticable mediante radiografía, es un proceso que, si bien puede depender en cierta manera de la cepa de *C. burnetii* que actúe en una región concreta, e incluso de la predisposición genética y por edad de ciertos individuos, depende en mayor medida del clima de la región. Esta afirmación la hacemos basándonos en que en Canarias, se cuenta con los dos tipos de presentación clínica de la fiebre Q aguda humana (la hepática y la neumónica), mientras que el territorio es muy limitado y los movimientos de ganado caprino y ovino dentro de las islas y entre las islas, ha tenido relativa importancia en determinadas épocas, con lo que, si bien es probable que hayan diferentes genotipos de *C. burnetii* en las islas, también es muy probable que ambas actúen conjuntamente en la población, y en un escenario como este, resulta muy difícil explicar que determinadas cepas, con mayor capacidad para producir cuadros neumónicos, no lo hagan.

Aguinaga y colaboradores (2003), realizaron un estudio en 2001, en la provincia de Callao, Perú, en el que establecieron que existía una relación entre la aparición de infecciones respiratorias agudas (IRA) y las variables climáticas como la temperatura y la humedad relativa del aire. El estudio fue de tipo observacional analítico transversal, siendo la población diana, la compuesta por niños menores de cinco años con cuadros de infección aguda respiratoria en la región (146.912 casos) y, el periodo de estudio, los meses de diciembre y enero de 2001. En dicho estudio se observó que, en un análisis multivariable, los cambios de la temperatura y la humedad relativa del aire explicarían el 65.03% de los casos de infección respiratoria aguda, observándose una fuerte relación negativa con la temperatura y una débil relación positiva con la humedad relativa del aire.

En este sentido, Tissot-Dupont (2009) hace también hincapié en la importancia de factores climáticos como la temperatura, la humedad relativa del aire y la acción de los vientos en la presentación de cuadros de infección respiratoria aguda y, más concretamente, en la presencia de cuadros neumónicos por fiebre Q en humana. El autor explica que las bajas temperaturas del invierno contribuyen a producir vasoconstricción en la mucosa nasal y en el tracto respiratorio superior, lo que contribuye a una disminución local de las defensas y a la activación de procesos virales latentes. Esto unido a la acción de la humedad relativa del aire y a la acción de los vientos, no solo como favorecedor de la transmisión aerógena de patógenos sino también, como factor que contribuye a causar situaciones de estrés térmico en los hospedadores (ya que favorece la hipotermia), es muy probable que tengan que ver con la presentación aguda de la fiebre Q (Buxadé y cols., 1996; Aguinaga y cols., 2003; Tissot-Dupont, 2009). De hecho, se ha asociado un brote de fiebre Q aguda humana a la acción de los vientos en regiones llanas, concretamente, el brote ocurrió dos meses después de que comenzaran a soplar los vientos en la región (Tissot-Dupont, 2009).

Lógicamente, la interacción entre el viento, la temperatura ambiental y la humedad relativa del aire difiere de unas regiones a otras. Así, llama la atención que en climas fríos y con valores altos de humedad relativa en el aire, las brisas tengan especial importancia en la transmisión de la fiebre Q, sobre todo cuando esta se acumula en valles profundos, como ocurre en el País Vasco, mientras que en zonas más áridas, se han descrito brotes epidémicos asociados a las tormentas rojas o fenómeno de la calima (Babudieri, 1959; Alayo, 1986).

En Canarias, debido a su orografía y climatología, es probable que se den las dos situaciones, ya que debido a la fuerte influencia de los vientos alisios, en la zona norte de las islas de mayor relieve, se crean escenarios con mayor frecuencia cercanos a los del País Vasco en las zonas de medianías y cumbres, con temperaturas más suaves propias del clima canario, lógicamente. Sin embargo, el fenómeno de la calima afecta a todas las islas, teniendo mayor grado de incidencia en las islas orientales y en el sureste de las islas que en el norte (García y cols., 2001; Gelado y cols., 2005; Alonso-Pérez, 2007). Estos aspectos del clima de Canarias podrían explicar el porqué en el sureste de Gran Canaria se observó que el cuadro más frecuente de la fiebre Q aguda humana era el hepático acompañado de fiebre (87.5%), siendo raro el neumónico (7.5%), mientras que uniendo diferentes revisiones de casos realizadas con anterioridad en diferentes islas por diversos

autores, la forma neumónica se presenta en aproximadamente un tercio de los casos detectados, siendo la presentación más frecuente de nuevo y con diferencia, la hepática (Pascual, 1994; Bolaños y cols., 2003). En cualquier caso, trabajos futuros en los que se estudien estas variables climáticas en relación a la presentación clínica de la fiebre Q podrían ser muy esclarecedores y pondrían de manifiesto la importancia relativa de la climatología en la presentación clínica de la fiebre Q humana y animal, así como en la transmisión de la enfermedad.

Por tanto, se estima interesante terminar el presente apartado invitando a una reflexión sobre la verdadera importancia de la transmisión vía oral de la fiebre Q. Según los resultados del presente estudio, lo más fácil parece ser alertarse ante la importante presencia del agente causal de la fiebre Q en la leche del ganado caprino en Lanzarote y, probablemente, en el resto del archipiélago canario, pero como se ha podido apreciar a lo largo del desarrollo del presente apartado, los datos epidemiológicos encontrados hasta ahora en Canarias y en otros lugares del mundo no apuntan a que la vía oral sea realmente un grave problema a tener en cuenta de cara a la salud pública.

5.2.3. EPIDEMIOLOGÍA DESCRIPTIVA Y ANALÍTICA A PARTIR DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA. SEGUNDO ESTUDIO INFERENCIAL.

Como se ha podido apreciar en el apartado de resultados, en la primera parte del estudio inferencial realizado se observó que la zona formada por los municipios de Haría, Tegui y Tías presentaban una tasa de presencia en leche de *C. burnetii* que triplicaba (3,3 veces) a la de las granjas situadas en la zona centro-sur (municipios de San Bartolomé, Tinajo, Arrecife y Yaiza). Luego la distribución zonal de las granjas propuesta en el presente estudio con respecto al riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche en la estación de menor presencia de *C. burnetii* en leche, es otro factor que, junto a la estacionalidad ($p < 0.009$), se ha podido relacionar directamente con las tasas de presencia del agente causal de la Fiebre Q en leche obtenidas en el presente estudio, si bien para la distribución zonal propuesta no se ha logrado obtener una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.121$) (tabla 16).

En el segundo estudio inferencial y en el estudio descriptivo, realizados ambos a partir de los resultados obtenidos tras la encuesta ganadera, se trataba de relacionar a hipotéticos factores de riesgo indirectamente con las tasas de presencia en leche

del agente causal de la fiebre Q, a través de la relación de los mismos con los factores que sí se han podido relacionar directamente con las mencionadas tasas de presencia de *C. burnetii* en leche en el presente estudio. Es decir, la zona y la estacionalidad.

El hecho de que este análisis haya sido realizado con datos comparativos obtenidos a partir de lo observado en la época de menor riesgo, da menor importancia relativa a uno de los factores que se ha considerado como uno de los determinantes de mayor importancia de cara a explicar el gran incremento de las tasas de presencia de *C. burnetii* en leche detectadas en la estación de mayor riesgo. Este no es otro, que la gran concentración de partos observada entre los meses de noviembre y marzo, ya que es en esta época cuando ocurre el 82.26% de los partos de las granjas encuestadas (Tissot-Dupont y cols., 1992; Maurin y Raoult, 1999). El tener una concentración de partos inferior en la estación de menor riesgo y el realizar un muestreo aleatorio a la hora de obtener las muestras de leche, nos debería permitir estudiar, con mayor precisión, la importancia de otros factores que, en la estación de mayor riesgo, si bien pueden tener cierta importancia, esta puede tener una menor relevancia debido a la interrelación entre esas variables y la importante concentración de partos registrada en dicha estación con el consecuente incremento de la carga de *C. burnetii* en el medio.

A. Densidad poblacional animal y dimensionamiento de las explotaciones ganaderas.

En cuanto a los parámetros de densidad animal estudiados, como se ha podido apreciar en el apartado de resultados, en general, las granjas de ganado caprino, incumplen con frecuencia los requisitos mínimos propuestos para dichos parámetros (Buxadé y cols., 1996). Concretamente, estos requisitos se incumplen sobre todo en lo referente a las zonas cubiertas de los corrales (número de animales por superficie y por volumen). Además se ha observado una relación estadística con un nivel significativo entre estas dos variables y la distribución zonal de las granjas con respecto al riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche ($p < 0.073$, valor casi significativo para la superficie y $p < 0.003$ para el volumen de la zona cubierta de las instalaciones).

Véase que en el caso de la densidad poblacional animal de la zona cubierta expresada en cabezas por unidad de volumen o m^3 , dichas diferencias son especialmente abultadas (3,44 veces para la media y 2,48 veces para la mediana el

valor mínimo propuesto, tabla 19). Asimismo, se puede observar que los requisitos mínimos propuestos en cuanto al número de cabezas por superficie de la zona cubierta se incumplen en el 57,9% de las granjas encuestadas y en el caso del número de cabezas por volumen de la zona cubierta, se incumple en el 73,70% de estas granjas. Este resultado nos habla de posibles tasas de contacto altas en las superficies cubiertas de la mayor parte de las explotaciones ganaderas de la isla en las estaciones más frías y lluviosas (sobre todo en los meses de octubre a marzo, incluyendo a ambos y, especialmente, en los meses de enero y febrero, según datos de la guía resumida del clima de España 1970-2000).

En cuanto a la distribución por estratos de las granjas que incumplen con los requisitos mínimos propuestos para las variables categorizadas, es interesante ver como las granjas del estrato 3 o de más de 500 cabezas son las que cumplen con menor frecuencia dichos requisitos, sobre todo en lo referente a la zona cubierta de las instalaciones.

Respecto al cumplimiento de los requisitos de superficie de la zona descubierta o patio de recreo, decir que, en general, no es mayor que en el caso de la zona cubierta, pero aún así se incumple bastante, lo cual puede ser compensando por el pastoreo, entre otras medidas. Las densidades de pastoreo son elevadas para lo árido de los pastos en Lanzarote, pero se trata de una estrategia de manejo orientada al ejercicio físico del animal y a la disminución del estrés que supone para los animales las producciones en régimen intensivo, más que al aprovechamiento de los recursos de los pastizales (Plan Director Ganadero de Canarias, capítulo XIV, Subsectores Caprino de Leche y de Caprino de Carne, 2000).

Kennerman y colaboradores (2008) establecieron, como factor de riesgo, el número de cabezas de la explotación ganadera. En el presente estudio no hemos podido demostrar que el número de cabezas de la explotación ganadera sea un factor de riesgo en cuanto a la eliminación de *C. burnetii* por la leche se refiere, si bien es verdad que, este resultado no está exento de matices. En nuestro estudio, la comparación entre los diferentes estratos en cuanto a la positividad de las granjas con respecto a la presencia de *C. burnetii* en leche, solo la hemos podido realizar para los resultados obtenidos en la estación de menor riesgo ya que, en el caso de la estación de mayor riesgo, no se disponía de muestras de granjas pertenecientes a los estratos 1 y 2. Por tanto, sería interesante en futuros estudios y, con muestras extraídas en la estación de mayor riesgo, el establecer una comparación entre las granjas pertenecientes a los diferentes estratos propuestos en el presente estudio en

cuanto a la eliminación por la leche de *C. burnetii*. Lógicamente, en la estación de mayor riesgo, el número de partos es claramente superior y, en un escenario como éste, cobraría importancia el hecho de que sean las ganaderías del estrato 3 (más de 500 cabezas) las que incumplen con mayor frecuencia las dimensiones mínimas propuestas, sobre todo, para la zona cubierta de las instalaciones ganaderas.

B. Orografía y climatología

Como introducción, decir que las cubiertas de los corrales de las diferentes granjas encuestadas están fabricadas mayoritariamente con planchas de fibrocemento (uralita) o metálicas (chapa galvanizada), soportadas en una estructura metálica, siendo los cerramientos laterales mayoritariamente de hormigón armado. Las cubiertas no suelen presentar humedades en las épocas de lluvia en las diferentes granjas encuestadas pero, llama la atención que, en el 52,63% de las ganaderías, se quejen del calor en la zona cubierta en los días calurosos de verano. Estas cubiertas no presentan, en ningún caso, algún tipo de aislamiento térmico, lo cual, unido al diseño de las instalaciones, probablemente redunde en la generación de temperaturas alejadas de los valores óptimos para el bien estar y producción animal, generando estrés en los animales en aquellos días en los que las temperaturas ambientales de las zonas de las granjas se alejen, de manera importante, de las temperaturas medias registradas en la isla (Buxadé y cols., 1996). Este fenómeno es probable, aunque no haya sido constatado en la presente encuesta, que se dé también de manera inversa en la época fría, causando una disminución considerable de las temperaturas en el interior de la zona cubierta.

Por otra parte, con respecto a la orografía de los terrenos en los que se sitúan las granjas encuestadas, se puede apreciar que el 68,42 % de estas granjas están situadas en zonas planas o de escaso relieve, o bien, en amplios valles rodeados de un relieve fuertemente suavizado por la erosión. Tan solo el 21,05 % de las granjas están ubicadas en las zonas más abruptas de Lanzarote y el 10,53 % se encuentran en el interior de hoyas de origen volcánico. El relieve se ha mostrado como factor de riesgo en otras enfermedades infecciosas causadas por agentes que, al igual que *C. burnetii*, cuentan con una gran capacidad de asentamiento telúrico y de resistencia en el medio. Este es el caso del carbunco sintomático, enfermedad producida por *Clostridium chauvoei*. Esta enfermedad suele restringirse a regiones deprimidas y valles situados entre altas montañas. De ahí que se haya considerado a esta variable en nuestro análisis inferencial (Blaha y cols., 1995).

En cuanto a la exposición a los vientos de las diferentes ganaderías encuestadas, resaltar la exposición de las mismas a los vientos de componente norte-noreste (alisios) y a los vientos que originan el fenómeno de la calima (los cuales, son con mayor frecuencia de componente sur y sureste, siendo infrecuente observarlos, de componente este y suroeste). El 73,68% de las ganaderías están expuestas a uno o ambos de estos vientos que, a su vez, son los de presentación más frecuente en la isla (García y cols., 2001; Gelado y cols., 2005; Alonso-Pérez, 2007).

Como se ha podido apreciar, en el presente estudio no se ha podido relacionar estadísticamente a ninguna de las variables propuestas relacionadas con la orografía y la climatología con la variable de distribución zonal de las granjas. Luego no parece que estas variables actúen como factores de riesgo que marquen diferencias apreciables entre las granjas situadas en la zona de riesgo y las granjas situadas en la zona de menor riesgo (tabla 20).

Sin embargo, es de destacar el hecho de que un alto porcentaje de las granjas encuestadas (52,63%), la falta de materiales de aislamiento en las cubiertas y el diseño de los corrales, favorece el incremento de temperaturas en verano en el interior de las zonas cubiertas y por tanto, es muy probable que en los meses más fríos, estas granjas presenten bajas temperaturas en dichas zonas. Si a esto añadimos que el 73,68% de las granjas encuestadas están expuestas a la acción de los vientos dominantes y que, en marzo, se produce un aumento importante en la velocidad media de los vientos (Guía resumida del clima de España 1971-2000), estando aún en la estación fría y con mayores precipitaciones del año, tenemos a toda una serie de factores favorecedores de neumonías que, unidos a la coincidencia con el mencionado efecto acumulativo en cuanto a la eliminación de *C. burnetii* al medio por parte del ganado caprino de Lanzarote en esta época se refiere, y a la alta densidad animal registrada en la zona cubierta de las instalaciones en un alto porcentaje de las granjas encuestadas, siendo particularmente alta, en las granjas situadas en la zona de riesgo, hacen pensar que, en el ganado caprino de la isla de Lanzarote, la hipótesis de que la principal vía de transmisión de la enfermedad sea la vía aerógena es la que, a falta de estudios con más profundidad al respecto, se presente como la más que concuerda con lo observado (Martin y cols., 1997; Tissot-Dupont y cols., 2004; Tissot, 2009).

C. Reposición e introducción de ganado en la explotación. Medidas preventivas.

Como se puede apreciar en este caso, a pesar de no haberse podido demostrar ninguna asociación estadísticamente significativa con ninguna de las variables expuestas en la tabla 22, resulta de interés destacar que las granjas situadas en la zona de riesgo superan el valor de la mediana calculada para la variable "proporción de primíparas" con una frecuencia 4.08 veces mayor que la observada para las granjas situadas en la zona de menor riesgo. Luego ésta podría ser otra de las variables que puede marcar diferencias entre dichas zonas en cuanto al riesgo de eliminación de *C. burnetii* en la leche durante la época de menor riesgo de presencia en leche de este agente causal a pesar de no haberse determinado una asociación estadísticamente significativa y en virtud de lo determinado en otros estudios epidemiológicos, que estaría en consonancia con lo descrito en determinados trabajos de investigación sobre la mayor tasa de anticuerpos detectadas en los animales jóvenes (Pascual, 1994; Kennerman y cols., 2008).

Así por ejemplo, granjas que se encuentren en un proceso de crecimiento en el número de animales en edad de producción a partir de reposición propia o bien, aquellas granjas con una alta tasa de mortalidad de animales adultos que opten por aumentar el número de primíparas con el fin de mantener el número de animales de la explotación, es muy probable que tengan que afrontar mayores pérdidas debidas a la fiebre Q. De ahí la importancia de establecer planes sanitarios basados en una correcta inmunización de los animales. Así, en un estudio realizado en Francia con vacunas de este tipo en cabras preñadas se observó una importante disminución en el número de abortos, así como en la eliminación de *Coxiella* por la leche, el flujo vaginal y las heces (Arricau-Bouvery y cols., 2003). Eso sí, habría que estudiar la conveniencia de aplicar tratamientos antibióticos eficaces contra *C. burnetii* antes de realizar la vacunación por primera vez en los ganados en los que no se han vacunado nunca y que presentan la enfermedad, con el fin de evitar una mayor dispersión del agente causal de la fiebre Q en el medio tras la primovacunación o bien, como proponen otros autores, empezar a vacunar ganados seronegativos o en su defecto, los animales seronegativos de los ganados afectados, prosiguiendo con la vacunación de los animales jóvenes en los siguientes años (Krauss, 1989). En cualquier caso, ninguna de estas dos alternativas posibles ha sido evaluada económicamente, pero es conveniente tener en cuenta que se han detectado brotes epidémicos en humana asociados al contacto con ganados positivos a la enfermedad que fueron vacunados (Behymer y cols., 1977; Berri y cols., 2005; Guatteo y cols., 2008; Astobiza y cols.,

2010).

También es de destacar que el límite propuesto para la variable "tasa de hembras/macho" es superado con más frecuencia por las granjas de la zona de riesgo (concretamente, la frecuencia es 2,33 veces superior a la observada para zona de menor riesgo). Este hallazgo nos podría estar mostrando la acción de un mayor estrés en los machos por un manejo inadecuado, lo que podría potenciar la acción de estos animales en la transmisión de la fiebre Q. Sin duda, se debería profundizar sobre la importancia de transmisión sexual de la fiebre Q en los ganados de ungulados domésticos (Buxadé y cols., 1996; Kruszewska y Tylewska-Wierzbanowska, 1997; Álvarez-Ortí y cols., 1999; Leone y cols., 2004; Alsaleh y cols., 2011). Sin embargo, el límite propuesto para la vida útil de los machos no parece ser un hecho diferencial entre las zonas propuestas en el presente estudio.

Como se puede apreciar, el intercambio de machos es una práctica frecuente, independientemente de la zona en la que esté situada la granja, mientras que el comportamiento de los ganaderos de Lanzarote con respecto al origen de las hembras para la reposición es diferente y se muestra en este estudio como dependiente de la zona, de tal manera que, las granjas situadas en la zona de riesgo importan hembras con más frecuencia (1.94 veces más) que las granjas situadas en la zona de menor riesgo, si bien no se ha podido establecer una relación estadísticamente significativa. Sin embargo, se ha observado que no existen diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de importación de ganado de Fuerteventura entre las ganaderías de ambas zonas (el 50% de las ganaderías importaron ganado de Fuerteventura en la zona de riesgo o zona centro-norte enfrente al 66.7% registrado en las ganaderías de la zona de menor riesgo o zona centro-sur) y que, como se puede apreciar, esta práctica ha sido muy frecuente, en general, entre los ganaderos de la isla. Esto estaría en contraposición a lo determinado en su día por Pascual (1994) y podría explicarse como una evolución de las tasas de presencia de la fiebre Q en Lanzarote en función del aumento progresivo del censo desde los años 90 hasta el 2005, donde la importación de animales desde Fuerteventura ha tenido cierta importancia (Huebner y Bell, 1951; Lennette y cols., 1951; Biberstein y cols., 1974).

Luego, la importación de animales, sin importar su origen, parece tener mayor influencia y podría comportarse como un hecho diferencial que puede influir en un incremento del riesgo de la presencia de fiebre Q en las ganaderías importadoras. En este sentido, existen estudios en los que se relacionan brotes de fiebre Q con el

transporte de animales infectados (Fan y cols., 1987). El transporte de ganado caprino explotado en régimen semi-intensivo, lo cual, redundando en un mayor estrés para estos animales que para, por ejemplo, los explotados en régimen intensivo, más acostumbrados al hacinamiento, genera una situación en la que se puede ver favorecido un aumento de la tasa de prevalencia de la fiebre Q en los animales transportados.

Al estrés generado durante el transporte, hay que unir el que se genera durante la introducción de los animales importados, lo cual supone un estrés no solo para estos animales, sino también, para los animales que conforman el ganado en el que son introducidos. En este sentido, estudios realizados en California en el año 1951 demostraron que cuando se importaba ganado vacuno en zonas endémicas de la enfermedad, el 40% de las cabezas del ganado importado libre de infección terminaban mostrando anticuerpos específicos contra *C. burnetii* (Huebner y Bell, 1951). Luego, las citadas situaciones de estrés unidas a los equilibrios de prevalencias previsibles según los estudios de Huebner y Bell entre los animales de los ganados importado e importador, pueden contribuir a aumentar el riesgo de presencia de la enfermedad en los ganados que importan animales con mayor frecuencia.

D. Ordeño y mantenimiento de los equipos de ordeño mecánico.

Barlow y colaboradores (2007) demostraron que *C. burnetii* producía mamitis subclínicas en el ganado vacuno. Como se ha podido apreciar en el presente estudio, no existe una relación estadística con un nivel de significación aceptable, entre las variables frecuencia de regulación de la máquina de ordeño (regulación de frecuencia de pulsos y de presión de vacío) y de los cambios de mangueras, con las zonas de riesgo propuestas en cuanto a la eliminación de *C. burnetii* en la leche ($p < 0.100$ para ambas variables) (tabla 24). Sin embargo, llama la atención el hecho de que en la zona de menor riesgo se preste mayor atención a los mantenimientos de la maquinaria de ordeño. Por tanto, en las zonas de menor riesgo se controlan mejor los citados factores y éste es otro posible hecho diferencial con las ganaderías situadas en la zona de riesgo por lo que, este es otro hallazgo más que invita a estudiar, con mayor profundidad, la capacidad de este agente causal para producir mamitis. En este sentido, futuros estudios deberán servir para establecer la importancia relativa de este agente causal en la producción de pérdidas económicas derivadas de su capacidad para producir mamitis, así como para establecer la importancia del ordeño mecánico en la transmisión de la enfermedad.

E. Entorno de las explotaciones.

Las distancias entre granjas de ganado caprino entre sí y, de estas con granjas de otras especies y con los núcleos urbanos, observadas en el presente estudio, puede ser un factor que contribuya a explicar las altas tasas de seroprevalencia en el ganado caprino y en la población humana de Lanzarote diagnosticadas por Pascual (1994), así como las altas tasas de presencia de *C. burnetii* detectadas en leche en la estación de riesgo observadas en el presente trabajo. En este sentido, destacar el estudio del brote epidémico surgido en 1996 en los Alpes, en la localidad francesa de Briçon, donde el aerosol creado por un helicóptero en las zonas aledañas a un matadero originó que casi el 14% de la población de esta localidad presentara fiebre Q clínica (Carrieri y cols., 2002). Más recientemente, durante la primera mitad del mes de marzo de 2004, tuvo lugar un brote de fiebre Q entre los empleados de una fábrica situada en Zadar (Croacia), en el que 14 de los 110 empleados contrajeron la enfermedad, observándose dos hechos importantes: por un lado, que al norte de dicha fábrica pastaban rebaños de ovejas que resultaron ser seropositivos a la enfermedad y, por el otro, que los trabajadores de las zonas de la factoría expuestas a los vientos del norte enfermaron con una frecuencia relativamente superior a los trabajadores no expuestos a estos vientos (Medi'c y cols., 2005).

Luego, la alta concentración ganadera y poblacional existente en Lanzarote, unido a una orografía que se caracteriza por un escaso y suave relieve, apoyan la hipótesis de que la fiebre Q, enfermedad transmitida principalmente mediante la vía aerógena, esté ampliamente difundida en esta isla debido a que estos factores favorecen la diseminación de la enfermedad, no solo entre las poblaciones animales, sino además, entre estas y las poblaciones humanas (Pascual, 1994; Tissot-Dupont y cols., 2004; Delsing y Kullberg, 2008; Tissot-Dupont, 2009). En este sentido y como se ha citado con anterioridad en el presente apartado, sería interesante estudiar las posibles influencias en Lanzarote y en Canarias en general, de fenómenos atmosféricos como la calima en el transporte y dispersión, así como su actuación como factor favorecedor en la transmisión de la fiebre Q (Babudieri, 1959; Garcia y cols., 2001; Gelado y cols., 2005; Alonso-Pérez, 2007).

F. Personal y tareas de limpieza, desinfección y desparasitación de los corrales.

De los resultados expuestos (tabla 26) destaca el alto porcentaje de granjas encuestadas que realizan la limpieza total de los corrales (es decir, la retirada total

del estiércol) con una periodicidad aceptable (en muchas de las granjas encuestadas se limpiaban las instalaciones con una periodicidad al menos mensual). Tan solo un 15.8% de las explotaciones limpiaban las instalaciones de manera parcial y con una periodicidad inferior a 4 veces al año (estas granjas pertenecen a los estratos 1+2).

Sin embargo, no ocurre lo mismo con las tareas DD, las cuales, se realizan con menos frecuencia en general entre las granjas encuestadas, siendo las granjas del estrato 1+2 las que menos realizan este tipo de tareas. En cualquier caso, los productos utilizados con más frecuencia para la desinfección de las instalaciones por las granjas encuestadas son la cal viva y el zotal® (cuya composición es a base de fenoles y cresoles con emulgentes que potencian su capacidad de penetración durante su aplicación). De los principios activos utilizados comúnmente para la desinfección de instalaciones, la bibliografía cita, como efectivos frente a *C. burnetii*, al cloruro de cal al 10-20% y a la formalina al 1.5 % durante tres días (Scott y Williams, 1990; Blaha y cols., 1995), lo que implica un vacío sanitario de las instalaciones a desinfectar de al menos 3 días de duración. Ninguno de estos dos protocolos de desinfección se realiza en las granjas encuestadas.

Sin embargo, el único factor de los expuestos en la tabla 26 que parece estar relacionado con las granjas situadas en la zona de riesgo de manera estadísticamente significativa es precisamente la rotación de los principios activos de los productos destinados a la realización de las tareas D.D. ($p < 0.049$). Concretamente, las granjas situadas en la zona de riesgo no rotan los principios activos de estos productos con una frecuencia 5.9 veces superior a las granjas situadas en la zona de menor riesgo.

De cualquier manera recalcar que, en las ganaderías encuestadas, en general, no se cumplen los protocolos presentes en la bibliografía en cuanto a tiempos de exposición y principios activos utilizados en estas tareas (Scott y Williams, 1990; Blaha y cols., 1995; Arricau-Bouveri y Rodolakis, 2005). Por ello, estimamos que lo que se puede estar apreciando tras la realización de la encuesta con el estudio de esta variable es ver que ganaderías dedican más medios y tiempo a la limpieza y desinfección de sus instalaciones, más que el hecho de que la rotación de los principios activos puedan estar influyendo verdaderamente en un hecho diferencial entre las diferentes zonas propuestas en cuanto al riesgo de presencia de *Coxiella* en leche.

Por otro lado, en cuanto a la contratación de personal como signo de distinción entre una caprinocultura tradicional familiar enfrente a los sistemas más industriales,

queda patente que el sistema tradicional familiar está bien representado en los estratos 1+2, mientras que el estrato 3 representa un sistema más industrial.

Las tareas de limpieza, desinfección y desparasitación son de vital importancia en los planes de control de enfermedades causadas por agentes infecciosos que gozan de una amplia presencia en el medio, como es el caso que nos ocupa. Así, en Chipre, se logró disminuir considerablemente la prevalencia de fiebre Q en el ganado ovino de este país mediante la implantación de una serie de medidas preventivas relacionadas con las tareas L.D.D.: desinfección de corrales, eliminación y destrucción de placentas tras los partos, aislamiento de animales con complicaciones en los partos y desparasitación periódica del ganado (Polydorou, 1985). Una situación similar fue observada por Pascual (1994) en su estudio seroepidemiológico sobre la fiebre Q en Lanzarote, ya que, en el caso de la granja experimental (gestionada por el Cabildo Insular de Lanzarote), se observó que, a pesar de que el ganado tenía un origen mixto de ganados con alta y baja seroprevalencia de la isla de Lanzarote, lo cierto es que una serie de medidas como las mencionadas anteriormente en presente párrafo, unidas a la práctica de la lactancia artificial y a la instauración de un plan vacunal (en el que no se incluía la vacunación contra la fiebre Q) marcaban un hecho diferencial con el resto de las granjas de la isla que parecía ser la causa de que la seroprevalencia en esta explotación fuera sensiblemente inferior a la media de la población en estudio.

G. Manejo reproductivo: control de la fertilidad, abortos y atención de los partos.

De los resultados expuestos en la tabla 27, destaca la estimación de la media poblacional para la tasa de abortos en primerizas. Sin duda, se trata de un valor elevado que contribuye a aumentar la tasa total de abortos en las explotaciones encuestadas. Si realizamos un cálculo aproximado para determinar la tasa media de abortos en las explotaciones encuestadas tomando como datos de referencia las medias muestrales halladas para la proporción de primerizas (27.39%), de abortos en baifas o primerizas (45.83%) y de abortos en adultas (12.06%) y, suponemos una vida útil media de las cabras en producción situada entre 4 y 5 años, con lo que, el 27.39% de los animales de la población diana tendrían una tasa de abortos del 45.83%, mientras que el 72.61% restante tendría una tasa de abortos del 12.06%, tendríamos un resultado final aproximado para la mencionada tasa media total de abortos de la población diana del 22.23%.

También es importante resaltar que las granjas encuestadas pertenecientes a los estratos 1+2 sobrepasan el valor de referencia, o mediana, para las variables tasa de abortos en primerizas y tasa de abortos en cabras con dos o más partos con mayor frecuencia que las granjas del estrato 3 (un 38.74% y un 61.26% más respectivamente para ambas variables). Sin embargo, en el caso de la tasa de infertilidad, las granjas encuestadas pertenecientes al estrato 3 sobrepasan el valor de referencia con mayor frecuencia que las granjas de los estratos 1+2 (un 116.23% o 1.16 veces más). No obstante, en el estudio inferencial realizado en el presente apartado (tabla 28), no se ha podido relacionar a ninguna de las variables expuestas con la distribución por zonas (en función del riesgo) de las explotaciones.

Otra particularidad observada en el presente estudio y que tiene relación con la importancia de la estacionalidad en la presentación de la fiebre Q y, que en el futuro, habrá de ser estudiada más en profundidad, es que la distribución en el tiempo de los partos presentan diferencias considerables cuando comparamos las explotaciones situadas en las zonas de riesgo (centro-norte) frente a las explotaciones que se sitúan en la zona de menor riesgo (centro sur) (fig. 24). Así, como se puede observar en el capítulo de resultados, las granjas situadas en la zona de riesgo, presentan el 94.02 % de los partos concentrados entre los meses de noviembre y abril (ambos inclusive), mientras que en el caso de las granjas situadas en la zona de menor riesgo, en la misma época, tan solo se registran el 65.67%, observándose que, entre los meses de junio y julio, en esta zona se dan el 30.05% de los partos. Esta diferencia en la distribución de los partos entre zonas, nos lleva a teorizar sobre la importancia de la concentración de los partos en torno a las épocas de riesgo de padecimiento de neumonías y de concentración de factores favorecedores de la diseminación aerógena de *C. burnetii* en la presentación de la fiebre Q en las poblaciones de ganado caprino. Como se ha podido apreciar, en la zona de mayor riesgo, los partos se concentran en torno a la época en la que confluyen, en mayor medida, los factores favorecedores de la transmisión vía aerógena de la enfermedad y de la aparición de neumonías en el ganado caprino. Por tanto, las estrategias en cuanto al manejo de los lotes y la distribución de los partos en las ganaderías pueden comportarse como factores determinantes en la presentación de la fiebre Q en las poblaciones de ganado caprino (Martin y cols., 1996; Tissot-Dupont y cols., 2004).

H. Presencia de artrópodos

En este apartado se refleja qué ganaderías están situadas en zonas en las que sus ganaderos han apreciado la presencia de artrópodos que parasitan habitualmente

a las cabras, relacionando a su vez, las zonas de presencia de artrópodos con las zonas establecidas en cuanto al riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche se refiere. En general, los ganaderos encuestados que advierten de la presencia de artrópodos comentan que las poblaciones de estos parásitos han ido disminuyendo drásticamente en los últimos 20 años, pero aún así, existen lugares en los que predominan con más frecuencia (como puede ser el caso de determinadas hoyas de origen volcánico, probablemente debido a la creación de un micro-hábitat favorecedor para las poblaciones de estos artrópodos) y existen años en los que se dan condiciones favorecedoras para el ciclo vital de estos parásitos que provocan altos crecimientos de sus poblaciones. No se ha procedido a la identificación de las especies existentes, pero los ganaderos hablan de al menos dos posibles especies diferentes. Una de estas especies la han identificado también como parásita de las ovejas y la otra, la han identificado también como parásita de los camellos.

Lo primero que llama la atención de los datos expuestos en la tabla 29 es la amplia distribución geográfica y la amplia variedad de habitats que tienen estos parásitos en la isla de Lanzarote. En cualquier caso, la zona este parece ser la zona de menor presencia de artrópodos. Los lugares en los que parecen estar presentes con mayor frecuencia se caracterizan por ser hoyas situadas en la zona centro y valles de la zona norte.

Por otra parte, se ha intentado relacionar a las granjas situadas en zonas con presencia de artrópodos con las zonas de riesgo propuestas, no habiéndose encontrado relación estadística con un nivel de significación suficiente entre ambas variables. De cualquier manera, la evolución de las poblaciones de garrapatas depende mucho de las condiciones climatológicas, entre otros factores, lo que hace que en determinados años, estas poblaciones se incrementen de manera importante (Pascual, 1994). Esto nos lleva a la conclusión de que, sería interesante observar si existe relación entre la evolución de las poblaciones de estos ectoparásitos y la evolución de la fiebre Q en las poblaciones de ganado caprino. En este sentido, si bien existen estudios con animales de experimentación que demuestran que estos artrópodos pueden transmitir la enfermedad (Smith, 1940; Peter y cols., 1988), lo cierto es que determinados estudios observacionales sobre la fiebre Q en las poblaciones animales apuntan a que la importancia de las garrapatas en la transmisión de la fiebre Q es limitada y prescindible en el caso de los ungulados domésticos, con lo cual, parece ser que su acción sería más importante como reservorio de la enfermedad en la naturaleza que como transmisor de la misma (Babudieri, 1959; Marrie y cols., 1986; Lang, 1990).

I. Alimentación

La evolución de la caprinocultura en Canarias en las últimas décadas, desde los sistemas tradicionales extensivos, a sistemas intensivos de producción, ha implicado cambios importantes en la alimentación del ganado que pueden conducir a aumentar la frecuencia de presentación de patologías como la acidosis ruminal y la toxemia de gestación (Howard, 1993; Hungerford, 1990; Ramos, 1997; Santamaría, 1997). Estas patologías, con fuerte tendencia a la cronificación en los sistemas de producción intensivos, se comportan como factores predisponentes de otras enfermedades del ganado y, en el caso de la toxemia de gestación, puede convertirse en una causa importante de abortos (sobre todo en cabras de más de dos partos). Es por ello, que también se han registrado datos sobre la alimentación del ganado caprino en las ganaderías encuestadas, los cuales se presentan en la tabla 27 en forma de frecuencias absolutas y relativas. De nuevo, se cruzan los datos de alimentación en cuanto al aporte de alimentos concentrados y de forrajes de fibra larga frente a la zona que pertenecen las granjas, siendo los hipotéticos factores de riesgo propuestos en este caso, el que se suministren más de 2 kg de concentrado por animal y día y, que no se aporte fibra larga, con lo cual, los animales han de obtener este recurso mediante el pastoreo, lo cual, dado lo árido de los pastos, es imposible (Plan Director Ganadero de Canarias, capítulo XIV, Subsectores Caprino de Leche y de Caprino de Carne, año 2000).

Como se puede apreciar en la tabla 31, no se ha podido relacionar a las variables expuestas relacionadas con el racionamiento, con la distribución por zonas establecida, de acuerdo con el riesgo de presencia de *C. burnetii* en leche, establecida en la primer estudio inferencial.

Sin embargo y según el estudio de Rodolakis y colaboradores (2007), el patrón de eliminación de *C. burnetii* al medio en el ganado caprino se caracterizaba porque la vía de eliminación principal en esta especie es a través de la leche. Esta observación conduce a preguntarse el papel que juega este patrón de eliminación del agente causal en su diseminación ambiental y en la transmisión de la fiebre Q en las poblaciones caprinas. Como se ha visto anteriormente en el presente capítulo de discusión, a razón de lo expuesto en la bibliografía, la posibilidad de que *C. burnetii* provoque la enfermedad mediante la vía oral, no solo no está demostrada experimentalmente, sino que además y atendiendo a la bibliografía existente, es bastante improbable que esto ocurra (Married y cols., 1985; Sesma, 1990; Latorre y cols., 1995; Caron y cols., 1998; Maurin y Raoult, 1999; Tissot-Dupont y cols., 2004;

Ergas y cols., 2006; Cilla y cols., 2008; Delsing y Kullberg, 2008). Esto nos lleva a plantear la siguiente hipótesis para futuros trabajos al respecto: “la masiva eliminación de *C. burnetii* por la leche registrada tras las parideras principales, contribuye a crear animales lactantes que diseminan heces contaminadas tras repetidas ingestas de leches que cuentan con importantes concentraciones del agente causal (Berri y cols., 2006; Rodolakis y cols., 2007; Rousset y cols., 2009). Este mecanismo de diseminación medioambiental de *C. burnetii* unido a la eliminación por otras vías presentes en los animales infectados (placentaria, flujo vaginal, orina, etc), podría significar una importante contribución a la posterior diseminación y transmisión de la enfermedad mediante la vía aerógena (Rodolakis y cols., 2007)”. Sin embargo, no existen hasta el momento, trabajos que hayan estudiado el patrón de eliminación de *C. burnetii* en heces y orina en animales de menos de 10 meses en el caso del ganado caprino ni en ningún ungulado doméstico.

También llama la atención el papel que puede jugar la lactancia artificial en la lucha y control contra enfermedades como la fiebre Q, ya que, si estuviésemos en lo cierto con respecto a la hipótesis sobre la importancia en la diseminación del agente causal en el medio a través de las heces contaminadas de animales lactantes que ingieren, mediante la lactancia natural, leches con altas concentraciones de *C. burnetii*, esta práctica alternativa de manejo podría reducir y controlar de manera eficiente la contaminación del medio con *Coxiella* garantizando, por una parte, la ingesta necesaria de calostros (la cual contribuiría a proveer a los lactantes de una correcta inmunidad pasiva), de otro lado, la aplicación de tratamientos térmicos a los lacto-reemplazantes que permitan la eliminación de este agente causal en los mismos disminuiría la concentración de *C. burnetii*, impidiendo de esta manera, un probable mecanismo amplificador de la diseminación del agente causal en el medio a través de los animales lactantes y, por último, mencionar la importancia del aislamiento de los animales lactantes de los animales adultos que promueve esta práctica de manejo, situación esta, que contribuiría a disminuir el riesgo de contagio en lactantes a partir de las secreciones postparto y de las heces contaminadas de los animales de reposición y en edad productiva (Enright y cols., 1957).

J. Otros datos de interés obtenidos tras la realización de la encuesta.

De cara a la posibilidad de instaurar en el futuro un plan de lucha y control contra la fiebre Q en la Isla de Lanzarote, la encuesta realizada en el presente estudio arroja una serie de datos que entendemos que han de ser tenidos en cuenta. El 73.68% de las ganaderías encuestadas tienen más de 20 años de antigüedad,

siendo la edad media de sus propietarios de 57 años. Esta es una situación preocupante en el sector agrario de Canarias en general que amenaza a la perpetuidad del sector primario en las islas, sector que por otra parte, entendemos que es de una importancia estratégica fundamental en el marco del desarrollo de un modelo económico sostenible alternativo al actual modelo en crisis, no solo por el bajo grado de autoabastecimiento existente en el archipiélago, sino porque existe un mercado local que permite un mayor desarrollo del sector agrario canario en general mediante el acompañamiento de nuevas tecnologías y, de prácticas de producción más rentables y competitivas en calidad. Si a esto añadimos el actual escenario energético mundial en el que las producciones propias pueden jugar un papel estratégico importante en el cambio de modelo energético y, si además sumamos el valor añadido que la actividad agraria desempeña medioambientalmente y como fuente de puestos de trabajo, es lógico pensar que la falta de desarrollo del sector primario de este archipiélago es un lujo que la sociedad canaria no se puede permitir. Luego, este es un reto político, social y económico que Canarias tiene aún pendiente de cara a su conveniente desarrollo socioeconómico.

Por otra parte, la formación académica de los propietarios de las explotaciones encuestadas es escasa, lo cual hace que los cursos de formación a estos profesionales de cara a instaurar un plan sanitario tengan que ser eminentemente prácticos. En este sentido, las ADS juegan un papel fundamental que entendemos que hasta ahora no ha sido aprovechado en todo su potencial. No debemos de olvidar que el 89.48% de las granjas encuestadas tenían contratados los servicios del veterinario de dicha asociación. En múltiples ocasiones se ha debatido en diferentes escenarios técnicos e institucionales acerca de la importancia de estas entidades como una herramienta que permite mantener a técnicos veterinarios en constante contacto con la realidad ganadera y se han hecho diversos intentos por parte de los productores, de los técnicos contratados por estas entidades y de las administraciones públicas de cara a mejorar el funcionamiento de las mismas, pero la realidad es que dichos intentos en muchos casos no terminan de cuajar en la realidad del sector.

Nosotros entendemos que esto es debido a una falta de planificación conjunta entre las Administraciones Públicas implicadas, otras posibles entidades colaboradoras (centros de investigación, etc.) y las propias ADS, acompañado todo ello, de una financiación insuficiente. Por otra parte, entendemos que es imprescindible una mayor inversión en investigación con el fin de crear planes de lucha y control contra enfermedades cada vez más efectivos, basados en actuaciones

y estrategias de fácil aplicación en la realidad ganadera. De esta manera, se lograría una mayor implicación de los ganaderos, que verían justificada su inversión en materia de Sanidad Animal y, por otra parte, las Administraciones Públicas dispondrían de herramientas y conocimientos para priorizar objetivos en materia de sanidad animal y pública, así como, para exigir el cumplimiento en un tiempo dado de una serie de objetivos bien programados y plenamente asumibles por todas las partes (Garner y cols., 1997; Serbezov y cols., 1999; Hellenbrand y cols., 2001; Kermodé y cols., 2003; Gidding y cols., 2009) .

5.3. MÉTODO MATEMÁTICO PROPUESTO PARA CALCULAR LA SENSIBILIDAD DE LA TRANS-PCR A TIEMPO REAL TRAS SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO CON MUESTRAS CLÍNICAS DE LECHE DE CABRA EN LA ISLA DE LANZAROTE.

Como se pudo apreciar en el capítulo de resultados, la concentración mínima de *C. burnetii* cepa Nine Mile detectada durante los ensayos realizados en la puesta a punto de la Trans-PCR-TR fue de aproximadamente 8.01×10^3 células de *C. burnetii* por ml, siendo el ciclo umbral detectado para esta concentración bacteriana de 38.82. Sin embargo, la técnica cuando se aplicó en el diagnóstico de las muestras de campo, pudo detectar muestras positivas con ciclos umbrales superiores a éste. Concretamente, hay una única muestra positiva detectada con un valor de ciclo umbral de 43.19.

Según la curva patrón obtenida a partir de la puesta a punto de la técnica con el aislamiento de referencia Nine Mile, el valor de ciclo umbral de 43.19 se correspondería con una concentración bacteriana del mencionado aislamiento de referencia equivalente a 1.52×10^2 células de *C. burnetii* / ml. Pero éste es un valor aislado y anómalo, ya que los valores de ciclo umbral observados en las muestras positivas se distribuyen muy cerca unos de otros hasta el ciclo umbral 40.6, y ahí se produce un salto hasta el único positivo que se detecta en el ciclo umbral 43.2. Luego, si bien es cierto que en los análisis de las muestras de campo se llegó a detectar un positivo con el mencionado valor de ciclo umbral, los datos observados apuntan a que, la técnica de Trans-PCR-TR y, en el caso concreto de nuestras investigaciones, por encima del ciclo umbral 41.0 detecta, con una mayor dificultad, a las muestras positivas. De hecho, y como se puede ver en el capítulo de resultados, los ajustes probabilísticos realizados con los datos de ciclo umbral mejoran cuando se suprime este valor anómalo.

Por tanto, y en función de los resultados obtenidos, podríamos concluir diciendo, que el valor máximo de ciclo umbral detectado para una muestra positiva con la mencionada técnica a tiempo real ha sido, en nuestro caso, 43.2 (lo que equivaldría a una concentración bacteriana estimada de 1.52×10^2 células de *C. burnetii* cepa Nine Mile /ml), si bien, la técnica se muestra más fiable hasta un valor máximo de ciclo umbral de aproximadamente 41.0 ciclos (lo que en términos de concentración bacteriana del aislamiento de referencia Nine Mile supondría, aproximadamente, 1.17×10^3 células de *C. burnetii*/ml). Lógicamente, estamos hablando de estimaciones realizadas teniendo en cuenta los datos de ciclo umbral observados tras el análisis de

las muestras de campo y extrapolándolos a los obtenidos durante la fase de puesta a punto de la técnica.

Luego, cuando nos referimos a las muestras de campo y debido a que no se han realizado aislamientos de *C. burnetii* en la isla de Lanzarote con el fin de realizar la identificación de las cepas de *C. burnetii* existentes en la isla y, debido también, a la variabilidad existente en la región IS1111 detectada entre diferentes aislamientos identificados de *C. burnetii* en diferentes regiones del mundo, hace que, como se ha constatado ya anteriormente (Klee y cols., 2006; Denison y cols., 2007), no podamos extrapolar los datos de concentración bacteriana detectada por la técnica para el aislamiento de referencia Nine Mile a las muestras de campo de nuestro estudio. Luego, al referirnos a estas muestras, solo podemos hablar de ciclo umbral detectado y no de concentración bacteriana, al menos no con un grado de confiabilidad aceptable. Eso sí, como es lógico, cuanto mayor es el ciclo umbral en el que se detecta la presencia de ADN de *C. burnetii* menor es la concentración bacteriana de la muestra positiva de campo, aunque no podemos hablar de valores concretos en cuanto a concentración bacteriana de la muestra.

Como se pudo apreciar en el apartado de resultados, según los datos observados de ciclo umbral para las muestras positivas (56 muestras de un total de 405 analizadas), la media poblacional para los animales positivos para esta variable se situaría en el siguiente intervalo de confianza (IC 95%; 36.26 ± 0.79), siendo el valor mínimo detectado (máxima concentración de *C. burnetii*) de 27.27 ciclos y el máximo (mínima concentración de *C. burnetii*) de 43.19 ciclos. Klee y colaboradores (2006), tras realizar un ensayo orientado a estimar el número de copias de la región IS1111, presente en cada uno de los genomas de los 75 aislamientos de referencia analizados, originarios de diferentes regiones del mundo, llegaron a la conclusión de que el número de copias variaba según los diferentes aislamientos, oscilando el número de las mismas por genoma entre 7 y 110 copias. Eso sí, la mayor parte de los aislamientos estudiados presentaban valores comprendidos entre 10 y 30 copias. Por tanto, el aislamiento Nine Mile se situaría en un término medio en cuanto al intervalo de valores para el número de copias presente en el grupo mayoritario (aproximadamente 20 copias).

Según lo expuesto en el párrafo anterior, si realizáramos una aproximación con el fin de cuantificar la concentración de células de *C. burnetii* existente en las muestras de campo a partir de los registros de ciclo umbral observados en el presente estudio, extrapolando los valores determinados para la curva estándar de cuantificación para

el aislamiento de referencia Nine Mile, con el fin de hallar valores aproximados de concentración de *C. burnetii* en las muestras de leche de campo con los datos de ciclo umbral observados tras su análisis, obtenemos que, las concentraciones bacterianas de *C. burnetii* detectadas en estas muestras estarían en valores comprendidos entre 1.52×10^2 y 7.14×10^6 células de *C. burnetii*/ml, estimándose para los animales positivos en esta aproximación, el siguiente intervalo de confianza para la media poblacional (IC 95%; $5.4 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^3$ células de *C. burnetii*/ml). En cualquier caso, no hay que olvidar que se trata de una aproximación bastante arriesgada que se basa en los datos expuestos en el párrafo anterior (Klee y cols., 2006).

De hecho, y como se ha dicho anteriormente, los resultados de sensibilidad en función de ciclo umbral detectado fueron mayores en el caso del análisis de las muestras de campo que en el caso de la puesta a punto de la prueba en el laboratorio. Este fenómeno podría deberse a pequeñas variaciones en el número de secuencias de inserción IS1111 entre los genomas del aislamiento de referencia tomado como control y los genotipos de *C. burnetii* existentes en Lanzarote. Por ello, futuros estudios orientados a determinar el número de copias de la secuencia de inserción IS1111 en muestras de leche de cabras de Lanzarote, mediante la aplicación de técnicas de PCR a tiempo real según el método descrito por Klee y colaboradores, combinando una PCR a tiempo real basada en la amplificación de las regiones IS1111 con otra que amplifique otra región única *icd* (presente también en el genoma de todas las cepas de *C. burnetii*), permitirían realizar aproximaciones más fiables en cuanto a la cuantificación en el análisis de las muestras de campo, lo cual a su vez, contribuiría a realizar labores de genotipado de los genomas de *C. burnetii* existentes en el mencionado territorio (Glazunova y cols., 2005; Klee y cols., 2006).

En este sentido, Enrigh y colaboradores (1957) analizaron un total de 376 muestras de leche de oveja de diferentes ganaderías (obtenidas en el punto de venta) y un total de 137 muestras de leche de vaca extraídas directa e individualmente de los animales. El método de detección de *C. burnetii* utilizado en dicho estudio fue la inoculación intraperitoneal en cobaya, haciendo dos pases consecutivos. En el caso de las muestras de leche de oveja se determinó que, en 14 muestras de leche cruda y en una de leche pasteurizada se pudo detectar la presencia de células de *C. burnetii* viables, mostrando un máximo de 10^3 dosis infectantes de *C. burnetii* en 2 ml de leche. En el caso de las muestras individuales de leche de vaca, 18 muestras mostraron tener células de *C. burnetii* viables (el volumen muestral era de 2 ml) con la siguiente distribución: 3 muestras contenían 10^3 dosis infectantes; 5

muestras 10^2 dosis infectantes; 5 muestras 10 dosis infectantes; 1 muestra 1 dosis infectante. El autor definía la dosis infectante en dicho estudio como la dosis mínima necesaria para provocar una infección tras inocular intraperitonealmente a un cobaya. Si realizamos nuevamente una aproximación y tomamos como cepa de referencia al aislamiento Nine Mile, y suponemos que la dosis infectante mínima necesaria para producir infección mediante la vía intraperitoneal en el cobaya está próxima a 10^2 células de *C. burnetii* (La Scola y cols. 1997), obtenemos que según los hallazgos de Enrigh y colaboradores (1956) podrían darse unas concentraciones de *C. burnetii* en las muestras de leche estudiadas situadas en torno a 5×10^4 y 50 células de *C. burnetii* por ml. Como se puede ver, son resultados que, si bien se dieron en otras especies de rumiantes, muestran valores muy próximos a los estimados en nuestro estudio para muestras de leche de cabra.

Por otra parte, Vaidya y colaboradores (2008), hablan de concentraciones aproximadas de *C. burnetii* presentes en diversos tipos de tejidos y fluidos corporales en el citado trabajo sobre abortos espontáneos en humana, realizado en la India. Veamos a continuación los datos reflejados en dicho estudio (resultados expresados en número de células de *C. burnetii* por microlitro): tejido placentario (1.68×10^2 - 4.16×10^6); fluidos genitales (2.61×10^4 - 8.11×10^4); orina (2.31×10^1 - 6.01×10^1); heces (1.13×10^1 - 1.39×10^1).

Estos datos de cuantificación dan una idea de la importancia de los animales portadores eliminadores de *C. burnetii* en la propagación de la Fiebre Q en las poblaciones animal y humana. Según diversos estudios de experimentación animal, prestando atención a los datos sobre la dosis infectante de *C. burnetii*, podemos apreciar que las cantidades de esta bacteria eliminadas por los portadores al medio son muy superiores a las necesarias para producir infección mediante la principal vía de transmisión, la vía aerógena (en cobayas por ejemplo, la vía intranasal precisa de menos de 10 células *C. burnetii*), así como por el resto de vías de transmisión estudiadas (Stoenner y Lackman, 1960; Lang, 1990; La Scola y cols., 1997). Esta cualidad del agente de la fiebre Q de poder eliminarse al medio mediante múltiples secreciones y excreciones, además de por los tejidos placentarios contaminados, unido a la gran capacidad de resistencia en el medio externo, se convierten en dos de los principales mecanismos de expansión de la enfermedad.

Retomando de nuevo el estudio de la sensibilidad alcanzada por la Trans-PCR a tiempo real en el presente estudio y, como se ha podido ver en el desarrollo del presente capítulo, las pruebas de sensibilidad realizadas por diversos autores, se

basan únicamente, en determinaciones puramente laboratoriales, en las que se observa cual es la concentración mínima de un aislamiento de referencia (concretamente, Nine Mile) que es capaz de detectar la prueba (Lorenz y cols., 1998; Berri y cols., 2000; Klee y cols., 2006; Vaidya y cols. 2008). Lógicamente, la combinación de métodos de purificación y de extracción de ADN más modernos y eficientes con la Trans-PCR a tiempo real así como la evolución de los primers logra una capacidad de detección muy buena con el aislamiento de referencia Nine Mile RSA (con valores de detección inferiores a 17 *Coxiellas*/μl). Pero, por un lado, se ha de tener en cuenta la diferencia en cuanto el número de regiones IS1111 existente entre los diferentes aislamientos de campo analizados por Klee y colaboradores (2006), con lo cual, tenemos aislamientos que tienen tan solo 7 copias en vez de las aproximadamente 20 que tiene el aislamiento Nine Mile RSA493, lo cual puede repercutir en la sensibilidad real de la prueba, dependiendo de la cantidad de copias de IS1111 presentes en el genoma de *C. burnetii* en las distintas regiones del mundo (a menor número de copias, menor sensibilidad).

Como se ha visto anteriormente, Vaidya y colaboradores (2008), realizan un estudio comparativo entre la serología (técnica IFI), la Trans-PCR y el cultivo celular como un acercamiento al establecimiento de un valor de sensibilidad en términos relativos y con muestras reales. En este caso, la técnica que se mostró más sensible fue la técnica de IFI, pero este resultado tiene una serie de matices que conviene resaltar. De un total de 19 muestras positivas, la mayor parte de estas muestras fueron positivas a IgG frente a una minoría de positivos que mostraron positividad frente a IgM e IgA, registrándose 12 muestras positivas a la fase II y 7 a la fase I de *C. burnetii*, no mostrándose la distribución exacta de los positivos, según la positividad mostrada a uno u otro tipo de inmunoglobulina, en el citado artículo.

Según Peter y colaboradores (1988), en un estudio orientado a la puesta a punto de una prueba de ELISA para la diagnosis de la fiebre Q crónica, se observó que la IgA contra las fases I y II de *C. burnetii* y, la IgM contra la fase I, se mostraron con valores persistentemente mayores en la fiebre Q crónica que en la fiebre Q aguda. Por otra parte, en ensayos en los que se ha procedido a la inoculación o vacunación con fase I a cobayas se ha demostrado que se producen anticuerpos tempranos frente a la fase II de *C. burnetii* (de 3 a 12 días) mientras que, los anticuerpos frente a la fase I son más tardíos, apareciendo a partir del día 12 al 30 (Peacock y cols., 1983; Stoker y Fiset, 1956). Luego, estos factores han de tenerse en cuenta a la hora de comparar la sensibilidad de una técnica serológica con una técnica como la PCR (ya sea convencional o a tiempo real), ya que puede ocurrir que, pacientes que

han sufrido la enfermedad en el pasado o que han tenido contacto con el agente causal, presenten anticuerpos frente a la fiebre Q y que otro agente causal haya producido el aborto a la hora de realizar el diagnóstico, con lo cual no se eliminaría *C. burnetii*, ya que no es el verdadero agente abortivo, pero si tendríamos anticuerpos contra la enfermedad.

Por otra parte, se han demostrado reacciones cruzadas en diversas técnicas serológicas existentes para el diagnóstico de fiebre Q con otros microorganismos como pueden ser *Bartonella quintana* y *Bartonella henselae* (La Scola y Raoult, 1996). De hecho, en este estudio en el que se investigaron las citadas reacciones cruzadas, se observó que el 50% de los pacientes con fiebre Q crónica diagnosticada fueron positivos a anticuerpos específicos contra *B. henselae*. Sin embargo, la Trans-PCR ha sido testada con múltiples microorganismos, inclusive cercanos evolutivamente, y en ningún caso se ha demostrado la presencia de reacciones cruzadas (Berri y cols., 2000; Klee y cols. 2006).

Luego ante este escenario, el método para determinar la sensibilidad de la Trans-PCR-TR que se expone en el presente estudio puede contribuir, a partir de los datos de ciclo umbral observados tras el análisis de las muestras positivas, y siempre acompañado de un muestreo lo suficientemente representativo de la población sobre la que se aplica la técnica con fines diagnósticos y/o epidemiológicos, a determinar la sensibilidad mediante los cálculos de probabilidad expuestos, ya que los datos recogidos se ajustarán a una distribución de probabilidad conocida.

Este hecho, científicamente comprobado, logra que se haya pensado en la creación de un método matemático basado en cálculos de probabilidad que permita determinar la tasa de falsos negativos en una población concreta tras la realización de un estudio epidemiológico basado en la PCR a tiempo real. Al estimar la tasa de falsos negativos, obtendríamos el valor de sensibilidad de la prueba.

Esta metodología para el estudio de la sensibilidad de la prueba a partir de los datos de ciclo umbral en la emisión de fluorescencia durante la amplificación del ADN en el transcurso de la PCR a tiempo real podría ser extensible, no solo al análisis de muestras de leche, sino que es probable que patrones de distribución de probabilidad similares ocurran cuando se utilice esta técnica diagnóstica para analizar otros tipos de muestras contaminadas por *C. burnetii* (placentas, fluidos vaginales, etc...) y su uso puede ser extensible a técnicas de PCR a tiempo real diseñadas para la detección de otros microorganismos. Lo cual, nos brinda un método que no se basa solo en ver

que concentración mínima de ADN es capaz de detectar la PCR en el laboratorio como medida de sensibilidad de la prueba, sino que además, nos brinda la oportunidad de obtener los resultados de sensibilidad, fruto de su aplicación en el diagnóstico, con muestras reales o de campo.

Partimos de la idea básica de que aquellas muestras de leche que realmente presenten el agente causal pero no hayan sido detectadas por la técnica como positivas, será debido a que cuentan con una concentración de ADN de *C. burnetii* inferior a la que es necesaria para alcanzar el valor de ciclo umbral máximo que es capaz de detectar la prueba. Hay que recordar que, cuanto mayor es el valor del ciclo umbral, menor es la cantidad de ADN inicial de *C. burnetii* de la muestra y por ello, han de transcurrir un mayor número de ciclos de amplificación para poder traspasar el umbral de emisión de fluorescencia necesario para considerar a la muestra como positiva. Luego, si el ciclo umbral de la muestra problema es superior al ciclo umbral máximo que es capaz de detectar la prueba, se estaría produciendo un falso negativo. Lógicamente, los valores de probabilidad para estos casos no estarían registrados, luego existen valores a la derecha no registrados.

Por tanto, para proceder a ajustar correctamente una distribución de probabilidad en estas condiciones es necesario tener en cuenta la existencia de posibles valores no registrados a la derecha de la distribución. Técnicamente, ello significa que estamos ajustando una distribución condicionada a que la variable tome un valor mayor que C (umbral de detección). Luego para la realización del ajuste de los parámetros de la distribución de probabilidad aplicaremos el método de máxima verosimilitud condicionada (no utilizando la estándar, ya que esta no tendría en cuenta los datos censurados).

Para poder diseñar un método matemático para calcular la sensibilidad de la Trans-PCR-TR, partimos de la idea básica de que aquellas muestras de leche que realmente presenten el agente causal pero no hayan sido detectadas por la técnica como positivas, será debido a que cuentan con una concentración de ADN de *C. burnetii* inferior a la que es necesaria para alcanzar el valor de ciclo umbral máximo que es capaz de detectar la prueba. Por tanto, para proceder a ajustar correctamente una distribución de probabilidad en estas condiciones es necesario tener en cuenta la existencia de posibles valores no registrados a la derecha de la distribución.

El hecho de que se llevaran a cabo dos series de ajustes a las distribuciones Normal, Gamma, Logística, Weibull, Gumbel y Lognormal, en todos los casos con

truncamiento a la derecha (Supuestos A, 43,2 ciclos y Supuesto B, 41,0 ciclos), se debió a que el valor de 43,2 ciclos representa un valor anómalo.

Respecto al cálculo del p valor de las diferentes distribuciones de probabilidad comentar el test Anderson Darling (AD) 2 es el más preciso para medir el ajuste global a la distribución teórica supuesta, ya que considera todos los valores observados. Los tests AD y Kolmogorov-Smirnov (KS) son similares, aunque el test AD tiene más en cuenta el ajuste en las colas mientras que el test ADup tiene en cuenta sobre todo el ajuste en la cola superior. No obstante, si el ajuste global es malo, aunque el ajuste en la cola superior sea bueno, ello sería síntoma de que la adquisición de nuevos datos podría llegar a variar mucho el ajuste global y desplazaría de algún modo el ajuste en la cola.

En base a los resultados obtenidos podemos asumir que los datos del ciclo umbral se ajustan a una distribución logística, siendo la tasa de falsos negativos en este caso del 8.07%, con lo cual, tendríamos una sensibilidad para la Trans-PCR a tiempo real en nuestro caso concreto del 91.93%.

En cuanto a las aplicaciones de la función logística de cara a determinar valores de sensibilidad y especificidad de técnicas diagnósticas podemos encontrar varios trabajos donde se combinan con éxito el análisis de bases de datos empíricos mediante la regresión logística y la elaboración de curvas ROC o curvas de rendimiento diagnóstico (García-Valdecasas y cols., 2011; Mead y cols., 2011). Sin embargo, dichos trabajos difieren del nuestro en cuanto a que en ellos se trata de determinar el rendimiento de una técnica diagnóstica de cara a determinar la existencia o no de enfermedad. En nuestro caso no es así.

Nosotros diagnosticamos presencia de agente causal en la leche, no enfermedad. Por tanto, el objetivo en este caso es muy diferente. En el caso de ver el rendimiento de una técnica diagnóstica de cara a la detección de enfermedad hemos de contar con una técnica muy confiable o estándar de oro que nos sirva de referencia a la hora de saber el estado de salud de los individuos sometidos a la prueba de rendimiento diagnóstico (Burgueño y cols., 1995). En nuestro caso, se trata de determinar únicamente la probabilidad de un suceso, es decir, la probabilidad de que un animal que elimina la Coxiella por la leche, lo haga con una concentración tan pequeña que no se pueda detectar mediante la técnica, basándonos para tal cálculo en la base de datos de ciclo umbral (parámetro indicativo de la concentración bacteriana) obtenida a partir de las muestras positivas en el presente estudio y tras realizar un muestreo representativo de la población diana y un estudio laboratorial previo de la capacidad

de detección de la técnica utilizando la cepa de referencia Nine Mile.

Como se pudo apreciar en el capítulo de resultados (tablas 32 y 33; figuras 25 y 26), en nuestro caso, la distribución de probabilidad que mejor se ajustaba a los datos observados fue la que viene dada por una función logística, siendo mejor el ajuste cuando lo realizábamos fijando el umbral a 41 ciclos, obteniendo una sensibilidad estimada para la Trans-PCR a tiempo real basada en el fluorocromo no específico Syber-green®, tras analizar las muestras de leche de cabra de campo, del 91.93%. Como se ha podido apreciar, este dato de sensibilidad es mejorable utilizando métodos de purificación, de extracción, de amplificación y de detección del ADN muestral que permitan detectar *C. burnetii* en muestras de leche menos contaminadas aún por esta bacteria, pero lo cierto es que, la sensibilidad obtenida con muestras de campo en el presente estudio, aún siendo mejorable y unido a la alta especificidad de la técnica, la convierten en una muy buena técnica de diagnóstico con importantes aplicaciones en epidemiología.

En el presente estudio, la sensibilidad viene definida como la cantidad de portadores de *C. burnetii* que, eliminando esta bacteria por la leche, son detectados como positivos, mientras que la especificidad, vendría definida como la proporción de animales que realmente no eliminan esta bacteria por la leche y que son detectados por la prueba como negativos (Martin y cols., 1997).

En cuanto a la especificidad, ya se ha citado que existen distintos trabajos que, simulando la realidad (mediante la contaminación de muestras de leche con los microorganismos problema), han probado la especificidad de la Trans-PCR con un importante número de microorganismos, con el fin de detectar reacciones cruzadas. Ninguno de los microorganismos probados en las amplias baterías utilizadas en dichos estudios han dado resultados positivos a la Trans-PCR diseñada para amplificar la región IS1111, con lo cual, con los estudios existentes en la actualidad, se estima que la prueba presenta una especificidad del 100%. Lógicamente, esto significa que la secuencia presente en la región del genoma amplificada por la Trans-PCR es muy específica de *C. burnetii* (Berri y cols., 2000; Klee y cols. 2006). Por otra parte, el análisis de la temperatura de fusión en las muestras analizadas permite diferenciar claramente a las muestras positivas de las muestras en las que, habiendo existido amplificación, no se ha correspondido con las características detectadas para este parámetro en el control positivo.

En este sentido, entendemos que el método basado en el ajuste de los datos a

una curva de probabilidad conocida que proponemos (en nuestro caso, el ajuste a una curva de función logística), se muestra como una herramienta que nos permite un acercamiento más real al cálculo de la sensibilidad obtenida tras la aplicación de la Trans-PCR-TR de cara a detectar portadores que eliminan *C. burnetii* por la leche. De un lado, mediante la regresión lineal aplicada para realizar la curva estándar de cuantificación con el aislamiento Nine Mile, sabemos que el ciclo umbral está relacionado con la concentración del ADN muestral de manera inversamente proporcional, mientras que, tras el análisis de un número representativo de muestras de la población en estudio, obtenemos una base de datos en la que organizamos a las muestras positivas en intervalos de valores para la variable ciclo umbral, donde cada intervalo de valores ocurre con una frecuencia que toma un valor comprendido entre 0 y 1, ajustándose los valores observados a una curva que se corresponde con una distribución de probabilidad de tipo logístico. Este modelo logístico nos permite predecir la tasa de falsos negativos y, por ende, la sensibilidad, tal y como hemos visto, en el capítulo de material y métodos.

Por otra parte, a la luz de los resultados que se desprenden del análisis mediante el modelo logístico de distribución probabilidad en el presente estudio, otro parámetro que se estima importante de cara a la sensibilidad de la Trans-PCR es el número de ciclos aplicado en el programa de temperaturas durante la fase de amplificación del ADN muestral y tras la fase de touchdown o introductoria a la amplificación del mismo. En el caso de los ensayos realizados por Lorenz y colaboradores (1998) fueron 38 ciclos, en el caso de los ensayos de Klee y colaboradores (2006), Berri y colaboradores (2000) y Vaidya y colaboradores (2008) fueron 40 ciclos, siendo en nuestro caso el número de ciclos para esta fase de 45 ciclos. A la luz de los estudios realizados por otros autores citados en este apartado, la combinación ideal para obtener la máxima sensibilidad posible en el análisis de muestras de leche con la técnica de la Trans-PCR, es la realización de 40 ciclos en la fase de amplificación del ADN y la utilización del método de extracción en el que se realiza la purificación previa de las muestras con el kit comercial QIAmp Tissue (Qiagen S.A., France), mostrándose más sensible la técnica cuando se realiza a tiempo real que cuando se realiza sobre el producto final.

En nuestra experiencia con un método de extracción de ADN basado en una matriz de sílice, realizando la Trans-PCR a tiempo real con los cebadores diseñados para la Trans-PCR convencional o de punto final por Houver y colaboradores (1992), y según los datos obtenidos tras aplicar el modelo logístico utilizado en el presente estudio para calcular la sensibilidad, hemos observado, que si hubiéramos detenido la

fase de amplificación del ADN muestral en el ciclo 38.0 (según lo expuesto por Lorenz y cols., 1998) hubiéramos obtenido una sensibilidad del 67.56%, mientras que si la hubiésemos detenido en el ciclo 40.0 (según lo expuesto por: Berri y cols., 2000; Klee y cols., 2006; Vaidya y cols., 2008), habríamos obtenido una sensibilidad del 79.64%. Por tanto, entendemos que aumentando el número de ciclos en la fase de amplificación a 45 ciclos, en nuestro caso concreto, con los cebadores utilizados (los cuales fueron diseñados para la PCR convencional), con nuestro protocolo de temperaturas y tiempos para las diferentes fases de la Trans-PCR a tiempo real, hemos comprobado que se logra aumentar la sensibilidad de la prueba de cara a su aplicación con fines epidemiológicos y clínicos.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES.

“El arte del jeet kune do es sencillamente el de simplificar. Favorecer la carencia de forma para poder asumir todas las formas”; “Usando el no camino como camino y la no limitación como limitación”.

Bruce Lee

1. El límite de detección de ADN de *Coxiella Burnetii* Nine Mile mejora de una manera significativa cuando la técnica se desarrolla a tiempo real con respecto a lo observado cuando la técnica se desarrolla a tiempo final. Así mismo, el análisis de las temperaturas de fusión, refleja que dicho parámetro es válido para diferenciar claramente a los verdaderos positivos de aquellas muestras que a pesar de ser negativas emiten fluorescencia durante la amplificación debido a la formación de dímeros y/o productos inespecíficos.
2. En el presente estudio epidemiológico se ha detectado que en ciertas épocas del año la tasa de presencia es mayor (estación de mayor riesgo) que en otras (estación de menor riesgo). Las tasas de presencia para cada una de las estaciones serían del 40.82% y 5.21% respectivamente para ambas estaciones. Además, se ha podido demostrar estadísticamente que la evolución de la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche de cabra en las granjas de más de 100 cabezas de la isla de Lanzarote sigue un patrón estacional (los datos experimentales se ajustan bien a un modelo de Poisson).
3. No se ha podido demostrar estadísticamente, teniendo en cuenta únicamente los datos de presencia de *C. burnetii* en leches de cabra obtenidos en la estación de menor riesgo, la existencia de relación entre la presencia del agente causal en leche de cabra y cualquiera de las variables relacionada con el número de animales de las granjas analizadas.
4. Tampoco se ha podido demostrar estadísticamente, teniendo en cuenta únicamente los datos de presencia obtenidos en la estación de menor riesgo, la existencia de relación entre la presencia de *C. burnetii* en leche de cabra y la clasificación por zonas de las granjas (propuesta en el presente estudio), si bien es verdad, que las granjas situadas en la zona centro norte presentaban animales positivos con una frecuencia 3,3 veces superior a la detectada en las granjas de la zona centro sur.
5. Respecto a los factores que pudieran estar influyendo en esta diferencia

observada entre zonas, se llega a la conclusión de que el dimensionamiento de las explotaciones en cuanto al volumen de la zona cubierta y la atención puesta en las tareas de limpieza y desinfección, son factores que pueden estar influyendo en la diferencia observada entre zonas.

6. Se ha observado una distribución de los partos en las granjas que difiere según las zonas propuestas y que ayuda a explicar la diferencia de presencia de *C. burnetii* en leche observada entre dichas zonas. En la zona de mayor riesgo, la mayoría de los partos se concentran entre los meses de noviembre y abril, en contraposición con la zona de menor riesgo.
7. El método matemático propuesto para determinar la sensibilidad de la técnica, basada en el ajuste de los datos de ciclo umbral obtenidos tras analizar las muestras de campo a una distribución de probabilidad conocida, es un método que ofrece una visión más realista de la capacidad de esta técnica de cara a la detección de portadores eliminadores de *C. burnetii* al medio externo. Se observó que el mejor ajuste se obtenía para una curva de tipo logístico. Según los cálculos de probabilidad realizados, la sensibilidad de la Trans-PCR-TR utilizada en el presente estudio sería del 91.93%.
8. Tras realizar los cálculos de probabilidad orientados al cálculo de sensibilidad de la Trans-PCR-TR testada en el presente estudio, hemos observado que la realización de 45 ciclos se muestra como la opción más eficaz de cara a aumentar la sensibilidad de la prueba en nuestras condiciones laborales.
9. La trans-PCR-TR puesta a punto en el presente trabajo ha mostrado ser una eficaz herramienta de cara a la detección de portadores eliminadores de *C. burnetii* al medio externo.

Resumen

“La diferencia entre lo que hacemos y lo que seríamos capaces de hacer bastaría para resolver la mayor parte de los problemas del mundo”

Gandhi

7. RESUMEN

Introducción: La fiebre Q es una zoonosis con distribución mundial, siendo la única excepción Nueva Zelanda. Puede cronificarse y llegar a ser mortal en humanos. Produce importantes pérdidas económicas en los ganados de rumiantes domésticos, con la capacidad de disminuir los índices reproductivos de estas especies, además de ser un agente productor de mamitis. Esta enfermedad está ampliamente distribuida en la naturaleza, pudiendo infectar a múltiples especies salvajes de vertebrados e invertebrados. La fiebre Q es endémica en las islas Canarias, siendo el ganado caprino el principal reservorio animal de *Coxiella burnetii* en esta región.

Objetivos y metodología: **1.** Detectar la presencia de portadores eliminadores de *C. burnetii* mediante una Trans-PCR a tiempo real entre las cabras de las ganaderías de más de 100 cabezas existentes en la isla de Lanzarote, así como establecer si existe un patrón estacional en la eliminación de esta bacteria en la leche, ajustando los datos obtenidos a un modelo de distribución de probabilidad conocido. **2.** Detectar posibles factores de riesgo asociados a la presencia de *C. burnetii* en muestras de leche del ganado caprino en Lanzarote mediante la realización de una encuesta epidemiológica. **3.** Diseñar un método matemático que permita calcular la sensibilidad de la Trans-PCR a tiempo-real en su aplicación con muestras de campo mediante el ajuste de los datos de ciclo-umbral detectados para las muestras positivas a distintas curvas de probabilidad conocidas, para proceder posteriormente a calcular la probabilidad de que una muestra con presencia de *C. burnetii* no sea detectada (cálculo de la tasa de falsos negativos).

Resultados: **1.** La eliminación de *C. burnetii* en la leche de cabra producida en la isla de Lanzarote presenta un carácter estacional en el que las tasas de presencia de *Coxiella* en leche varían entre valores máximos y mínimos del 41.51% y 3.76% respectivamente, detectándose una relación entre la distribución temporal de los partos y la evolución de las tasas de presencia en leche del agente causal. Los datos se ajustan bien a un modelo de Poisson (razón de riesgos = 8.786; IC95%= 4.4-14.5; coeficiente de sobredispersión de 1.33). **2.** Los factores de riesgo asociados directamente a las tasas de presencia de *C. burnetii* en leche de cabra fueron la estación de muestreo ($p < 0.009$) y la zona donde se situaban las granjas. Si bien este último factor resultó no ser estadísticamente significativo ($p < 0.121$), la zona de mayor riesgo triplica la frecuencia de granjas positivas con respecto a la de menor riesgo. Los factores de riesgo asociados indirectamente, tras dividir a las granjas en dos grupos (las situadas en la zona de mayor y menor riesgo) fueron el dimensionamiento en cuanto al volumen de la zona cubierta de los corrales ($p < 0.003$) y la rotación de los principios activos en los productos de limpieza ($p < 0.049$). **3.** Los datos de ciclo umbral detectados en las muestras positivas analizadas mediante Trans-PCR a tiempo real se ajustan a una curva de tipo logístico, siendo la sensibilidad estimada para esta prueba diagnóstica del 91.93%.

Conclusiones: **1.** Se ha podido demostrar estadísticamente que la evolución de la tasa de presencia de *C. burnetii* en leche de cabra en las granjas de más de 100 cabezas de la isla de Lanzarote sigue un patrón estacional. **2.** El dimensionamiento de las explotaciones ganaderas y las tareas de limpieza y desinfección de las instalaciones ganaderas son los únicos factores de riesgo que han mostrado una asociación estadísticamente significativa. **3.** La Trans-PCR a tiempo real se ha mostrado como una técnica muy sensible para el análisis de las muestras de leche obtenidas directamente de las cabras en Lanzarote. El método matemático basado en el ajuste de los datos experimentales de ciclo umbral de las muestras positivas a curvas de probabilidad conocidas, diseñado para el cálculo de la sensibilidad real de la prueba, nos permite, mediante la aplicación de un muestreo significativo, determinar la sensibilidad de la PCR a tiempo real en diferentes escenarios.

Summary

“The difference between what we do and what we are capable of doing would suffice to solve most of the world's problems”

Gandhi

8. Summary

Introduction: Q fever is a zoonosis with world-wide distribution, with the exception of New Zealand. It can become chronic and be fatal in humans. It can also produce important economic losses in domestic ruminant productions, inducing the decrease in several reproductive indicators and producing mastitis in affected farms. This disease is widely distributed in nature and can infect multiple invertebrate and vertebrate species. Q fever is endemic in the Canary Islands and goat is the most important animal reservoir in this archipelago.

Objectives and Methods: **1.** Detection of infected carrier animals that excrete *C. burnetii* in milk by Real Time Trans-PCR analysis of goat milk samples from farms with more than 100 cattle-heads in Lanzarote Island and detect if exist a *C. burnetii* milk excretion seasonal pattern, fixing the obtained data to a known model of probability distribution. **2.** Realization of an epidemiological survey for detecting possible goat milk *Coxiella* excretion risk factors in Lanzarote Island. **3.** Design of a mathematical method for calculating the sensibility of the Real Time Trans-PCR using the positive samples threshold-cycle data by fixing this data base to a known probability models curves for detecting the false negative probability.

Results: **1.** Goat milk *C. burnetii* excretion is seasonal in Lanzarote Island. The milk *C. burnetii* excretion rates varied between 41.51% (maximum) and 3.76% (minimum). The obtained data fit the Poisson Model (risk ratio = 8.786; C.I. 95.0% = 4.4; 14.5; overdispersion coefficient = 1.33). **2.** The only risk factor associated directly with milk *C. burnetii* excretion was sampling season ($p < 0.009$). On the other hand, there were important differences of *C. burnetii* excretion rates between the two established risk zones (the *C. burnetii* excretion rate in the north zone triples the south zone rate), but in this occasion do not exist significant statistic association (Fisher exact test; $p < 0.121$). After the statistic analysis of the risk factors that could originate the mentioned difference of *C. burnetii* excretion rates between zones, they were the volume of the covered areas of goat stables ($p < 0.003$) and the cleaning active principles rotation ($p < 0.049$). **3.** The positive samples threshold-cycle data showed a good fit to a logistic curve. The Real Time Trans-PCR estimated sensitivity was 91.93%.

Conclusions: **1.** It has been demonstrated statistically that the milk *C. burnetii* excretion in farms with more than 100 cattle-heads follows a seasonal pattern. **2.** The sizing of the farms (volume of the covered areas of goat stables) and the farms cleaning and disinfection are the only risk factors with statistic significance. **3.** The Real Time Trans-PCR has shown in this study a good sensibility for individual milk samples obtained from goats in Lanzarote. The proposed mathematical method for calculating the sensitivity by fitting to a known probabilistic curve allows, with a previous significant random sampling, to calculate the sensitivity of the Real Time Trans-PCR in different scenarios.

Bibliografía

9. BIBLIOGRAFÍA

1. (van) Aarle, D., Aguer, D., Baars, J., Callén, A., Evans, J., Hutten, B., Janszen, B., John, E., Nell, T., Perez, V., Valks, M., (1996). Compendium de reproducción animal. (2ª ed.). Barcelona. Ed. *Laboratorios Intervet, S.A.*
2. Abe T., Yamaki K., Hayakawa T., Fukuda H., Ito Y., Kume H., Komiya T., Ishihara K., Hirai K., (2001). A seroepidemiological study of the risks of Q fever infection in Japanese veterinarians. *Eur J Epidemiol.* **17(11):1029-1032.**
3. Adesiyun, A.A., Jagun, A.G., Kwaga, J.K., Tekdek, L.B., (1985). Sheddning of *Coxiella burnetii* in milk by Nigerian dairy and dual purpouses cows. *Int J Zoonoses.* **12:1-5.**
4. Afseth, G., Mo, Y.Y., Mallavia, L.P., (1995). Characterization of the 23S and 5S rRNA genes of *Coxiella burnetii* and identification of an intervening sequence within the 23S rRNA gene. *J. Bacteriol.* **177:2946-2949.**
5. 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.* **21:52-55.**
6. Aguinaga, M., Gutiérrez, C., Lazo, G., (2003). Relación entre variables climáticas y casos de Infección Respiratoria Aguda en la Provincia del Callao – 2001. *Rev Peruana Epidemiol.* **11(1):1-18.**
7. Aguirre Errasti, C., Montejo Baranda, M., Hernandez Almaraz, J.L., de la Hoz Torres, C., Martinez Gutierrez, E., Villate Navarro, J.C., Sobradillo Pena V., (1984). An outbreak of Q fever in the Basque country. *Can Med Assoc J.* **131:48-49.**
8. Aitken, I.D., (1989). Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. *Eur. J. Epidemiol.* **5:420-424.**
9. Aitken, I.D., Bögel, K., Cracea, E., Edlinger, E., Houwers, D., Krauss, H., Rady, M., Rehacek, J., Schiefer, H.G., Schmeer, N., Tarasevich, I.V., Tringali, G., (1987). Q fever in Europe: current aspects of aetiology, epidemiology, human infection, diagnosis and therapy. *Infection.* **15:323-327.**
10. Akesson, A., Krauss, H., Thiele, H.D., Macellaro, A., Schwan, O., Norlander, L., (1991). Isolation of *Coxiella burnetii* in Sweden. *Scand J Infect Dis.* **23(2):273-274.**
11. Akporiaye, E.T., Baca, O.G., (1983). Superoxide production and superoxide dismutase and catalase activities in *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* **154:520-523.**
12. Akporiaye, E.T., Rowatt, J.D., Aragon, A.A., Baca, O.G., (1983). Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* **40:1155-1162.**
13. Alayo Arrugaeta, A. (1986). Estudio epidemiológico de la fiebre Q en Vizcaya. *Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.*
14. Alonso-Pérez, S., Cuevas, E., Querol, X., Viana, M., Guerra, M.J., (2007). Impact of the Saharan dust outbreaks on the ambient levels of total suspended particles (TSP) in the marine boundary layer (MBL) of the Subtropical Eastern *Atmospheric Environment.* **41(40):9468-9480.**
15. Alsaleh A., Pellerin J.L., Rodolakis A., Larrat M., Cochonneau D., Bruyas J.F., Fieni F., (2011). Detection of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in oviducts and uterine flushing media and in genital tract tissues of the non pregnant goat. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **34(4):355-360.**
16. Álvarez-Ortí, M., Escribano, J., Garde, J., García, A., Ortiz, N., Gallego, L., Fernández, J., (1999). Evaluación de la variabilidad genética en poblaciones cinegéticas de ciervo ibérico, *Cervus elaphus hispanicus*, mediante métodos moleculares. *Galemys.* **11(1):27-39.**
17. Amano, K.I., Williams, J.C., (1984a). Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* **160:994-1002.**

18. **Amano, K., Williams J.C.,** (1984b). Sensitivity of *Coxiella burnetii* peptidoglycan to lysozyme hydrolysis and correlation of sacculus rigidity with peptidoglycan-associated proteins, *J Bacteriol.* **160**:989–993.
19. **Amano, K.I., Williams, J.C., McCaul, T.F., Peacock, M.G.,** (1984). Biochemical and immunological properties of *Coxiella burnetii* cell wall and peptidoglycan-protein complex fractions. *J Bacteriol.* **160**:982–988.
20. **Amano, K., Williams, J.C., Misler, S.R., Reinhold, V.N.,** (1987). Structure and biological relationship of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharides. *J Biol Chem.* **262**:4740-4747.
21. **Amitai, Z., Bromberg, M., Bernstein, M., Raveh, D., Keysary, A., David, D., Pitlik, S., Swerdlow, D., Massung, R., Rzotkiewicz, S., Halutz, O., Shohat, T.,** (2010). A large Q fever outbreak in an urban school in central Israel. *Clin Infect Dis.* **50(11)**:1433-1438.
22. **Andersson, S.G., Kurland, C.G.,** (1998). Reductive evolution of resident genomes. *Trends Microbiol.* **6**:263-268.
23. **Anderson, A.D., Kruszon-Moran, D., Loftis, A.D., McQuillan G., Nicholson, W.L., Priestley, R.A., Candee, A.J., Patterson, N.E., Massung, R.F.,** (2009). Seroprevalence of Q fever in the United States, 2003-2004. *Am J Trop Med Hyg.* **81(4)**:691-694.
24. **Andoh, M., Zhang, G., Russell-Lodrigue, K.E., Shive, H.R., Weeks, B.R., Samuel, J.E.,** (2009). 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(7)**:3245-3255.
25. **Andrews, P.S., Marmion, B.P.,** (1959). Chronic Q fever. *Br Med J.* **2**:983–985.
26. **Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A.,** (2005). Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res.* **36**:327–349.
27. **Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A.,** (2001). Étude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique. *Renc Rech Ruminants.* **8**:153–156.
28. **Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A.,** (2003). Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet Res.* **34**:423–433.
29. **Ascher, M.S., Williams, J.C., Berman, M.A.,** (1983). Dermal granulomatous hypersensitivity in Q fever: comparative studies of the granulomatous potential of whole cell of *Coxiella burnetii* phase I and subfractions. *Infect Immun.* **42**:887–889.
30. **Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L.,** (2010). Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *Vet J.* **184(2)**:172-175.
31. **Atzopien, E., Baumgärtner, W., Artelt, A., Thiele, D.,** (1994). Valvular endocarditis occurs as a part of a disseminated *Coxiella burnetii* infection in immunocompromised BALB/cJ (H-2d) mice infected with the Nine Mile isolate of *C. burnetii*. *J Infect Dis.* **170**:223–226.
32. **Babudieri, B.,** (1953). Advances in the control of zoonoses, *World Health Organization: Monograph Series.* **19**:193.
33. **Babudieri, B.,** (1959). Q fever: a zoonosis. *Adv Vet Sci.* **5**:81-154.
34. **Baca, O.G., Paretsky, D.,** (1983). Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol Rev.* **47**:127-149.
35. **Baca, O.G., Akporiaye, E.T., Aragon, A.S., Martinez, I.L, Robles, M.V., Warner, N.L.,** (1981). Fate of phase I and phase II *Coxiella burnetii* in several macrophage-like tumor cell lines. *Infect Immun.* **33**:258–266.
36. **Baca, O. G., Scott, T.O., Akporiaye, E.T., DeBlasie, R., Crissman, H.A.,** (1985). Cell cycle distribution patterns and generation times of L929 fibroblast

- cells persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* **47**:366–369.
37. **Bandyopadhyay P., Xiao, H., Coleman, H.A., Price-Whelan, A., Steinman, H.M.,** (2004). Icm/dot-independent entry of *Legionella pneumophila* into amoeba and macrophage hosts. *Infect Immun.* **72(8)**:4541-4551.
 38. **Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Esteban, C., Gil, H., Escudero, R., Barral, M., Jado, I., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L.,** (2007). Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol.* **73(19)**:6166-6171.
 39. **Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S.G., Dubovi, E., Schukken, Y.,** (2007). Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet Res.* **39**:23-32.
 40. **Barrett, A.J.,** (1984). Proteolytic and other metabolic pathways in lysosomes. *Biochem Soc Trans.* **12**:899-902.
 41. **Baumgärtner, W., Bachmann, S.,** (1992). Histological and immunocytochemical characterization of *Coxiella burnetii*-associated lesions in the murine uterus and placenta. *Infect Immun.* **60**:5232-5241.
 42. **Baumgärtner, W., Dettinger, H., Schemeer, N., Hoffmeister E.,** (1988). Evaluation of different fixatives treatments for demonstration of *Coxiella burnetii* in parafin-embedded tissues. *J Clin Microbiol.* **26**:2044-2047.
 43. **Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A.,** (2006). Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol.* **188(7)**:2309-2324.
 44. **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(1)**:64-70.
 45. **Belfort, M., Roberts, R.J.,** (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Res.* **25**:3379-3388.
 46. **Benoit, M., Ghigo, E., Capo, C., Raoult, D., Mege, J.L.,** (2008). The uptake of apoptotic cells drives *Coxiella burnetii* replication and macrophage polarization: a model for Q fever endocarditis. *PLoS Pathog.* **4(5)**:e1000066.
 47. **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.
 48. **Bernasconi, M.V., Casati, S., Péter, O., Piffaretti, J.C.,** (2002). *Rhipicephalus* ticks infected with Rickettsia and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). *Infect Genet Evol.* **2(2)**:111-120.
 49. **Berón, W., Gutierrez, M.G., Rabinovitch, M., Colombo, M.I.,** (2002). *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect Immun.* **70(10)**:5816-21.
 50. **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.
 51. **Berri M., Souriau A., Lechopier P., Rodolakis, A.,** (2001). Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec.* **148**:502-505.
 52. **Berri M., Crochet D., Santiago S., Rodolakis, A.,** (2005). Spread of *Coxiella burnetii* infection in sheep flock and their lamb after a Q fever episode. *Vet Rec.* **157(23)**:737-740.
 53. **Berri, M., Rousset, E., Champion, J.L., Russo, P., Rodolakis, A.,** (2007). Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Res Vet Sci.* **83**:47–52.
 54. **Berstein, M., Edmondson, H.A., Barbour, B.H.,** (1965). The liver lesion in Q fever. *Arch Intern Med.* **116**:491–494.
 55. **Biberstein, E.L., Behymer, D.E., Bushnell, R., Crenshaw, G., Riemann, H.P., Franti, C.E.,** (1974). A survey of Q fever (*Coxiella burnetii*) in California dairy cows. *Am J Vet Res.* **35**:1577-1582.

56. **Blaha, T., Esaín Escobar, J.,** (1995). Epidemiología Especial Veterinaria (título original: Angewandte Epizootologie und Tierseuchenbekämpfung). (1ª ed.). Editorial Acribia S.A.
57. **Blondeau, J.M., Williams, J.C., Marrie, T.J.,** (1990). The immune response to phase I and II *Coxiella burnetii* antigens as measured by western immunoblotting. *Ann NY Acad Sci.* **590**:187–202.
58. **Bolaños, M., Santana, O.E., Pérez-Arellano, J.L., Moreno, A., Moreno, G., Burgazzoli, J.L., Martín-Sánchez, A.M.,** (2003). Fiebre Q en Gran Canaria. Aportación de 40 nuevos casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **21**:20-23.
59. **Bolaños M., Santana, O.E., Angel-Moreno, A., Pérez-Arellano, J.L., Limiñana, J.M., Serra-Majem, L., Martín-Sánchez, A.M.,** (2004). Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). *Europ J Epidemio.* **18**(3):259-262.
60. **Bosnjak, E., Hvass, A.M., Villumsen, S., Nielsen, H.,** (2009). Emerging evidence for Q fever in humans in Denmark: role of contact with dairy cattle. *Clin Microbiol Infect.* **16**(8):1285-1288.
61. **Boulos, A., Rolain, J.M., Maurin, M., Raoult, D.,** (2005). Measurement of the antibiotic susceptibility of *Coxiella burnetii* using real time PCR. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* **43**(9):497-501.
62. **Brennan, R.E., Russell, K., Zhang, G., Samuel, J.E.,** (2004). Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections. *Infect Immun.* **72**(11):6666-6675.
63. **Bresno, M.R., Darmanin, N., Hernández, Z., Capote, J.,** (1993). Quesos de Canarias, (1993), 2ª edición. Editado por la Consejería de Agricultura y Alimentación del Gobierno de Canarias, Secretaría General Técnica.
64. **Brezina, R.,** (1958). Contribution to the study of phase variation in *Coxiella burnetii*. *Acta Virol.* **2**:91-102.
65. **Brezina, R., Kováčová, E.,** (1966). Study of the antigenic structure of *Coxiella burnetii*. V. Detection of phase I of *Coxiella burnetii* by indirect fluorescent antibody technique. *Acta Virol.* **10**(5):462-466.
66. **Brouqui, P., Tissot-Dupont, H., Drancourt, M., Berlan, Y., Etienne, J., Leport, C., Goldstein, F., Massip, P., Micoud, M., Bertrand, A., Raoult, D.,** (1993). Epidemiologic and clinical features of chronic Q fever: 92 cases from France (1982–1990). *Arch Intern Med.* **153**:642–648.
67. **Brooks, D.L., Ermel, R.W., Franti, C.E., Ruppanner, R., Behymer, D.E., Williams, J.C., Stephenson, J.C.,** (1986). Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. *Am J Vet Res.* **47**:1235–1238.
68. **Brouqui, P., Dumler, J.S., Raoult, D.,** (1994). Immunohistologic demonstration of *Coxiella burnetii* in the valves of patients with Q fever endocarditis. *Am J Med.* **97**:451–458.
69. **Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J.,** (1996) A dog-related outbreak of Q fever. *Clin Infect Dis.* **23**(4):753-755.
70. **Burnet, F.M., Freeman, M.,** (1937). Experimental studies on the virus of Q fever. *Med J Aust.* **2**:299–302.
71. **Burgueño, M.J., García-Bastos, J.L., González-Buitrago, J.M.,** (1995). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med Clin.* **104**:661-670
72. **Burton, P.R., Stueckemann, J., Paretsky, D.,** (1975). Electron microscopy studies of the limiting layers of rickettsia *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* **122**:316-324.
73. **Buxadé, C., (Coord.),** (1996). Zootecnia. Bases de Producción Animal. Tomo IX.: Producción Caprina. Madrid. Ed. Mundiprensa.
74. **Cabassi, C.S., Taddei, S., Donofrio, G., Ghidini, F., Piancastelli, C., Flammini, C.F., Cavirani, S.,** (2006). Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *New Microbiol.* **29**(3):211-214.

75. **Canon, R.M., Roe, R.T.,** (1982). Livestock Disease Surveys: A field Manual for Veterinarians. *Camberra: Bureau of Animal Health.*
76. **Canonico, P.G., Van Zwieten, M.J., Christmas, W.A.,** (1972). Purification of large quantities of *Coxiella burnetii* by density gradient centrifugation. *Appl Microbiol.* **23**:1015–1022.
77. **Capo, C., Zugun F., Stein A., Tardei, G., Lepidi, H., Raoult, D., Mege, J. L.,** (1996a). Upregulation of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1b in Q fever endocarditis. *Infect Immun.* **64**:1638–1642.
78. **Capo, C., Zaffran, Y., Zugun, F., Houpikian, P., Raoult, D., Mege, J.L.,** (1996b). Production of interleukin-10 and transforming growth factor b by peripheral blood mononuclear cells in Q fever endocarditis. *Infect Immun.* **64**:4143–4147.
79. **Capo, C., Lindberg, F.P., Meconi, S., Zaffran, Y., Tardei, G., Brown, E.J., Raoult, D., Mege, J.L.,** (1999). Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between alphavbeta3 integrin and CR3. *J Immunol.* **163(11)**:6078–6085.
80. **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(22)**:669-671.
81. **Caron, F., Meurice, J.C., Ingrand, P., Bourgoin, A., Masson, P., Roblot, P., Patte, F.,** (1998). Acute Q fever pneumonia: a review of 80 hospitalized patients. *Chest.* **114(3)**:808-813.
82. **Carter, J.L., Chen, C.L., Dennis, S.M.,** (1976). Serum levels of progesterone, estradiol, and hydrocortisone in ewes after abortion due to *Listeria monocytogenes* type 5. *Am J Vet Res.* **37(9)**:1071-1073.
83. **Carrieri, M.P., Tissot-Dupont, H., Rey, D., Brousse, P., Renard, H., Obadia, Y., Raoult, D.,** (2002). Investigation of a slaughterhouse-related outbreak of Q fever in the French Alps. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **21(1)**:17-21.
84. **(del) Castillo, A., Pérez Cabrera, M.A., de Armas, F.,** (1995). Primeros datos sobre la prevalencia de la fiebre Q en Tenerife. III Simposium Ibérico sobre Ixodoidea y enfermedades transmitidas. *Libro de Comunicaciones. Alcalá de Henares.* pp. 75.
85. **Caturegli, P., Asanovich, K.M., Walls, J.J., Bakken, J.S, Madigan, J.E., Popov, V.L., Dumler, J.S.,** (2000). ankA: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmic protein antigen with ankyrin repeats. *Infect Immun.* **68**:5277-5283.
86. **Çekani, M., Papa, A., Kota, M., Velo, E., Berxholi, K.,** (2008). Report of a serological study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Albania. *Vet J.* **175(2)**:276-278.
87. **Censo Oficial Ganadero de Canarias por Especies.** Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Gobierno de Canarias. <http://www.gobcan.es/agricultura/otros/estadistica/index.htm>
88. **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 Public Health.* **57(7-8)**:95-101.
89. **Chanton-Greutmann, H., Thomas, 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. *Schweiz Arch Tierheilkd.* **144(9)**:483-492.
90. **Chen, G., Zhuchenko, O., Kuspa A.,** (2007). Immune-like phagocyte activity in the social amoeba. *Science.* **317(5838)**:678-681.
91. **Chen, S.Y., Vodkin M., Thompson, H. A., Williams, J.C.,** (1990). Isolated *Coxiella burnetii* synthesizes DNA during acid activation in the absence of host cells. *J Gen Microbiol.* **136**:89–96.

92. **Cimino, G.D., Metchette, K.C., Tessman, J.W., Hearst, J.E., Isaacs, S.T.,** (1991). Post-PCR sterilization: a method to control carryover contamination for the PCR. *Nucleic Acids Res.* **19**:99-107.
93. **Cirillo, S.L., Lum J., Cirillo J.D.,** (2000). Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology.* **146**:1345-1359.
94. **Cilla, G., Montes, M., Perez-Trallero E.,** (2008). Q fever in the Netherlands - what matters is seriousness of disease rather than quantity. *Euro Surveill.* **13**(37):1.
95. **Clifton, D.R., Goss, R.A., Sahni, S.K. van Antwerp, D., Baggs, R.B., Marder, V.J., Silverman, D.J., Ann Sporn, L.A.,** (1998). NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**(8):4646-4651.
96. **Constans, J., Mathieu, F., Bergeaud, S., Ducloux, G., Fleury, B., De Mascarel, A., Conri, C.,** (1987). Q fever: diagnosis contribution of bone marrow biopsy. A propos of a case. *Rev Med Interne.* **8**:511-512.
97. **Cooper, A., Layton, R., Owens, L., Ketheesan, N., Govan, B.,** (2007). Evidence for the classification of a crayfish pathogen as a member of the genus *Coxiella*. *Lett Appl Microbiol.* **45**(5): 558-563.
98. **Costa, J.,** (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **22**(5):299-305
99. **Cottalorda, J., Jouve J.L., Bollini, G., Touzet P., Poujol, A., Kelberine F., Raoult, D.,** (1995). Osteoarticular infection due to *Coxiella burnetii* in children. *J Pediatr Orthop.* **4**:219-221.
100. **Cox, H.R.,** (1938). A filter-passing infectious agent isolated from ticks. III. Description of organism and cultivation experiments. *Public Health Rep.* **53**:2270-2276.
101. **Cox, H.R.,** (1940). *Rickettsia diaporica* and American Q fever. *Am J Trop Med Hyg.* **20**:463-465.
102. **Cox, H.R. y Bell, E.J.,** (1939). The cultivation of *Rickettsia diaporica* intissue culture and in the tissues of developing chicken embryos. *Public Health Rep.* **54**:2171-2175.
103. **Cowley, R., Fernandez, F., Freemantle, W., Rutter, D.,** (1992). Enzymeimmunoassay for Q fever: comparison with complement fixation and immunofluorescence tests and dot immunoblotting. *J Clin Microbiol.* **30**:2451-2455.
104. **Cutler, S.J., Paiba, G.A., Howells, J., Morgan, K.L.,** (2002). Q fever—a forgotten disease? *Lancet Infect Dis.* **2**:717-718.
105. **Daïter, A.B., Gromova, M.I.,** (1970). Effect of the organisms of *Hyalomma asiaticum* Sch. et Schl. and *Ornithodoros papillipes* Bir. ticks on the biologic activity of *Rickettsia burnetii*. *Tr Leningr Nauchnoissled Inst Epidemiol Mikrobiol.* **37**:72-83.
106. **Damoser, J., Hofer, E., Müller M.,** (1993). Abortions in a lower Austrian sheep facility caused by *Coxiella burnetii*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* **106**(11):361-364.
107. **Davis, G.E.,** (1939). *Rickettsia diaporica*: recovery of three strains from *Dermacentorandersoni* collected in southeastern Wyoming: their identity with Montana strain 1. *Public Health Rep.* **54**:2219-2225.
108. **Davis, G.E. y Cox, H.R.,** (1938). A filter-passing infectious agent isolatedfrom ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals and filtration experiments. *Public Health Rep.* **53**:2259-2261.
109. **Davies, T.R., Edwards, Y., Morgan, A., Caul, E.O.,** (1997). Prevalence of Q fever in a rural practice. *J. Public Health Med.* **19**:324-327.
110. **Delaney, J.C., Roberts, H.L.,** (1975). Q fever endocarditis and chronic liver involvement. *Practitioner.* **214**:243-245.

111. Dellacasagrande, J., Capo, J.C., Raoult, D., Mege, J.L., (1999). IFN-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF1. *J Immunol.* **162**:2259–2265.
112. 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(10)**:5673–5678.
113. Delsing, C.E., Kullberg, B.J., (2008). Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. *Netherlands J Med.* **66(9)**:365-367.
114. Delsol, G., Pellegrin, M., Familiades, J., Auvergnat, J.C., (1978). Bone marrow lesions in Q fever. *Blood.* **52**:637–638.
115. Denison, A.M., Massung, R.F., Thompson, H.A., (2007a). Analysis of the O-antigen biosynthesis regions of phase II isolates of *Coxiella burnetii*. *Clin Infect Dis.* **44(2)**:232-237.
116. Denison, A.M., Thompson, H.A., Massung, R.F., (2007b). IS1111 sequences of *C. burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *C. burnetii* isolates. *BMC Microbiology.* **7**:91-99.
117. Derrick, E.H., (1937). "Q" fever, new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med J Aust.* **2**:281–299.
118. Derrick, E.H., (1973). The course of infection with *Coxiella burnetii*. *Med J Aust.* **1**:1051–1057.
119. Derrick, E.H., Pope, J.H., Smith, D.J.W., (1959). Outbreaks of Q fever in Queensland associated with sheep. *Med J Aust* **1**:585-591.
120. Directiva 91/68/CEE del Consejo, de 28 de enero de 1991, relativa a las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios de animales de las especies ovina y caprina.
121. Dobija-Domaradzki, M., Hausser, J.L., Gosselin, F., (1984). Coexistence of Legionnaire's disease and Q fever in a single patient. *Can Med Assoc J.* **130**:1022–1023.
122. Doller, G., Gerth, H.J., (1984). Early diagnosis of Q fever: detection of immunoglobulin M by radioimmunoassay and enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **3**:550–553.
123. Drancourt, M., Raoult, D., (1994). Taxonomic position of the Rickettsiae: current Knowledge. *FEMS Microbiol Rev.* **13**:13-24.
124. Dupont, H.L., Hornick, R.B., Levin, H.S., Rapoport, M.I., Woodward, T.E., (1971). Q fever hepatitis. *Ann Intern Med.* **74(2)**:198-206.
125. Dupuis, G., Petite, J., Peter, O., Vouilloz, M., (1987). An important outbreak of human Q fever in a Swiss alpine valley. *Int J Epidemiol.* **16**:282–287.
126. DuPont, H.L., Hornick, R.B., Levin, H.S., Rapoport, M.I., Woodward, T.E., (1971). Q fever hepatitis. *Ann Intern Med.* **74**:198–206.
127. Dyer, D.E., Gibbons, V.L., Brady, L.M., Cunningham, A.L., (1988). Serological reaction to *Legionella pneumophila* group 4 in a patient with Q fever. *J Infect Dis.* **158**:499–500.
128. Ejercito, C.L.A., Cai, L., Htwe, K.K., Taki, M., Inoshima, Y., Kondo, T., Kano, C., Abe, S., Shiota, K., Sugimoto, T., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Minamoto, N., Kinjo, T., Isogai, E., Hirai, K., (1993). Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in wild animals in Japan. *J Wildl Dis.* **29(3)**:481-484.
129. Eklund, C.M., Parker, R.R., Lackman, D.B., (1947). Case of Q fever probably contracted by exposure to ticks in nature. *Public Health Rep* **62**:1413-1416.
130. Ellis, M.E., Smith, C.C., Moffat, M.A., (1983). Chronic and fatal Q-feverinfection: a review of 16 patients seen in North-East Scotland (1967–1980). *Q J Med.* **52**:54–66.
131. Encuesta Nacional de los Ganados Ovino-Caprino de España. Años 2007, 2008, 2009. Ministerio de Medioambiente Rural y Marino. http://www.mapa.es/estadistica/pags/encuestaganadera/2009-11_Ovino-

- Caprino_Resultados.pdf
132. **Enfermedades de la Lista de la OIE (Oficina Internacional de Epizootías).** http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification2010.htm#ListeOIE.
 133. **Engeland, I.V., Waldeland, H., Ropstad, E., Kindahl, H., Andresen, O.,** (1997a). Effect of experimental infection with *Listeria monocytogenes* on the development of pregnancy and on concentrations of progesterone, oestrone sulphate and 15-ketodihydro-PGF₂ alpha in the goat. *Anim Reprod Sci.* **45(4):311-327.**
 134. **Engeland, I.V., Waldeland, H., Andresen, O., Tverdal, A.,** (1997b). Foetal loss in dairy goats: an epidemiological study in 515 individual goats. *Anim Reprod Sci.* **49(1):45-53.**
 135. **Enright, J.B., Sadler, W.W., Thomas, R.C.,** (1957). Pasteurization of milk containing the organism of Q fever. *Am J Public Health Nations Health.* **47(6):695-700.**
 136. **Ergas, D., Keysari, A., Edelstein, V., Sthoeger, Z.M.,** (2006). Acute Q fever in Israel: clinical and laboratory study of 100 hospitalized patients. *Isr Med Assoc J.* **8(5):337-341.**
 137. **Escudero Nieto, R., Cortés García, M., de los Ríos Martín, R., Martín Martínez, F., Tébar Betegón, M.A., Sanz Moreno, J.C.,** (2006). Brote de fiebre Q en un área urbana asociado a la visita a una granja-escuela. *Med Clínica.* **126:573-575.**
 138. **Estadísticas del sector primario del Instituto Canario de Estadística año 2010 (ISTAC):** 1. *Producción de leche por especies ganaderas.* http://www2.gobiernodecanarias.org/istac/estadisticas/php/saltarA.php?mid=/istac/estadisticas/sector_primario/area_09_frame.html
2. *Sacrificio de ganados según especies.* http://www2.gobiernodecanarias.org/istac/estadisticas/php/saltarA.php?mid=/istac/estadisticas/sector_primario/area_09_frame.html
 139. **Fan, M.Y., Walker, D.H., Yu, S.R., Liu, Q.,** (1987). Epidemiology and ecology of rickettsial diseases in the People's Republic of China. *Rev Infect Dis.* **9:823-840.**
 140. **Farris, M., Grant, A., Richardson, T.B., O'Connor, C.D.,** (1998). *Mol Microbiol.* **28:265-279.**
 141. **Fehlner-Gardiner, C., Roshick, C., Carlson, J.H., Hughes, S., Belland, R.J., Caldwell, H.D., McClarty, G.,** (2002). Molecular basis defining human *Chlamydia trachomatis* tissue tropism. A possible role for tryptophan synthase. *J Biol Chem.* **277:26893-26903.**
 142. **Fenollar, F., Fournier, P.E., Carrieri, M.P., Habib, G., Messina, T., Raoult, D.,** (2001). Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. *Clin Infect Dis.* **33:312-316.**
 143. **Fergusson, R.J., Shaw, T.R.D., Kitchin, A.H., Matthews, M.B., Inglis, J.M., Peutherer, J.F.,** (1985). Subclinical chronic Q fever. *Q J Med.* **57:669-676.**
 144. **Fernandez Guerrero, M.L., Muelas Aguado, J.M., Renedo, G., Fraile, J., Soriano, F., De Villalobos, E.,** (1988). Q fever endocarditis on porcine bioprosthetic valves. Clinicopathologic features and microbiologic findings in three patients treated with doxycycline, cotrimoxazole, and valve replacement. *Ann Intern Med.* **108:209-213.**
 145. **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. *J Infect Dis.* **148(3):477-487.**
 146. **Finidori, J.P., Raoult, D., Bornstein, N., Fleurette, J.,** (1992). Study of cross reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila* using indirect immunofluorescence assay and immunoblotting. *Acta Virol.* **36:459-465.**

147. **Fishbein, D.B., Raoult, D.,** (1992). A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg.* **47**:35–40.
148. **Fournier, P.E., Raoult D.,** (2003). Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol.* **41(11)**:5094-5098.
149. **Fournier, P.E., Casalta, J.P., Habib, G., Messana, T., Raoult, D.,** (1996). Modification of the diagnostic criteria proposed by the Duke endocarditis service to permit improved diagnosis of Q fever endocarditis. *Am J Med.* **100**:629–633.
150. **Fournier, P.E., Marrie, T.J., Raoult, D.,** (1998a). Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.* **36**:1823–1834.
151. **Fournier, P.E., Casalta, J.P., Piquet, P., Tournigand, P., Branchereau, A., Raoult, D.,** (1998b). *Coxiella burnetii* infection of aneurysms or vascular grafts: report of seven cases and review. *Clin Infect Dis.* **26**:116–121.
152. **Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E.,** (1994). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.* **26(1)**:112-125.
153. **Gajdosová, E., Kováčová, E., Toman, R., Skultéty, L., Lukáčová, M., Kazár, J.,** (1994). Immunogenicity of *Coxiella burnetii* whole cells and their outer membrane components. *Acta Virol.* **38(6)**:339-344.
154. **García Curiel, A., Nájera Morrondo, E.,** (1984). Estudio epidemiológico de la Rickettsiosis en la provincia de Sevilla, basado en las reacciones serológicas de inmunofluorescencia indirecta. *Rev San Hig Pub.* **58**:83-98.
155. **García, R., Gallego, D., Hernández, E.,** (2001). Influence of North Atlantic Oscillation in Canary Islands Precipitation. *Journal of Climate.* **14(19)**:3889-3903.
156. **García-Valdecasas, S., Ruiz-Alvarez, M.J., Garcia De Tena, J., De Pablo, R., Huerta, I., Barrionuevo, M., Coca, C., Arribas I.,** (2011). Diagnostic and prognostic value of heart-type fatty acid-binding protein in the early hours of acute myocardial infarction. *Acta Cardiol.* **66(3)**:315-321.
157. **Garner, M.G., Longbottom, H.M., Cannon, R.M., Plant, A.J.,** (1997). A review of Q fever in Australia 1991-1994. *Aust N Z J Public Health.* **21(7)**:722-730.
158. **Gelado, M.D., Rodriguez, M.J., Hernández, J.J., Brito de Acevedo, E.M., Llinás, O., Collado, C., Cardona, P., López, P.,** (2005). Dust Deposition Fluxes to Northeastern Subtropical Atlantic (Canary Islands). Proyecto cofinanciado por la U.E. (INTERREG IIB, CLIMAAT MAC/2.3/A3), Ministerio de Ciencia y Tecnología de España (CALIMA REN2002-00722) y el Gobierno de Canarias (nº 2001/086).
159. **Gentrya, A., Clutton-Brockb, J., Grovesc, C.P.,** (2003). The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *Journal of Archaeological Science.* **31**:645–651.
160. **Gerstl, B., Movitt, E.R., Shaken, J.R.,** (1956). Liver function and morphology in "Q" fever. *Gastroenterology.* **30**:813–816.
161. **Gidding, H.F., Wallace, C., Lawrence, G.L., McIntyre, P.B.,** (2009). Australia's national Q fever vaccination program. *Vaccine.* **27(14)**:2037-2041.
162. **Gil, R., Latorre, A., Moya, A.** (2004). Bacterial endosymbionts of insects: insights from comparative genomics. *Environ Microbiol.* **6(11)**:1109-1122.
163. **Gillespie, J.H., Baker, J.A.,** (1952). Experimental Q fever in cats. *Am J Vet Res.* **13**:91-94.
164. **Gimenez, D.F.,** (1965). Gram stain of *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* **90**:834–835.
165. **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. *Emerg Infect Dis.* **11**:1211-1217.
166. **Golenbock, D.T., Hampton, R.Y., Qureshi, N., Takayama, K., Raetz, C.R.,** (1991). Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem.* **266(29)**:19490–19498.
167. **Gonder, J.C., Kishimoto, R.A., Castello, M.D., Pedersen, C.E., Larson, E.W.,** (1979). Cynomolgus monkey model for experimental Q fever infection. *J*

- Infect Dis.* **139**:191–196.
- 168. Grant, C.G., Ascher, M.S., Bernard, K.W., Ruppaner, R., Vellend, H.,** (1985). Q fever and experimental sheep. *Infection Control.* **6**:122-123.
- 169. Gray, J.S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O., Lindgren, E.,** (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* **2009**:593232.
- 170. Greiner, T.C., Mitros, F.A., Sapleton, J., van Rybroek, J.,** (1992). Fineneedle aspiration findings of the liver in a case of Q fever. *Diagn Cytopathol.* **8**:181–184.
- 171. Gross, E.M., Goldwasser, R.A., Bearman, J.E., Sarov, I., Sarov, B., Torok, V., Naggan, L.,** (1983). Rickettsial antibody prevalence in southern Israel: IgG antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia typhi*, and spotted fever group rickettsiae among urban- and rural-dwelling and Bedouin women. *Am J Trop Med Hyg.* **32**(6):1387-1391.
- 172. Guatteo R., Beaudreau F., Joly A., Seegers H.,** (2007). *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet Res.* **38**(6):849-860.
- 173. 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**(34):4320-4328.
- 174. Guía resumida del clima de España (1971-2000),** (2005). Agencia Nacional de Meteorología, Ministerio de Medioambiente, España.
- 175. Guigno, D., Coupland, B., Spith, E.G., Farrell, I.D., Desselberger, U., Caul, E.O.,** (1992). Primary humoral antibody response to *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J Clin Microbiol.* **30**:1958–1967.
- 176. Hacker, J., Bum-Oehler, G., Muhldorfer, I., Tschäpe, H.,** (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol.* **23**:1089-1097.
- 177. Hackstadt, T.** (1986). Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of *Coxiella burnetii* isolates. *Infect Immun.* **52**:337-340.
- 178. Hackstadt, T.** (1988). Steric hindrance of antibody binding to surface proteins of *Coxiella burnetii* by phase I lipopolysaccharide. *Infect Immun.* **56**:802-807.
- 179. Hackstadt, T.** (1998). The diverse habitats of obligate intracellular parasites. *Curr Opin Microbiol.* **1**:82-87.
- 180. Hackstadt, T., Williams, J.C.,** (1981). Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **78**:3240–3244.
- 181. Hackstadt, T., Williams, J.C.,** (1983). pH dependence of the *Coxiella burnetii* glutamate transport system. *J Bacteriol.* **154**:598-603.
- 182. Hackstadt, T., Peacock, M.G., Hithcock, P.J., Cole, R.L.,** (1985). Lipopolysaccharide variation in *Coxiella burnetii*: intrastrain heterogeneity in structure and antigenicity. *Infect Immun.* **48**:359-365.
- 183. Haigh, J.,** (1978). The accumulation of deleterious genes in a population-Muller's Ratchet. *Theor Popul Biol.* **14**:251-267.
- 184. Harman, J.B., Camb, M.D.,** (1949). Q fever in Great Britain; clinical account of eight cases. *Lancet.* **254**:1028–1030.
- 185. Hachette, T., Campbell, N., Whitney, H., Hudson, R., Marrie, T.J.,** (2002). Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in selected populations of domestic ruminants in Newfoundland. *Can Vet J.* **43**(5):363-364.
- 186. Heard, S.R., Ronalds, C.J., Hearth, R.B.,** (1985). *Coxiella burnetii* infection in immunocompromised hosts. *J Infect Dis.* **11**:15–18.
- 187. Heinzen, R.A., Hackstadt, T.,** (1996). A developmental stage-specific histone H1 homolog of *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* **178**:5049–5052.
- 188. Heinzen, R.A., Stiegler, G.L., Whiting, L.L., Schmitt, S.A., Mallavia L.P., Frazier, M.E.,** (1990). Use of pulsed field gel electrophoresis to differentiate *Coxiella burnetii* strains. *Ann NY Acad Sci.* **590**:504-513.

189. **Heinzen, R.A., Frazier, M.E., Mallavia, L.P.,** (1992). *Coxiella burnetii* superoxide dismutase gene: cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **60**:3814–3823.
190. **Heinzen, R.A., Scidmore, M.A., Rockey, D.D., Hackstadt, T.,** (1996). Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun.* **64**:796–809.
191. **Heinzen, R.A., Hackstadt, T., Samuel, J.E.** (1999). Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* **7(4)**:149-154.
192. **Helbig, K., Harris, R., Ayres, J., Dunckley, H., Lloyd, A., Robson, J., Marmion, B.P.,** (2005). Immune response genes in the post-Q-fever fatigue syndrome, Q fever endocarditis and uncomplicated acute primary Q fever. *QJM.* **98(8)**:565-574.
193. **Hellenbrand, W., Breuer, T., Petersen, L.,** (2001). Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis.* **7(5)**:789-796.
194. **Hendrix, L., Mallavia, L. P.,** (1984). Active transport of proline by *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol.* **130**:2857–2863.
195. **Hendrix, L.R., Samuel, J.E., Mallavia, L.P.,** (1991). Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J Gen Microbiol.* **137**:269-276.
196. **Heres, L., Urlings, H.A.P., Wagenaar, J.A., de Jong, M.C.M.,** (2003). Transmission of Salmonella between broiler chickens fed with fermented liquid feed. *Epidemiol Infect.* **132**:107–116.
197. **Higuchi, R., Kwok, S.,** (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature.* **339**:237-8.
198. **Higuchi, R., Fokler, C., Dollinger, G., Watson, R.,** (1993). Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology.* **11**:1026-1030.
199. **Hilbink, F., Penrose, M. y Kováková, E. Kazar, J.,** (1993). Q fever is absent from New Zeland. *Int J Epidemiol.* **22**:945-949.
200. **Ho, T., Htwe, K.K., Yamasaki, N., Zhang G.Q., Ogawa, M., Yamagushi, 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.
201. **Honstetter, A., Imbert, G., Ghigo, E., Gouriet, F., Capo, C., Raoult, D., Mege, J.L.,** (2003). Dysregulation of cytokines in acute Q fever: role of interleukin-10 and tumor necrosis factor in chronic evolution of Q fever. *J Infect Dis.* **187(6)**:956-62.
202. **Honstetter, A., Ghigo, E., Moynault, A., Capo, C., Toman, R., Akira, S., Takeuchi, O., Lepidi, H., Raoult, D., Mege, J.L.,** (2004). Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. *J Immunol.* **172(6)**:3695-3703.
203. **Houwer, T.A., Vodkin, M.H., Williams, J.C.,** (1992). A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol.* **174**:5540-5548.
204. **Howard, J.L.,** (1993). Current Veterinary Therapy 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Co.
205. **Howe, D., Mallavia, L.P.,** (1999). *Coxiella burnetii* infection increases transferrin receptors on J774A.1 cells. *Infect Immun* **67(7)**:3236–3241.
206. **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.
207. **Howe, D., Melnicakova, J., Barak, I., Heinzen, R.A.,** (2003a). Fusogenicity of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole, *Ann NY Acad Sci.* **990**:556–562.
208. **Howe, D., Melnicakova, J., Barak, I., Heinzen, R.A.,** (2003b). Maturation

- of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole requires bacterial protein synthesis but not replication. *Cell Microbiol.* **5**:469–480.
- 209. Htwe, K.K., Yoshida, T., Hayashi, S., Miyake, T., Amano, K., Morita, C., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K.,** (1993). Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in Japan. *J Clin Microbiol.* **31(3)**:722–723.
- 210. Hungerford, T.G.,** (1990), Diseases of livestock, 9th ed. Australia. McGraw Hill Book Co.
- 211. Huebner R.J., Bell, J.A.,** (1951). Q fever studies in southern California: summary of current results and a discussion of possible control measures. *JAMA* **145**:301–305.
- 212. Igual, R., Asencio, R., Román, P.,** (1990). Detección de anticuerpos frente a *C. burnetii* en el área norte de Huelva. *IV Congreso de la SEIMC. Abstract E 6/14. Madrid, mayo 1990.*
- 213. INSTITUTO CANARIO DE ESTADÍSTICA.**
<http://www2.gobiernodecanarias.org/istac/>.
- 214. Izzo, A.A., Marmion, B.P., Worswick, D.A.,** (1988). Markers of cell-mediated immunity after vaccination with an inactivated, whole-cell Q fever vaccine. *J Infect Dis.* **157**:781–789.
- 215. Izzo, A.A., Marmion, B.P.,** (1993). Variations in interferon-gamma responses to *Coxiella burnetii* antigens with lymphocytes from vaccinated or naturally infected subjects. *Clin Exp Immunol.* **94**:507–515.
- 216. Janigan, D.T., Marrie, T.J.,** (1983). An inflammatory pseudotumor of the lung in Q fever pneumonia. *N Engl J Med.* **308**:86–87.
- 217. Janssens S., Beyaert R.,** (2003). Role of Toll-like receptors in pathogen recognition, *Clin Microbiol Rev.* **16**:637–646.
- 218. Jasinskas, A., Jianmin Zhong, J., Barbour, A.G.,** (2007). Highly Prevalent *Coxiella* sp. Bacterium in the Tick Vector *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol.* **73(1)**:334–336.
- 219. Jensenius, M., Maeland, A., Kvale, D., Farstad, I.N., Vene, S., Bruu, A.L.,** (1997). [Q-fever imported into Norway]. *Tidsskr Nor Laegeforen.* **117(27)**:3937–3940.
- 220. Kaplan M.M., Bertagna P.,** (1955). The Geographical distribution of Q fever. *Bull World Health Org.* **13**:829–860.
- 221. Kazar, J., Rehacek, J.,** (1987). Q fever vaccines: present status and application in man. *Zentbl. Bakteriol. Mikrobiol Hyg.* **267**:74–78.
- 222. Kazar, J., Schramek, S., Zajacova, S.,** (1983). Induction of splenomegaly in mice by killed *Coxiella burnetii* cells. *Acta Virol.* **27**:65–70.
- 223. Kazar, J., Lesý, M., Propper, P., Valková, D., Brezina, R.,** (1993). Comparison of virulence for guinea pigs and mice of different *Coxiella burnetii* phase I strains. *Acta Virol.* **37(6)**:437–448.
- 224. Kellogg, D.E., Rybalkin, I., Chen, S., Mukhamedova, N., Vlastic, T., Siebert, P.D., Chenchik, A.,** (1994) TaqStart antibody: “hot start” PCR facilitated by a neutralizing monoclonal antibody directed against Taq DNA polymerase. *Biotechniques.* **16**:1134–1137.
- 225. Kennerman, E., Rousset, E., Gölcü, E., Dufour, P.,** (2010). Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **33(1)**:37–45
- 226. 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. *Aust N Z J Public Health.* **27**:390–398.
- 227. Kishimoto, R.A., Rozmiarek, H., Larson, E.W.,** (1978). Experimental Q fever infection in congenitally athymic nude mice. *Infect Immun.* **22**:69–71.
- 228. Klee, S., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Apple, B.,** (2006). Highly sensitive Real Time-PCR for specific detection and quantification of *C. burnetii*. *BMC Microbiol;* **6**:2–9.

229. Klimchuk, N.D., Kushnir, Z.G., (1989). The biological properties of *Rickettsia burnetii* isolated in the northwestern Ukrainian SSR. *Mikrobiol Zh.* **51(5)**:60-67.
230. Koch, A., Svendsen, C.B., Christensen, J.J., Bundgaard, H., Vindfeld, L., Christiansen, C.B., Kemp, M., Villumsen, S., (2010). Q fever in Greenland. *Emerg Infect Dis.* **16(3)**:511-513.
231. Kocianová, E., Kováčová, E.I., Literák, I., (2001). Comparison of virulence of *Coxiella burnetii* isolates from bovine milk and from ticks. *Folia Parasitol (Praha).* **48(3)**:235-239.
232. Kocianová, E., Lisák, V., Kopcok, M., (1992). *Coxiella burnetii* and *Chlamydia psittaci* infection in dogs. *Vet Med (Praha).* **37(3)**:177-183.
233. Kocianová, E., Kováčová, E., Literák, I., Reháček, J., (1993). Some biological properties of *C. burnetii* strains isolated in Slovak and Czech Republics. *Book of Abstr., Int. Conf. on Zoonoses, Oct, 1993, Piest'any, Publ. Slov. Med. Assoc., pp. 46.*
234. Kosatsky, T., (1984). Household outbreak of Q-fever pneumonia related to a parturient cat. *Lancet.* **2**:1447-1449.
235. Koster, F.T., Williams, J.C., Goodwin, J.S., (1985). Cellular immunity in Q fever: modulation of responsiveness by a suppressor T cell-monocyte circuit. *J Immunol.* **135**:1067-1072.
236. Koster, F.T., Williams, J.C., Goodwin, J.S., (1985). Cellular immunity in Q fever: specific lymphocyte unresponsiveness in Q fever endocarditis. *J Infect Dis.* **152**:1283-1289.
237. Krauss H., (1989). Clinical aspects and prevention of Q fever in animals. *Eur J Epidemiol.* **5(4)**:454-455.
238. Krumbiegel, E.R., Wisniewski, H.J., (1970). Consumption of infected raw milk by human volunteers. *Q fever in Milwaukee. Arch Environ Health.* **21**:63-65.
239. Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanowska S., (1992). Dependence between penetration route and course of infection with *Coxiella burnetii* in mice. *Med Dosw Mikrobiol.* **44(3-4)**:145-52.
240. Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanowska, S., (1997). Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res Vet Sci.* **62(3)**:299-300.
241. Kruszewska, D., Lembowicz, K., Tylewska-Wierzbanowska, S., (1996). Possible sexual transmission of Q fever among humans. *Clin Infect Dis.* **22(6)**:1087-1088.
242. La Scola, B., Raoult, D., (1996). Serological cross reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol.* **34**:2270-2274.
243. La Scola B., Raoult, D., (2001). Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoebacastellanii*. *Clin Microbiol Infect.* **7**:75-79.
244. 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.
245. Lang, G.H., (1990). Coxiellosis (Q fever) in animals. In T. J. Marrie (ed.). *Q fever, vol. I. The disease. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.*
246. Langley, J.M., Marrie, T.J., Covert, A., Waag, D.M., Williams, J.C., (1988). Poker players' pneumonia: an urban outbreak of Q fever following exposure to a parturient cat. *N Engl J Med.* **319**:354-356.
247. Lapointe, J.M., Gulland, F.M., Haines, D.M., Barr, B.C., Duignan, P.J., (1999). Placentitis due to *Coxiella burnetii* in a Pacific harbor seal (*Phoca vitulina richardsi*). *J Vet Diagn Invest.* **11(6)**:541-543.
248. Latorre, M., García, J., Rodríguez, J., (1995). Infección por *Coxiella burnetii*. Estudio clínico-epidemiológico de la infección aguda en Orense (1992-1995). VI Reunión Nacional de la SEIMC. *Libro de Comunicaciones. Sitges, pp. 39.*
249. Laughlin, T., Wang, D., Williams, J., Marrie, T.J., (1991). Q fever: from deer to dog to man. *Lancet.* **337**:676-677.

250. Lee, J.H., Park, H.S., Jang, W.J., Koh, S.E., Park, T.K., Kang, S.S., Kim, B.J., Kook, Y.H., Park, K.H., Lee, S.H. (2004). Identification of the *Coxiella* sp. detected from *Haemaphysalis longicornis* ticks in Korea. *Microbiol Immunol.* **48(2)**: 125-30.
251. Lennette, E.H., Welsh, H.H., (1951). Q fever in California. X. Recovery of *Coxiella burnetii* from the air of premises harboring infected goats. *Am J Hyg.* **54(1)**:44-9.
252. 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. *J Infect Dis.* **189(2)**:339-45.
253. Lesso, J., Brezina, R., (1964). Demonstration of *Coxiella burnetii* in mice and guinea pigs by the fluorescent antibody technic. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* **13**:351-7.
254. Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos de Carácter Personal.
255. Liao, D., (2000). Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J Mol Evol.* **51**:305-317.
256. Lillie, R.D., Perrin, T.L., (1941). Histopathology of pneumonitis due to "Q" fever virus. *Public Health Rep.* **56**:149-152.
257. Lillie, R.D., (1942). Pathologic histology in guinea pigs following intraperitoneal inoculation with the virus of "Q" fever. *Public Health Rep.* **57**:296-304.
258. Lindgren, E., Tälleklint, L., Polfeldt, T., (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect.* **108(2)**:119-23.
259. Lipton, J.H., Fong, T.C., Gill, M.J., Burgess, K., Elliott, P.D., (1987). Q fever inflammatory pseudotumor of the lung. *Chest.* **92**:756-757.
260. Lista Oficial de la Onu de Países Ordenados por Densidad Poblacional. http://es.wikipedia.org/wiki/Anexo:Pa%C3%ADses_por_densidad_de_poblaci%C3%B3n
261. Literák, I., Calvo Rodríguez, B., (1994). Latent Q fever in cattle in southern Moravia (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health.* **2(2)**:91-94.
262. Literák, I., Kroupa L., (1998). Herd-level *Coxiella burnetii* seroprevalence was not associated with herd-level breeding performance in Czech dairy herds. *Prev Vet Med.* **33(1-4)**:261-5.
263. Lithg-Pereira, P.L., Rojo-Vázquez, F.A., Mainar-Jaime, R.C., (2004). Case-control study of risk factors for high within-flock small-ruminant brucellosis prevalence in a brucellosis low-prevalence area. *Epidemiol Infect.* **132(2)**:201-210.
264. Longo, M.C., Berninger, M.S., Hartley, J.L., (1990). Use of Uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in PCR. *Gene.* **93**:125-128.
265. Lorenz, H., Jäger, C., Willems, H., Baljer, G., (1998). PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with silica matrix. *Appl Environ Microbio.* **64(11)**:4234-7.
266. Lubick, K., Radke, M., Jutila, M., (2007). Securinine, a GABAA receptor antagonist, enhances macrophage clearance of phase II *C. burnetii*: comparison with TLR agonists. *J Leukoc Biol.* **82(5)**:1062-1069.
267. Lumio, J., Penttinen, K., Pettersson, T., (1981). Q fever in Finland: clinical, immunological and epidemiological findings. *Scand J Infect Dis.* **13(1)**: 17-21.
268. Macellaro, A., Akesson, A., Norlander, L., (1993). A survey of Q-fever in Sweden. *Eur J Epidemiol.* **9(2)**:213-216.
269. Mallavia, L.P., (1991). Genetics of Rickettsiae. *Eur J Epidemiol.* **7**:213-221.

270. Maltezos, H.C., Constantopoulou, I., Kallergi, C., Vlahou, V., Georgakopoulos, D., Kafetzis, D.A., Raoult, D., (2004). Q fever in children in Greece. *Am J Trop Med Hyg.* **70(5)**:540-544.
271. Mantovani, A., Benazzi, P., (1953). The isolation of *Coxiella burnetii* from *Rhipicephalus sanguineus* on naturally infected dogs. *J Am Vet Med Assoc.* **122**:117-120.
272. **Manual de la OIE sobre animales terrestres 2008.**
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.01.12.%20Fiebre%20Q.pdf
273. Marmion, B.P., Stoker, M.G.P., (1950). Q fever in Great Britain: epidemiology of an outbreak. *Lancet.* **2(6639)**:611-616.
274. Marmion, B.P., Ormsbee, R.A., Kyrkou, M., Wright, J., Worswick, D.A., Izzo, A.A., Esterman, A., Feery, B., Shapiro, R.A., (1990). Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever: eight years' experience in Australian abattoirs. *Epidemiol Infect.* **104(2)**:275-87.
275. 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.
276. Marmion, B.P., Sukocheva, O., Storm, P.A., Lockhart, M., Turra, M., Kok, T., Ayres, J., Routledge, H., Graves, S., (2009). Q fever: persistence of antigenic non-viable cell residues of *Coxiella burnetii* in the host-implications for post Q fever infection fatigue syndrome and other chronic sequelae. *QJM.* **102(10)**:673-84.
277. Marrie, T.J., (1985). Pneumonia and meningoencephalitis due to *Coxiella burnetii*. *J Infect.* **11**:59-61.
278. Marrie, T.J., (1990a). *Coxiella burnetii* (Q fever). In G. L. Mandell and J. E. Bennett (ed.), *Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed.* Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y. pp.1727-1734.
279. Marrie, T.J., (1990b). Q fever - A review. *Can Vet J.* **31**:555-563.
280. Marrie, T.J., (1990c). Acute Q fever, In T. J. Marrie (ed.), *Q fever, vol. 1. The disease.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp.125-160.
281. Marrie, T.J., (1995). *Coxiella burnetii* (Q fever) pneumonia. *Clin Infect Dis.* **21(3)**:5253-5264.
282. Marrie, T.J., Pollak, P.T., (1995). Seroepidemiology of Q fever in Nova Scotia: evidence for age dependent cohorts and geographical distribution. *Eur J Epidemiol.* **11**:47-54.
283. Marrie, T.J., Van Buren, J., Fraser, J., Haldane, E.V., Faulkner, R.S., Williams, J.C., Kwan, C., (1985). Seroepidemiology of Q fever among domestic animals in Nova Scotia. *Am J Public Health.* **75**:763-766.
284. Marrie, T.J., Schlech, W.F., Williams, J.C., Yates, L., (1986). Q fever pneumonia associated with exposure to wild rabbits. *Lancet.* **1**:427-429.
285. Marrie, T.J., Durant, H., Williams, J.C., Mintz, E., Waag, D.M., (1988). Exposure to parturient cats is a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *J Infect Dis.* **158**:101-108.
286. Marrie, T.J., Embil, J., Yates, L., (1993). Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* among wildlife in Nova Scotia. *Am J Trop Med Hyg.* **49(5)**:613-615.
287. Marrie, T.J., Stein, A., Janigan, D., Raoult, D., (1996). Route of infection determines the clinical manifestations of acute Q fever. *J Infect Dis.* **173(2)**:484-487.
288. Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P., (1997). Epidemiología Veterinaria. Principios y métodos. (Veterinary Epidemiology. *Principles and Methods*). Editorial Acribia, S.A.
289. Martinov, S., (2007). Contemporary state of the problem Q fever in Bulgaria. *Biotechnol & Biotechnol Eq.* **21(3)**:353-361.
290. Martinov, S.P., Neikov, P., Popov, G.V., (1989). Experimental Q fever in sheep. *Eur J Epidemiol.* **5(4)**:428-431.

291. **Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, J., Patta, C., Tola, S.,** (2007). Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. *J Vet Diagn Invest.* **19**:96–98.
292. **Maurin, M., Raoult, D.,** (1999). Q fever. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 518-553.
293. **Maurin, M., Benoliel, A.M., Bongrand, P., Raoult, D.,** (1992). Phagolysosomes of *Coxiella burnetii*-infected cells maintain an acidic pH during persistent infection. *Infect Immun.* **60**:5013–5016.
294. **McCaul, T.F., Williams, J.C.,** (1990). Localization of DNA in *Coxiella burnetii* by post-embedding immunoelectron microscopy. *Ann N Y Acad Sci.* **590**:136–147.
295. **McCaul, T.F., Williams, J.C.,** (1981). Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J Bacteriol.* **147**:1063–1076.
296. **McCaul, T.F., Hackstadt, T., Williams, J.C.,** (1981). Ultrastructural and biological aspects of *Coxiella burnetii* under physical disruptions, p. 267–280. In *W. Burgdorfer and R. L. Anacker (ed.), Rickettsiae and rickettsial diseases.* Academic Press, Inc., New York, N.Y.
297. **McCaul, T.F., Banerjee-Bhatnagar, N., Williams, J.C.,** (1991). Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting, *Infect Immun.* **59**:3243–3253.
298. **McClelland, M., Sanderson, K.E., Spieth, J., Clifton, S.W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scout, K., Colmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Millar, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R., Wilson, R.K.,** (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2. *Nature.* **413**:852-856.
299. **McCullagh, P., Nelder, J.A.,** (1989). Generalized Linear Models. London: Chapman and Hall.
300. **Mead, R., Duku, M., Bhandari, P., Cree, I.A.,** (2011). Circulating tumour markers can define patients with normal colons, benign polyps, and cancers. *Br J Cancer.* **105**(2):239-45.
301. **Meconi, S., Jacomo, V., Boquet, P., Raoult, D., Mege, J.L., Capo, C.,** (1998). *Coxiella burnetii* induces reorganization of the actin cytoskeleton in human monocytes. *Infect Immun.* **66**(11):5527–5533.
302. **Mediannikov, O., Ivanov, L., Nishikawa, M., Saito, R., Sidelnikov, Y.N., Zdanovskaya, N.I., Tarasevich, I.V., Suzuki, H.,** (2003). Molecular evidence of Coxiella-like microorganism harbored by *Haemaphysalis concinnae* ticks in the Russian Far East. *Ann N Y Acad Sci.* **990**:226-228.
303. **Medić, A., Dzelalija, B., Punda Polić, V., Gjenero Margan, I., Turković, B., Gilić, V.,** (2005). Q fever epidemic among employees in a factory in the suburb of Zadar, Croatia. *Croat Med J.* **46**(2):315-319.
304. **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.
305. **Meghari, S., Honstetter, A., Lepidi, H., Ryffel, B., Raoult, D., Mege, J.L.,** (2005). TLR2 is necessary to inflammatory response in *Coxiella burnetii* infection. *Ann N Y Acad Sci.* **1063**:161-166.
306. **Melnicakova, J., Lukacova, M., Howe, D., Heinzen, R.A., Barak, I.,** (2003). Identification of *Coxiella burnetii* RpoS-dependent promoters. *Ann NY Acad Sci.* **990**:591–595.
307. **Miceli, M.H., Veryser, A.K., Anderson, A.D., Hofinger, D., Lee, S.A., Tancik, C.,** (2010). A Case of person-to-person transmission of Q fever from an active duty serviceman to his spouse. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **10**(5):539-541.
308. **Miller, J.D., Thompson, H.A.,** (2002). Permeability of *Coxiella burnetii* to ribonucleosides. *Microbiol.* **148**:2393-2403.
309. **Milton, J.S., Tsokos, J.O.,** (2001). Estadística para biología y ciencias de la salud. Madrid. Interamericana McGraw Hill.

310. Minnick, M.F., Heinzen, R.A., Douthart, R., Mallavia, L.P., Frazier, M.E., (1990a). Analysis of QpRS-specific sequences from *Coxiella burnetii*. *Ann N Y Acad Sci.* **590**:514–522.
311. Minnick, M.E., Heinzen, R.A., Frazier, M.E., Mallavia, L.P., (1990b). Characterization and expression of the cbbE9 gene of *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol.* **136**:1099–1107.
312. Moeller, J.R.R.B., (2001) Causes of caprine abortion: diagnostic assessment of 211 cases (1991-1998). *J Vet Diagn Invest.* **13**:265-270.
313. Moliner, C., Raoult, D., Fournier, P.E., (2009). Evidence that the intra-amoebal *Legionella drancourtii* acquired a sterol reductase gene from eukaryotes. *BMC Res Notes.* **2**:51-58.
314. (van) Moll, P., Baumgärtner, W., Eskens, U., Hänichen, T., (1993). Immunocytochemical demonstration of *Coxiella burnetii* antigen in the fetal placenta of naturally infected sheep and cattle. *J Comp Pathol.* **109(3)**:295-301.
315. Montejo Baranda, M., Corral Carranceja, J., Aguirre Errasti, C., (1985). Q fever in the Basque country: 1981–1984. *Rev Infect Dis.* **7**:700–701.
316. Moodie, C.E., Thompson, H.A., Meltzer, M.I., Swerdlow, D.L., (2008) Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in northern Spain. *Emerg Infect Dis.* **14(10)**:1558-1566.
317. 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. *Vet Pathol.* **28**:81–84.
318. Moran, N. A., Wernegreen, J.J., (2000). Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends Ecol Evol.* **15**:321–326.
319. Moretti, T., Koons, B., Budowle B., (1998). Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques.* **25**:716-22.
320. Muhlemann, K., Matter, L., Meyer, B., Schoper, K., (1995). Isolation of *Coxiella burnetii* from heart valves of patients treated for Q fever endocarditis. *J Clin Microbiol.* **33**:428–431.
321. Musso, D., Raoult, D., (1995). *Coxiella burnetii* blood cultures from acute and chronic Q fever patients. *J Clin Microbiol.* **33**:3129–3132.
322. Musso, D., Raoult, D., (1997). Serological cross-reactions between *Coxiella burnetii* and *Legionella micdadei*. *Clin Diagn Lab Immunol.* **4**:208–212.
323. Myers, W.F., Baca, O.G., Wisserman, Jr C.L., (1980). Genome size of the rickettsia *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* **144**:460-461.
324. NCBI Taxonomy. *Coxiella burnetii*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=777&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
325. Nermut, M.V., Schramek, S., Brezina, R., (1968). Electron microscopy of *Coxiella burnetii* phase I and II. *Acta Virol.* **12**:446–452.
326. Nguyen, S.V., Otsuka, H., Zhang, G.Q., To, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Noma, A., Hirai, K., (1996). Rapid method for detection of *Coxiella burnetii* antibodies using high-density particle agglutination. *J Clin Microbiol.* **34**:2947–2951.
327. Noda, H., Munderloh, U.G., Kurtti, T.J., (1997). Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl Environ Microbiol.* **63**:3926–3932.
328. Ogden, N.H., Maarouf, A., Barker, I.K., Bigras-Poulin, M., Lindsay, L.R., Morshed, M.G., O'callaghan, C.J., Ramay, F., Waltner-Toews, D., Charron, D.F., (2005). Climate change and the potential for range expansion of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada. *Int J Parasitol.* **36(1)**:63-70.
329. Okimoto, N., Asaoka, N., Osaki, K., Kurihara, T., Yamato, K., Sunagawa, T., Fujita, K., Ohba, H., Nakamura, J., Nakada, K., (2004). Clinical features of Q fever pneumonia. *Respirology.* **9(2)**:278-82.
330. Oporto, B., Barandika, J.F., Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Garcia-Perez, A.L., (2006). Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in northern Spain. *Ann N Y Acad Sci.* **1078**:498-501.

- 331. Ormsbee, R.A.,** (1972). Q fever rickettsia. *In: Horsfall FLJC, Tamm I, eds. Viral and Rickettsial Infections of Man. 4th ed. Philadelphia. JB Lippincott, pp. 1144-1160.*
- 332. Ormsbee, R.A., Peacock, M.G., Tallent, G.,** (1985). Dynamics of phase I to phase II antigenic shift in populations of *Coxiella burnetii*. *In: Rickettsia and rickettsial diseases. Proceedings of the IIIrd International Symposium, Bratislava, Kazaèr, J. & Toman, R. (eds.), pp. 146-149.*
- 333. O'Donnell, M.E., Manshani, N., McCaughey, C., Soong, C., Lee, B.,** (2007). *Coxiella burnetii* infection of an aortic graft with multiple vertebral body erosion. *J Vasc Surg. 45(2):399-403.*
- 334. Palmer, S.R., Young, S.E.J.,** (1982). Q fever endocarditis in England and Wales, 1975–81. *Lancet. 2:1448-1449.*
- 335. Palmer, N.C., Kierstead, M., Key, D.W., Williams, J.C., Peacock, M.G., Vellend, H.,** (1983). Placentitis and Abortion in Goats and Sheep in Ontario Caused by *Coxiella burnetii*. *Can Vet J. 24:60-61.*
- 336. Palosuo, T., Leinikki, P., Petterson T., Saikku, P., Jäntti, V.,** (1974). Hazards of expanding tourism: report of six cases of Q fever in Finland. *Scand J Infect Dis. 6:173–176.*
- 337. Parker, R.R., Davis, G.E.,** (1938). A filter-passing infectious agent isolated from ticks. II. Transmission by *Dermacentor andersoni*. *Public Health Rep. 53:2267–2269.*
- 338. 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(1-2):101-106.*
- 339. Pascual, F.,** (1994). Estudio epidemiológico de la fiebre Q en la isla de Lanzarote (Islas Canarias). Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de G.C.
- 340. Pascual, F., Rodríguez, J. C., Otero, I.,** (1992). Seroprevalencia de la fiebre Q en la población natural adulta de Lanzarote (Islas Canarias). *An Med Intern. 8:233-234.*
- 341. Pautov, V.N.,** (1973). Rate of development of immunity in vaccination against Q fever. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 50(2):25-30.*
- 342. 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.*
- 343. Perin, T.L.,** (1949). Histopathologic observations in a fatal case of Q fever. *Arch Pathol. 47:361–365.*
- 344. Pérez Gallardo, F., Clavero, G., Hernández, S.,** (1949). Hallazgo en España de la *Rickettsia burnetii*, agente etiológico de la fiebre Q. *Rev. San. Hig. Pub. 1949; 23:489 – 496.*
- 345. Perez Ortola, R., Fernandez Penalba, G., Cia Ruiz, J., Merino, A.,** (1992). Osteoarthritis por *Coxiella burnetii*. *Rev. Clin. Esp. 191:25–26.*
- 346. 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. *Res Vet Sci. 87(2):189-191.*
- 347. Perrin, T.K., Bengtson, I. A.,** (1942). The histopathology of experimental Q fever in mice. *Public Health Rep. 57:790–794.*
- 348. Pérttega Díaz, S., Pita Fernández, S.,** (2004). Asociación de variables cualitativas: El test exacto de Fisher y el test de McNemar. *Cad Aten Primaria. 11:304-308.*
- 349. 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 Infect Dis. 4:394–396.*
- 350. Peter, O., Dupuis, G., Peacock, M.G., Burgdorfer, W.,** (1987).

- Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of *Coxiella burnetii* antibody. *J Clin Microbiol.* **25**:1063–1067.
- 351. Peter, O., Dupuis, G., Bee, D., Luthy, R., Nicolet, J., Burgdorfer, W.,** (1988). Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of chronic Q fever. *J Clin Microbiol.* **26**:1978–1982.
- 352. Peter, O., Flepp, M., Bestetti, G., Nicolet, J., Luthy, R., Dupuis, G.,** (1992). Q fever endocarditis: diagnostic approaches and monitoring of therapeutic effects. *Clin Investig.* **70**:932–937.
- 353. Piquet, P., Raoult, D., Tranier, P., Mercier, C.I.,** (1994). *Coxiella burnetii* infection of pseudoaneurysm of an aortic bypass graft with contiguous vertebral osteomyelitis. *J Vasc Surg.* **19**:165–168.
- 354. Plan Director Ganadero de Canarias,** capítulo XIV, Subsectores Caprino de Leche y de Caprino de Carne. (2000). Gobierno de Canarias. <http://www.gobcan.es/agricultura/doc/ganaderia/planganadero/capituloXIV.pdf>
- 355. Polydorou, K.,** (1985). Q-fever control in Cyprus--recent progress. *Br Vet J.* **141**(4):427-430.
- 356. Pope, J.H., Scott, W., Dweyer, R.,** (1960). *Coxiella burnetii* in kangaroos and kangaroo-ticks in Western Queensland. *Aust J Exp Biol.* **38**:17–19.
- 357. Popi, A.F., Zamboni, D.S., Mortara, R.A., Mariano, M.,** (2009). Microbicidal property of B1 cell derived mononuclear phagocyte. *Immunobiology.* **214**(8):664-673.
- 358. Prada, J., Gay, B., Llorente, A.,** (1950). Primer caso de fiebre Q humana en España. *Gac Med Esp.* **24**:332-333.
- 359. Pratt, P.W.,** (1983). Feline Medicine. 1st ed. Santa Barbara, California. *American Veterinary Publications.* **1983**:521-526.
- 360. Protocolos de Vigilancia Sanitaria Específica. Amianto.** *Comisión de Salud Pública Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad y Consumo.*
- 361. Qizilbash, A.H.,** (1983). The pathology of Q fever as seen on liver biopsy. *Arch Pathol Lab Med.* **107**:364–367.
- 362. Raeymaekers, L.,** (2000). Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol.* **15**(2):115-122.
- 363. Ramos, J.J.,** (1997). Curso de manejo de producción y patología de ovino y caprino. Facultad de Vet. Madrid.
- 364. Raoult, D.,** (1990). Host factors in the severity of Q fever. *Ann N Y Acad Sci* **590**:33–38.
- 365. Raoult, D., Stein, A.,** (1994). Q fever during pregnancy, a risk for women, fetuses and obstetricians. *N Engl J Med.* **330**:371.
- 366. Raoult, D., Marrie, T.J.,** (1995). Q fever. *Clin Infect Dis.* **20**:489–496.
- 367. Raoult, D., Bollini, G., Gallais, H.,** (1989). Osteoarticular infection due to *Coxiella burnetii*. *J Infect Dis.* **159**:1159–1160.
- 368. Raoult, D., Vestris, G., Enea, M.,** (1990a). Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of strains in HEL cells. *J Clin Microbiol.* **28**:2482–2484.
- 369. Raoult, D., Raza, A., Marrie, T.J.,** (1990b). Q fever endocarditis and other forms of chronic Q fever, p. 179–199. In T. J. Marrie (ed.), *Q fever, vol. 1. The disease.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- 370. Raoult, D., Drancourt, M., Vestris, G.,** (1990c). Bactericidal effect of doxycycline associated with lysosomotropic agents on *Coxiella burnetii* in associated with lysosomotropic agents on *Coxiella burnetii* in P388D1 cells. *Antimicrob Agents Chemother.* **34**:1512–1514.
- 371. Raoult, D., Brouqui, P., Marchon, B., Gastaut, J.A.,** (1992). Acute and chronic Q fever in patients with cancer. *Clin Infect Dis.* **14**:127–130.
- 372. Raoult, D., Levy, P.Y., Tissot Dupont, H., Chicheportiche, C., Tamalet, C., Gastaut, J.A., Salducci, J.,** (1993). Q fever and HIV infection. *AIDS.* **7**:81–86.

- 373. Raoult, D., Laurent, J.C., Multillod, M.,** (1994). Monoclonal antibodies embedded tissues. *Am J Clin Pathol.* **101**:318–320.
- 374. Raoult, D., Houpiqian, P., Tissot, D.H., Riss, J.M., Arditi-Djiane, J., Brouqui, P.,** (1999). Treatment of Q fever endocarditis: comparison of 2 regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Intern Med.* **159**:167–73.
- 375. 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.
- 376. Raoult, D., Fenollar, F., Stein, A.,** (2002). Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. *Arch Intern Med.* **162**:701–704.
- 377. Rauch, A.M., Tanner, M., Pacer, R.E., Barrett, M.J., Brokopp, C.D., Schonberger, L.B.,** (1987). Sheep-associated outbreak of Q fever—Idaho. *Arch. Intern. Med.* **147**:341–344.
- 378. Read, A.J., Erickson, S., Harmsen, A.G.,** (2010). Role of CD4+ and CD8+ T cells in clearance of primary pulmonary infection with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* **78**(7):3019–26.
- 379. Real Decreto 1941/2004,** de 27 de septiembre, por el que se establecen las normas de policía sanitaria que regulan los intercambios intracomunitarios y las importaciones de terceros países de animales de las especies ovina y caprina.
- 380. Reeves, W.K.,** (2008). Molecular evidence for a novel *Coxiella* from *Argas monolakensis* (Acari: Argasidae) from Mono Lake, California, USA. *Exp Appl Acarol.* **44**(1):57–60.
- 381. Reeves, W.K., Loftis, A.D., Priestley, R.A., Wills, W., Sanders, F., Dasch, G.A.,** (2005). Molecular and biological characterization of a novel *Coxiella*-like agent from *Carios capensis*. *Ann. N Y Acad Sci.* **1063**:343–345.
- 382. Rehacek, J.,** (1987). Epidemiology and significance of Q fever in Czechoslovakia. *Zbl Bakt Hyg A.* **267**:16–19.
- 383. Richardus, J. H., Donkers, A., Dumas, A.M., Schaap, G.J., Akkermans, J.P., Huisman, J., Valkenburg, H.A.,** (1987). Q fever in Netherlands: a sero-epidemiological survey among human population groups from 1968 to 1983. *Epidem Inf.* **98**:211–219.
- 384. Rislakki, V., Aminoff, M.,** (1953). Q fever; preliminary serological studies of cattle in Finland. *Duodecim.* **69**:371–375.
- 385. Robbins, F.C., Gauld, R.L., Warner, F.B.,** (1946). Q fever in Mediterranean area: report of its occurrence in allied troops. II. *Epidemiology. Am J Hyg.* **44**:23–31.
- 386. Rodolakis, A., Berri, M., Héchard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodler, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechalse, P., Naport, J.C., Vadet, J.P., Arricau-Bouvery, N.,** (2007). Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds. *J Dairy Sci.* **90**:5352–5360.
- 387. Rodríguez, N.F., Carranza, C., Bolaños, M., Pérez-Arellano, J.L., Gutierrez, C.,** (2010). Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Gran Canaria island, Spain. *Transbound Emerg Dis.* **57**(1–2):66–67.
- 388. Rolain J.M., Mallet M.N., Raoult D.,** (2003) Correlation between serum doxycycline concentrations and serologic evolution in patients with *Coxiella burnetii* endocarditis. *J Infect Dis.* **188**:1322–1325.
- 389. Romano, P.S., Gutierrez, M.G., Berón, W., Rabinovitch, M., Colombo, M.I.,** (2008). The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cell Microbiol.* **9**(4):891–909.
- 390. 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.

391. Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., (2009). *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl Environ Microbiol.* **75(2)**:428-433.
392. Roux, V., Bergoin, M., Lamaze, N., Raoult, D., (1997). Reassessment of the taxonomic position of *Rickettsiella grylli*. *Int J Syst Bacteriol.* **47**, 1255–1257.
393. Rowbotham, T.J., (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* **33(12)**:1179-1183.
394. Russell-Lodrigue, K.E., Zhang, G.Q., McMurray, D.N., Samuel, J.E., (2006). Clinical and pathologic changes in a guinea pig aerosol challenge model of acute Q fever. *Infect Immun.* **74(11)**:6085-6091.
395. Ruiz-Fons, F., Rodríguez, O., Torina, A., Naranjo, V., Gortázar, C., de la Fuente J., (2008). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet Microbiol.* **126(1-3)**:282-286.
396. Ruiz-Fons, F., Ianire Astobiza, F., 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.* 2010, **6**:3-8.
397. Russell-Lodrigue, K.E., Andoh, M., Poels, M.W., Shive, H.R., Weeks, B.R., Zhang, G.Q., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., McMurray, D.N., Samuel, J.E., (2009). *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect Immun.* **77(12)**:5640-5650.
398. Sabatier, F., Dignat-George, F., Mège, J.L., Brunet, C., Raoult, D., Sampol, J., (1997). CD4+ T-cell lymphopenia in Q fever endocarditis. *Clin Diagn Lab Immunol.* **4(1)**:89-92.
399. Salisbury, R.M., (1953). Q fever and its human and animal associations. *N Z Med J.* **52**:260-264.
400. Samuel, J.E., Frazier, M.E., Kahn, L.S., Mallavia, L.P., (1983). Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* **41**:448-493.
401. Samuel, J.E., Kiss, K., Varghees, S., (2003). Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era, *Ann. NY Acad. Sci.* **990**:653–663.
402. Sánchez, J., Souriau, A., Buendía, A.J., Arricau-Bouvery, N., Martínez, C.M., Salinas, J., Rodolakis, A., Navarro, J.A., (2007). Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **50(3)**:396-400.
403. Sandoval, J., (1974). Anatomía veterinaria. Tomo I: Embriología y Aparato Locomotor. Imprenta Moderna
404. Santamaría, J.I., (1997). Curso de manejo de producción y patología de ovino y caprino. Facultad de Vet. Madrid.
405. Sanzo, J. M., Garcia-Calabuig, M.A., Audicana, A., Dehesa, V., (1993). Q fever: prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in the Basque Country. *Int J Epidemiol.* **22**:1183–1187.
406. Savinelli, E.A., Mallavia, L.P., (1990). Comparison of *Coxiella burnetii* plasmids to homologous chromosomal sequences present in a plasmidless endocarditis-causing isolate. *Ann N Y Acad Sci.* **590**: 523-533.
407. Schelling, E., Diguimbaye, C., Daoud, S., Nicolet, J., Boerlin, P., Tanner, M., Zinsstag, J., (2003). Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev Vet Med.* **61(4)**:279-93.
408. Schmeer, N., Muller, P., Langel, J., Krauss, H., Frost, J.W., Wieda, J., (1987). Q fever vaccines for animals. *Zentbl. Bakteriол. Microbiol Hyg Ser A.* **267**:79–88.
409. Schneeberger, P.M., Hermans, M.H., van Hannen, E.J., Schellekens, J.J., Leenders, A.C., Wever, P.C., (2002). Real-time PCR with serum samples is

- indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2(3)**:179-91.
- 410. Schramek, S., Mayer, H.,** (1982). Different sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from phase I and pure phase II cells of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* **38**: 53-57.
- 411. Schramek, S., Radziejewska-Lebrecht, J., Mayer, H.,** (1985). 3-C-branched aldoses in lipopolysaccharide of phase I *Coxiella burnetii* and their role as immunodominant factors. *Eur J Biochem.* **148**:455-461.
- 412. Scott, G.H., Williams, J.C.,** (1990). Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Ann N Y Acad Sci.* **590**:291-296.
- 413. Scott, G.H., Williams, J.C., Stephenson, E.H.,** (1987). Animal models in Q fever: pathological response of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol.* **133**:691-700.
- 414. Serbezov, V.S., Kazar, J., Novkirishki, V., Gatcheva, N., Kovacova, E., Voynova V.,** (1999). Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg Dis.*, **5**:388-394.
- 415. Seshadri, R., Hendrix, L.R., Samuel, J.E.,** (1999). Differential expression of translational elements by life cycle variants of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* **67(11)**:6026-6033.
- 416. Seshadri, R., Samuel, J.E.,** (2001). Characterization of a Stress-Induced Alternate Sigma Factor, RpoS, of *Coxiella burnetii* and Its Expression during the Development Cycle. *Infect Immun.* **69(8)**:4874-4883.
- 417. Seshadri, R., Paulse, 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*. *PNAS.* **100**:5455-5460.
- 418. Sesión Plenaria del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud,** *aprobación del protocolo de vigilancia sanitaria específica para los/as trabajadores/as expuestos a amianto*, 25 de octubre de 1999.
- 419. Sesma Sánchez, P.,** (1990). *Coxiella burnetii* y neumonía comunitaria. Estudio de 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. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- 420. Shannon, J.G., Howe, D., Heinzen, R.A.,** (2005). Virulent *Coxiella burnetii* does not activate human dendritic cells: role of lipopolysaccharide as a shielding molecule. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102(24)**:8722-8727.
- 421. 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.* **8**:10-26.
- 422. Sidi-Boumedine, K., Rousset, E.,** (2011). Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. *Euro Ref.* **5**:30-37.
- 423. Sidwell, R.W., Thorpe, B.D., Gebhardt, L.P.,** (1964a). Studies of latent Q fever infections. I. Effects of whole body X irradiation upon latently infected guinea pigs, white mice, and deer mice. *Am J Hyg.* **79**:113-124.
- 424. Sidwell, R. W., Thorpe, B.D., Gebhardt, L.P.,** (1964b). Studies of latent Q fever infections. II. Effects of multiple cortisone injections. *Am J Hyg.* **79**:320-327.
- 425. Siegman-Igra, Y., Kaufman, O., Keysary, A., Rzotkiewicz, S., Shalit, I.,** (1997). Q fever endocarditis in Israel and a worldwide review. *Scand J Infect Dis.* **29**:41-49.
- 426. Silver, S.S., McLeish, W.A.,** (1984). "Doughnut" granulomas in Q fever. *Can Med Assoc J.* **130**:102-104.

427. **Simor, A.E.**, (1987). Q Fever - Human Disease in Ontario. *Can Vet J.* **28(5)**: 264–266.
428. **Sjöstedt, A., Göransson, I., Macellaro, A., Norlander, L.**, (1998). Genotypic and phenotypic characterization of two Swedish isolates and two prototypic strains of *Coxiella burnetii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **20(2)**:165–172.
429. **Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A.**, (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol.* **30**:225–420.
430. **Smith, D.J.W.**, (1940). Studies on the epidemiology of Q fever. III. The transmission of Q fever by the tick *Haemaphysalis humerosa*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* **18**:103–106.
431. **Smith, D.J.W.**, (1941). Studies on the epidemiology of Q fever. VIII. The transmission of Q fever by the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* **19**:119–122.
432. **Smith, D.J.W., Derrick, E.H.**, (1940). Studies on the epidemiology of Q fever. I. The isolation of six strains of *Rickettsia burneti* from the tick *Haemaphysalis humerosa*. *Aust J Exp Biol Med Sci.* **18**:1–5.
433. **Smith, R.D., Osorno, B.M., Brener, J., De La Rosa, R., Ristic, M.**, (1978). Bovine babesiosis: severity and reproducibility of **Babesia** bovis infections induced by *Boophilus microplus* under laboratory conditions. *Res Vet Sci.* **24(3)**:287–292.
434. **Spelman, D.W.**, (1982). Q fever: a study of 111 consecutive cases. *Med J Aust.* **1**:547–553.
435. **Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Loukaidis, F., Antoniou, M., Hadjichristodolou, C., Tselentis, Y.**, (2002). Isolation of *Coxiella* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. *Am J Trop Med Hyg.* **66**:86–90.
436. **Stein, A., Raoult, D.**, (1992). Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* **30(9)**:2462–2466.
437. **Stein, A., Raoult, D.**, (1993). Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microb Pathog.* **15**:177–185.
438. **Stein, A., Raoult, D.**, (1998). Q fever during pregnancy: a public health problem in Southern France. *Clin Infect Dis.* **27**:592–596.
439. **Stein A., Louveau, C., Lepidi, H., Ricci, F., Baylac, P., Davoust, B., Raoult, D.**, (2005). Q Fever Pneumonia: Virulence of *Coxiella burnetii* Pathovars in a Murine Model of Aerosol Infection. *Infect Immun.* **73(4)**:2469–2477.
440. **Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W.**, (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* **282**:754–759.
441. **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(9-10)**:360–365.
442. **Stoker, M.G.P., Fiset, P.**, (1956). Phase variation of the Nine Mile and others strains of *Rickettsia burnetii*. *Can J Microbiol.* **2**:310–321.
443. **Stoenner, H.G., Lackman, D.B.**, (1960). The biologic properties of *Coxiella burnetii* isolated from rodents collected in Utah. *Am J Hyg.* **71**:45–48.
444. **Sturgill-Koszycki, S., Swanson, M.S.**, (2006). *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *Int J Infect Dis.* **10(6)**:465–469.
445. **Sukocheva, O.A., Marmion, B.P., Storm, P.A., Lockhart, M., Turra, M., Graves, S.**, (2010). Long-term persistence after acute Q fever of non-infective *Coxiella burnetii* cell components, including antigens. *QJM.* **103(11)**:847–63.
446. **Syrucsek, L., Sobeslavsky, O., Gutvirth, I.**, (1958). Isolation of *Coxiella burnetii* from human placentas. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* **2**:29–35.

447. Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Wernegren, J.J., Sandstrom, J.P., Moran, N.A., Andersson, S.G., (2002). 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science*. **296**:2093-2098.
448. 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*. *Dis Aquat Organ*. **41(2)**:115-22.
449. Tarasevich, I.V., (1987). Epidemiology (1980-1985) and nonspecific prophylaxis of Q fever in the URSS (survey). *Abl Bakt Hyg A*. **267**:1-6.
450. Taylor, R.M., Kingston, J.R., Rizk, F., (1959). Serological (complement-fixation) surveys for Q fever in Egypt and Sudan, with special reference to its epidemiology in areas of high endemicity. *Arch Inst Pasteur Tunis* **36**:529-556.
451. Téllez, A., (1992) Diagnóstico de fiebre Q. *Bol Cont Cal*. **4**:111-115.
452. Téllez, A., Sainz, C., Echevarria, C., De Carlos, S., Fernandez, M.V., Leon, P., Brezina, R., (1988). Q fever in Spain: acute and chronic cases 1981-1985. *Rev Infect Dis*. **10**:198-202.
453. Terheggen, U., Leggat, P.A., (2007). Clinical manifestations of Q fever in adults and children. *Travel Med Infect Dis*. **5(3)**:159-164.
454. 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.
455. Thiele, D., Karo, M., Krauss, H., (1992). Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. *Eur J Epidemiol*. **8**:568-574.
456. Thiele, D., Willems, H., Köpf, G., Krauss, H., (1993). Polymorphism in DNA restriction patterns of *Coxiella burnetii* isolates investigated by pulsed field gel electrophoresis and image analysis. *Eur J Epidemiol*. **9**:419-425.
457. Thiele, D., Willems, H., Haas, M., Krauss, H., (1994). Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid QpH1 from *Coxiella burnetii*. *Eur J Epidemiol*. **10**:413-420.
458. Thomas, D.R., Treweek, L., Salmon, R.L., Kench, S.M., Coleman, T.J., Meadows, D., Morgan-Capner, P., Caul, E.O., (1995). The risk of acquiring Q fever on farms: a seroepidemiological study. *Occup Environ Med*. **52**:644-647.
459. Thrusfield, M., (1990). Epidemiología Veterinaria (Veterinary Epidemiology). Editorial ACRIBIA, S.A.
460. Tigertt, W.D., Benenson, A.S., Gochenour, W.S., (1957). Airborne Q fever. *Bacteriol Rev*. **25(3)**:285-293.
461. Tissot-Dupont, H., (2009). Climate, environment, and respiratory tract infections. *Med Mal Infect*. **39(3)**:200-202.
462. Tissot-Dupont, H., Raoult, D., (2008). Q fever. *Infect Dis Clin N Am*. **22**:505-514.
463. 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. *Am J Med*. **93**:427-434.
464. Tissot-Dupont H., Thirion, X., Raoult, D., (1994). Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin Diag Lab Immunol*. **1**:189-196
465. Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., (1999). Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am J Epidemiol*. **150(1)**:67-74.
466. Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., (2004). Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis*. **10(7)**:1264-1269.
467. Tissot-Dupont, H., Vaillant, V., Rey, S., Raoult, D., (2007). Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin Infect Dis*. **44(2)**:232-237.
468. To, H., Kako, N., Zhang, G.Q., Otsuka, H., Ogawa, M., Ochiai, O., Nguyen, S.A.V., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Nagaoka, N., Akiyama, M.,

- Amano, K., Hirai, K., (1996). Q fever pneumonia in children in Japan. *J Clin Microbiol.* **34**:647–651.
469. 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., (1998). Coxiellosis in domestic and wild birds from Japan. *J Wildl Dis.* **34**(2):310-316.
470. Tobin, M.J., Cahill, N., Gearty, G., Maurer, B., Blake, S., Daly, K., Hone, R., (1982). Q fever endocarditis. *Am J Med.* **72**:396–400.
471. Tokarevich, N.K., Schramek, S., Daiter, A.B., (1990). Indirect haemolysis test in Q fever. *Acta Virol.* **34**:358–360.
472. Toman, R., Garidel, P., Andrä, J. Slaba, K., Hussein, A., Koch, M.H., Brandenburg, K., (2004). Physicochemical characterization of the endotoxins from *Coxiella burnetii* strain Priscilla in relation to their bioactivities. *BMC Biochem.* **5**:1-11.
473. Tola, S., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Angioi, P.P., Rocchigiani, A.M., Leori, G., (1996). Rapid and specific detection of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* **51**:77–84.
474. Turck, W.P.G., Howitt, G., Turnberg, L.A., Fox, H., Longson, M., Matthews, M.B., Gupta, R.D., (1976). Chronic Q fever. *Q J Med.* **45**:193–217.
475. Turco, J., Thompson, H.A., Winkler, H.H., (1984). Gamma interferon inhibits growth of *Coxiella burnetii* in mouse fibroblasts. *Infect Immun.* **45**:781–783.
476. Tyagi, S., Kramer, F.R., (1996) Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* **14**:303-308.
477. Vaidya, V.M., Malik, S.V.S., Kaur, S., Kumar, S., Barbuddhe, S.B., (2008). Comparison of PCR, Immunofluorescence Assay, and Pathogen Isolation for Diagnosis of Q Fever in Humans with Spontaneous Abortions. *J Clin Microbiol.* **46**(6):2038–2044.
478. Valková, D., Kazár, J., (2005). A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol Lett.* **125**(2-3):275-80.
479. Vasselon T., Detmers P.A., (2002). Toll receptors: a central element in innate immune responses, *Infect Immun.* **70**:1033–1041.
480. Varghees S., Kiss K., Frans G., Braha O., Samuel J.E., (2002). Cloning and porin activity of the major outer membrane protein P1 from *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* **70**:6741–6750.
481. Villumsen, S., Jørgensen, C.S., Smith, B., Uldum, S., Schiellerup, P., Kroghfelt, K.A., (2010). Determination of new cutoff values for indirect immunofluorescence antibody test for Q fever diagnosis in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **65**(2):93-98.
482. Vodkin, M.H., Williams, J.C., (1986). Overlapping deletion in two spontaneous phase variants of *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol.* **132**:2587-2594.
483. Vodkin, M.H., Williams, J.C., (1988). A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein to both mycobacteria and *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **170**:1227-1234.
484. Voigt, J.J., Delsol, G., Fabre, J., (1983). Liver and bone marrow granulomas in Q fever. *Gastroenterol.* **84**:887–888.
485. Vourc'h, G., Vial, L., (2008). Distribution of ticks (and tick-borne diseases) in relation to climate change. Illustration with soft and hard ticks. *Livestock and global climate change Conference.*
486. Waag, D., Chulay, J., Marrie, T., England, M., Williams, J.C., (1995). Validation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of acute Q fever. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **14**:421–427.
487. Wachter, R.F., Briggs, G.P., Gangemi, J.D., Pedersen, C.E., (1975). Changes in buoyant density relationships of 2 cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *Infect Immun.* **12**:433–436.

488. **Wahl, C., Oswald F., Simnacher U., Weiss, S., Marre, R., Essig, A.,** (2001). Survival of *Chlamydia pneumoniae*-infected Mono Mac 6 cells is dependent on NF-KappaB binding activity. *Infect Immun.* **69(11):7039–7045.**
489. **Waldhalm, D.G., Stoenner, H.G., Simmons, R.E., Thomas, L.A.** (1978). Abortion associated with *Coxiella burnetii* infection in dairy goats. *J Am Vet Med Assoc.* **137:1580–1581.**
490. **Webster, J.P., Lloyd, G., Macdonald, D.W.,** (1995). Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitol.* **110:31–35.**
491. **Weinberg, E.D.,** (2000). Modulation of intramacrophage iron metabolism during microbial cell invasion. *Microbes Infect.* **2(1):85–89.**
492. **Weir, W.R.C., Bannister, B., Chambers, S., DeCock, K., Mistry, H.,** (1984). Chronic Q fever associated with granulomatous hepatitis. *J Infect.* **8:56–60.**
493. **Weisburg, W.G., Dobson, M.E., Samuel, J.E., Dasch, G.A., Mallavia, L.P., Baca, O., Mandelco, L., Sechrest, J.E., Weiss, E., Woese, C.R.,** (1989). Phylogenetic diversity of the *Rickettsiae*. *J Bacteriol.* **171:4202–4206.**
494. **Weiss, E., Pietryk, H.,** (1957). Growth of *Coxiella burnetii* in monolayer cultures of chicken embryo entodermal cells. *J Bacteriol.* **72:235–238.**
495. **Weiss, E., Moulder, J.W.,** (1984). Genus III. *Coxiella*, In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.* p. 701–704.
496. **Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F.,** (1957). Airborne transmission of Q fever: the role of parturition in generation of infective aerosol, *Ann NY Acad. Sci.* **70:528–540.**
497. **Wenworth, B.B.,** (1955). Historical review of the literature on Q fever. *Bacteriol Rev.* **19:129–149.**
498. **Werner M., Fournier, P.E., Andersson, R., Hogevik, H., Raoult, D.,** (2003). Bartonella and Coxiella antibodies in 334 prospectively studied episodes of infective endocarditis in Sweden. *Scand J Infect Dis.* **35(10):724–727.**
499. **Westlake, P., Price, L.M., Russell, M., Kelly, J.K.,** (1987). The pathology of Q fever hepatitis: a case diagnosed by liver biopsy. *J Clin Gastroenterol.* **9:357–363.**
500. **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. *Clin Microbiol Infect.* **15(5):499–501.**
501. **Whittick, J.W.,** (1950). Necropsy findings in a case of Q fever in Britain. *Br. Med J.* **1:979–982.**
502. **Wiebe, M.E., Burton, P.R., Shankel, D.M.,** (1972). Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burnetii* phase I. *J Bacteriol.* **110:368–377.**
503. **Willems, H., Thiele, D., Burger, C., Ritter, M., Oswald, W., Krauss, H.** (1996). Molecular biology of *Coxiella burnetii*. In: *Rickettsiae and rickettsial diseases, Kazar & Toman (eds.), Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia, pp. 363–378.*
504. **Willems, H., Jäger, C., Baljer, G.,** (1998). Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* **180:3816–3822.**
505. **Williams, J.C., Peacock, M.G., Waag, D.M., Kent, G., England, M.J., Nelson, G., Stephenson, E.H.,** (1993). Vaccines against coxiellosis and Q fever. Development of a chloroform-methanol residue subunit of phase I *Coxiella burnetii* for the immunization of animals. *Ann N Y Acad Sci.* **653:88–111.**
506. **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*). *Vet Pathol.* **45:247–**

254.

507. **Woldehiwet, Z.**, (2004). Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res Vet Sci.* **77(2):93-100.**
508. **Wolff, J.W., Kouwenaar, W.**, (1954). Investigation on occurrence of Q fever in Netherlands. *Ned T Geneesk.* **98:2726-2732.**
509. **Wouda, W., Dercksen, D.P.**, (2007). Abortion and stillbirth among dairy goats as a consequence of *Coxiella burnetii*. *Tijdschr Diergeneesk.* **132(23):908-11.**
510. **Xie, G., Bonner, C.A., Jensen, R.A.**, (2002). Dynamic diversity of the tryptophan pathway in chlamydiae: reductive evolution and a novel operon for tryptophan recapture. *Genome Biol.* **3(9):research0051.1-0051.17.**
511. **Yanase, T., Muramatsu, Y., Ueno, H., Morita, C.**, (1997). Seasonal variations in the presence of antibodies against *Coxiella burnetii* in dairy cattle in Hokkaido, Japan. *Microbiol Immunol.* **41(2):73-75.**
512. **Yeaman, M.R., Baca, O.G.**, (1990). Unexpected antibiotic susceptibility of a chronic isolate of *Coxiella burnetii*. *An NY Acad Sci.* **590: 297-305.**
513. **Yorke, J.A., Nathanson, N., Pianigiani, G., Martin, J.**, (1979). Seasonality and the requirements for perpetuation and eradication of viruses in populations. *Am J Epidemiol.* **109(2):103-123.**
514. **Yuasa, Y., Yoshiie, K., Takasaki, T., Yoshida, H., Oda, H.**, (1996). Retrospective survey of chronic Q fever in Japan by using PCR to detect *Coxiella burnetii* DNA in paraffin-embedded clinical samples. *J Clin Microbiol.* **34:824-827.**
515. **Zamboni, D.S., McGrath, S., Rabinovitch, M., Roy, C.R.**, (2003). *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol.* **49:965-976.**
516. **Zamboni, D.S., Campos, M.A., Torrecilhas, A.C., Kiss, K., Samuel, J.E., Golenbock, D.T., Lauw, F.N., Roy, C.R., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T.**, (2004). Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J Biol Chem.* **279(52):54405-54415.**
517. **Zeman, D.H., Kirkbride, C.A., Leslie-Steen, P., Duimstra, J.R.**, (1989). Ovine abortion due to *Coxiella burnetii* infection. *J Vet Diagn Invest.* **1:178-180.**
518. **Serbezov, V.S., Kazár, J., Novkirishki, V., Gatcheva, N., Kováčová, E., Voynova, V.**, (1999). Q fever in Bulgaria and Slovakia. *Emerg Infect Dis.* **5(3):388-394.**
519. **Zielinski, N.A., Chackrabarty, A.M., Berry, A.** (1991). Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encoding phosphomannomutase. *J Bio. Chem.* **266:9754-9763.**
520. **Zomorodipour, A., Andersson, S.G.**, (1999). Obligate intracellular parasites: *Rickettsia prowazekii* and *Chlamydia trachomatis*. *FEBS Lett.* **452:11-15.**
521. **ZOOCAN.** Registro canario de identificación animal.
http://zoocan.net/census/show_municipality
522. **Zuerner, R.L., Thompson H.A.**, (1983). Protein synthesis by intact *Coxiella burnetii* cells. *J Bacteriol.* **156:186-191.**
523. **Zusman T., Yerushalmi G., Segal G.**, (2003). Functional similarities between the *icm/dot* pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun.* **71(2003):3714-3723.**

Anexo



CUESTIONARIO SOBRE MANEJO Y SANIDAD ANIMAL EN EL GANADO CAPRINO DE LANZAROTE.

Los datos obtenidos de este cuestionario se utilizarán para la realización de una tesis doctoral en Sanidad Animal y serán tratados de forma confidencial.

Cuestionario nº:

Localidad:

Espacio a rellenar por el encuestador.

A) Características generales de la explotación

1- Explotación de: ganado caprino _____ o mixta _____ Otras especies _____
nº de reproductoras _____ nº de machos _____ Macho/Hembras _____

2- Comparte machos con otros ganaderos: Sí _____ No _____

3- Zona cubierta: metros cuadrados _____. **Zona descubierta:** metros cuadrados _____.

4- Altura de cubierta: _____ **Materiales:** _____

¿Se moja mucho la zona cubierta en invierno? _____

¿Se calienta la zona cubierta los días que hace calor? _____

5- Orografía del terreno en el que está situado la explotación.

6- Vientos dominantes: _____

7- Origen de animales de reposición:

Tasa de reposición: Reproductoras _____. Machos _____.

Reproductoras: Reposición propia ___ Reposición con reproductoras de otras ganaderías ___

En caso de compartir machos o haber hecho reposición con reproductoras de otros ganados en los últimos 5 años:

Porcentaje de la reposición _____. Origen geográfico de los machos:

Porcentaje de la reposición _____. Origen geográfico de las hembras:

8- ¿Recuerda coincidencia de año de introducción de ganado con aparición de aumento de abortos?:

Si ___ No ___ ORIGEN DEL GANADO INTRODUCIDO:

9- ¿Qué medidas preventivas toma usted a la hora de introducir nuevos animales en su explotación?:

Cuarentena ___. Analíticas ___. Desparasitación previa ___. Vacunación previa ___.
Ninguna medida ___

Otras _____.

10- Ordeño: automático _____ manual _____ .

11- Mantenimiento de ordeñadora:

- Regulación de vacío: Si ___ No _____. Periodicidad _____.
- Cambios de mangueras : Si_____ No _____. Periodicidad _____.
- Limpieza según instrucciones del fabricante del equipo de los productos de limpieza: Si___ No___

12- Pasteriza o somete a algún otro tipo de tratamiento térmico la leche que produce en su explotación ganadera: Si_ No_

Tipo de Pasterizador:

13- Distancia (en kilómetros) de la explotación al centro urbano más próximo:

5 Km ___ 5 – 10 Km ___ >10 Km ___.

14- Distancia (en kilómetros) a otras explotaciones de rumiantes:

5 Km ___ 5 – 10 Km ___ >10 Km ___ .

15- Distancia (en kilómetros) a otras explotaciones ganaderas:_____

5 Km ___ 5 – 10 Km ___ >10 Km ___.

Tipo o tipos de explotación _____

Especie/s ganaderas _____

16- Tipo de manejo:

- a. intensivo (estabulación permanente)._____
- b. semiextensivo (estabulación + pastoreo)._____ n° de horas de pastoreo al día _____
- c. extensivo (pastoreo casi permanente)._____
- d. transterminancia._____

17- Tipo de pastos: propios o arrendados ____ . Comunes ____ . Ambos ____ . No pastorean ____ .

Superficie de los pastos: ____

18- Años que lleva la explotación en funcionamiento bajo su responsabilidad: _____

19- Frecuencia anual de limpieza (eliminación del estiércol) y desinfección de las instalaciones:

Eliminación de estiércol:

TOTAL ____ PARCIAL ____ ; ninguna _ 1 vez ____ 2 veces ____ 3 veces ____ 4 veces ____
> 4 veces ____

Desinfección de las instalaciones:

TOTAL ____ PARCIAL ____ ; ninguna _ 1 vez ____ 2 veces ____ 3 veces ____ 4 veces ____
> 4 veces ____

Tipo de productos utilizados: _____

Existe rotación de productos de limpieza y desinfección: Si ____ No ____ .

20- Principal servicio veterinario disponible:

1. de Agrupación de Defensa Sanitaria.
2. Privado.
3. Otros (señalar cuál): _____
4. Ninguno

21- Personas que trabajan en la explotación:

A. familiares: ____ .

B. contratados: _____

22- Atiende usted o alguna de las personas que trabajan en la explotación los partos complicados: Si ____ No ____

23- Atiende usted o alguna de las personas que trabajan en la explotación los partos complicados que se dan en animales de otras ganaderías:

Si ____ No ____

24- Se desinfecta las manos antes y después de atender los partos:

Si ____ No ____

25- Que tipo de desinfectante utiliza normalmente para desinfectarse las manos:

26- Utiliza guantes de exploración: Si ___ No___ A veces ___.

Y mascarilla: Si___ No ___ A veces_.

27- Retira las placentas que quedan en el estiércol tras los partos:

Si ___ No ___ A veces__

28- Presencia de garrapatas en la zona:

- Sí___

- No___

29- Grado de infestación del ganado: porcentaje de animales aproximado que presentan

lesiones típicas provocadas por estos ectoparásitos: _____

Explicar lesiones típicas:

30- Principales fechas de paridera (meses) en la explotación: _____

31- Número aproximado de abortos en 2007: _____

Baifas primerizas_____

Resto de las cabras _____

32- Porcentaje aproximado de cabras que no quedaron preñadas en 2007:

32. Alimentación de las reproductoras:

Concentrado _____ Kgs/día.

Forrajes (fibra larga) _____ Kgs/día.

C) Características del ganadero**1- Edad del ganadero responsable de la explotación:****2- Grado de estudios alcanzado:**

(1) sin estudios.

(2) estudios primarios sin completar.

(3) estudios primarios (EGB).

(4) estudios secundarios (Instituto de Bachillerato).

(5) formación profesional.

(6) estudios universitarios.

2- ¿Ha realizado algún curso de formación/actualización ganadera?:

Sí, año/s: _____ No ___

3- ¿Está asociado?: No ___ Sí___

- en una Agrupación de Defensa Sanitaria ___

- en una Cooperativa ganadera ___

- otros: _____

4- Dedicación exclusiva a la explotación: Sí ___ No___

Otros trabajos: _____

5- Observaciones: