

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO: MICROBIOLOGÍA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS



**Epidemiología, Agentes causales y Métodos diagnósticos
en pacientes con Fiebre de Duración Intermedia en Gran
Canaria**

**TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR Dña. Margarita Bolaños Rivero
DIRIGIDA por los Profesores Dr. Antonio Manuel Martín Sánchez, Dra. O.
Évora Santana Rodríguez y Dr. José Luis Pérez Arellano**

EL DIRECTOR	LA DIRECTORA	EL DIRECTOR	LA DOCTORANDA

En Las Palmas de Gran Canaria, a 23 de Noviembre del 2015

DEDICATORIA/s

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

A José Luis, ya que sin su inestimable ayuda, esta tesis no se hubiera escrito.

A Évora, por su ayuda constante y sus sabios consejos.

A Antonio Manuel, por introducirme en “el mundo de la *Coxiella*” y por su insistencia en que hiciera este trabajo.

A Cristina, porque durante más de diez años hemos trabajado en este tema. Y a Antonio y a Rubén, que fueron los acompañantes fieles en la recogida de las garrapatas.

A Noé Rodríguez y a Carlos Gutiérrez, que me ayudaron en la recogida de las muestras y a entender el mundo de los veterinarios y los ganaderos.

A todos los miembros de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical, por su ayuda, por estar ahí para la recogida de las muestras y por su aportación en la publicación de muchos de los artículos. No podría olvidar a Alfonso Angel-Moreno, que estaba convencido que las cepas causantes de fiebre Q en Canarias tenían que ser diferentes de las del resto de España.

A Pino Sosa, por su ayuda esencial en el laboratorio.

A todo el personal de Majadahonda (Pedro, Isa, Raquel y Horacio), que junto con el resto del personal de los Patógenos Especiales nos enseñaron las técnicas de laboratorio empleadas en este trabajo. Al personal de Neiker, que nos enseñaron a hacer muestreos ambientales, recogida de garrapatas en animales y a identificar las mismas. Al resto de los participantes en la beca del INIA, ya que muchos de los trabajos de esta tesis se hicieron para ese proyecto.

Finalmente, a todos los que nos trajeron o nos dijeron donde había garrapatas (hermanos, sobrinos, compañeros de trabajo, amigos, etc), porque en determinado momento parecía que sólo vivíamos para ellas. Y ya desde el principio pensamos que estos animalitos serían maravillosos (aunque no todos compartían esta idea).

Finalmente debo incluir los proyectos que han subvencionado, en parte, este trabajo:

- ULPGC con el proyecto “Epidemiología de la fiebre Q en las Islas Canarias”.
- FUNCIS con los proyectos “Diagnóstico directo de las rickettsiosis prevalentes en nuestro medio (fiebre Q y tifus murino)” (FUNCIS 26/03), y “Estudio de las rickettsiosis en Gran Canaria” (FUNCIS 34/04).
- FIS con el proyecto “Ecología y control de la fiebre Q en Gran Canaria” (PI 051011).
- Del INIA (FAU 2006-00002-C04-03), con el proyecto coordinado de “Ecología de la fiebre Q en Gran Canaria”.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	17
1.1 Fiebre de duración intermedia (FDI)	19
1.1.1. Delimitación del problema	19
1.1.2. Concepto de fiebre de duración intermedia	21
1.1.3. Epidemiología y causas de fiebre de duración intermedia	21
1.2. Fiebre Q	23
1.2.1. Aspectos históricos	23
1.2.2. Taxonomía y Microbiología	26
1.2.2.1. Taxonomía	26
1.2.2.1. Microbiología	27
1.2.3. Epidemiología	28
1.2.3.1. Aspectos generales	34
1.2.3.2. Fiebre Q como antropozoonosis	34
1.2.3.3. Transmisión de <i>Coxiella burnetii</i> al ser humano	35
1.2.3.4. Patrones epidemiológicos	37
1.2.3.5. Distribución geográfica	39
1.2.3.6. Resumen de las características epidemiológicas de la infección por <i>Coxiella burnetii</i>	54
1.2.4. Patogenia y Fisiopatología	56
1.2.4.1. Estudios en animales de experimentación	56
1.2.4.2. Estudios histopatológicos en humanos	57
1.2.4.3. Estudios en cultivos celulares	59

1.2.4.4. Estudios de citocinas y células mononucleares circulantes	59
1.2.4.5. Integración de los aspectos patogénicos y fisiopatológicos de la fiebre Q	60
1.2.5. Manifestaciones clínicas y datos de laboratorio	63
1.2.6. Diagnóstico etiológico y seguimiento	70
1.2.7. Tratamiento	76
1.2.8. Prevención	77
1.3. Tifus murino	79
1.3.1. Aspectos históricos	79
1.3.2. Taxonomía y Microbiología	79
1.3.2.1. Taxonomía	79
1.3.2.1. Microbiología	80
1.3.3. Epidemiología	81
1.3.3.1. Aspectos generales	81
1.3.3.2. Estudios de seroprevalencia	82
1.3.3.3. Series de casos clínicos	83
1.3.4. Patogenia y Fisiopatología	85
1.3.5. Manifestaciones clínicas y datos de laboratorio	87
1.3.6. Diagnóstico etiológico y seguimiento	91
1.3.7. Tratamiento	94
1.3.8. Prevención	95
1.4. Bibliografía	97

II.- OBJETIVOS	127
III.- ARTICULOS DE INVESTIGACION	135
IV.- CONCLUSIONES	232

ABREVIATURAS EMPLEADAS

ada	<i>Acute disease antigen</i>
FC:	Fijación del complemento
FDI:	Fiebre de duración intermedia
GG:	Grupo genómico
gltA:	Gen de la citrato sintetasa
IFA:	Técnica de inmunofluorescencia
IL:	Interleucina
INF:	Interferón
IS:	Secuencias de inserción
LCV:	<i>Long cell variants.</i> Variantes de célula grande
LPS:	Lipopolisacárido
Mb:	millones de pares de bases.
MAPK:	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MST:	<i>Multispace sequence typing.</i> Secuenciación de regiones intergénicas
NOD:	Proteínas citoplasmáticas que regulan la respuesta inflamatoria.
Omp:	<i>Outer membrane protein.</i> Proteína de membrana externa
ORF:	<i>Open Reading frames.</i> Marco abierto de lectura
PET:	Tomografía por emisión de positrones.
rrs.	Gen 16S rRNA
Sca:	Antígenos proteicos de superficie
SCID:	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SCV:	<i>Small cell variant.</i> Variantes de célula pequeña
SFG:	<i>Spotted fever group.</i> Grupo de las fiebres exantemáticas
SLP:	Spore like particles. Estructuras similares a esporas
SNP:	Polimorfismo de nucleótido simple
SPA:	<i>Surface proteins antigens.</i> Proteínas antigénicas de superficie.
TLR:	<i>Toll like receptor</i>

INTRODUCCIÓN

Introducción

1.1. Fiebre de duración intermedia

1.1.1. Delimitación del problema

La presencia de elevación de la temperatura corporal ($> 38^{\circ}\text{C}$) es un signo clínico muy frecuente puede corresponder a dos síndromes diferentes: fiebre o hipertermia. En ambos casos la identificación de su causa es importante ya que siempre traduce la existencia de un problema patológico. Desde un punto de vista conceptual se denomina fiebre al aumento de la temperatura del “núcleo” corporal debido a una elevación del punto de control del centro termorregulador, mientras que el término hipertermia implica la elevación de la temperatura corporal debido a la lesión del centro termorregulador, a la excesiva producción de calor o a un fallo en los sistemas de pérdida del mismo. Las diferencias clínicas entre fiebre e hipertermia se indican en la **tabla I**.

	Fiebre	Hipertermia
Grado de elevación térmica	$< 41^{\circ}\text{C}$	$\geq 41^{\circ}\text{C}$
Sudación	SI	NO
Ritmo circadiano	SI	NO
Respuesta a antitérmicos	SI	NO

Tabla I: Diferencias entre fiebre e Hipertermia

Las principales causas de **hipertermia** corresponden a tres mecanismos: el golpe de calor (por aporte excesivo exógeno), el hipertiroidismo y el empleo de algunos fármacos (síndrome neuroléptico maligno, anestésicos o anticolinérgicos).

El diagnóstico diferencial del **síndrome febril** es más complejo, siendo útil delimitar inicialmente cuatro aspectos: la existencia de una situación de inmunodepresión (que implica diferentes posibilidades etiológicas), la estancia previa en el hospital (incluyendo la presencia de cirugía), la presencia de signos de localización y la duración de la fiebre (**figura 1**).

En el enfermo sin criterios de inmunodepresión ni ingreso previo, existen cuatro situaciones posibles: *i)* Presencia de un foco aparente (faríngeo, respiratorio, digestivo,

genitourinario, neurológico, etc), *ii)* Ausencia de foco aparente y duración inferior a 7 días (fiebre de corta duración), *iii)* Ausencia de foco aparente y duración entre 1 y 3 semanas (fiebre de duración intermedia) y *iv)* Ausencia de foco aparente con duración mayor de 3 semanas (fiebre de origen desconocido clásica).

De forma pragmática, podemos definir **fiebre prolongada** como aquella situación que incluye los grupos *iii* y *iv*. Es preciso insistir en este momento que **NO** son datos localizadores la presencia de lesiones cutáneas, adenopatías, tos seca o alteraciones del sistema urinario de orina en ausencia de sintomatología específica. En general, la mayor parte de casos con fiebre prolongada cumplen criterios de fiebre de duración intermedia, por lo que definiremos de forma más precisa esta entidad.

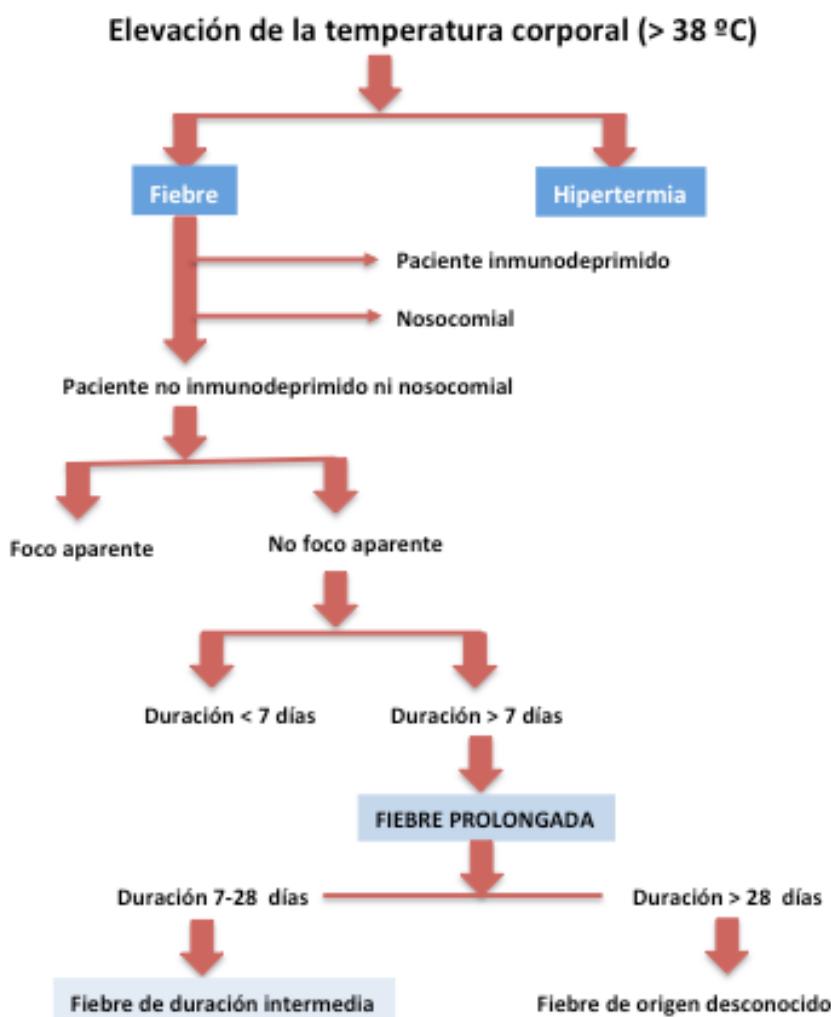


Figura 1. Nosología del síndrome de fiebre prolongada

Tras una revisión de la bibliografía, no hemos encontrado ninguna referencia específica sobre la actitud a adoptar en los pacientes con fiebre prolongada, aunque si alguna reflexión sobre este problema (1). Sin embargo, existen múltiples referencias acerca de aspectos concretos en pacientes con fiebre de origen desconocido (2,3,4,5,6) y escasas referencias acerca del espectro etiológico en pacientes con fiebres de duración intermedia.

1.1.2. Concepto de fiebre de duración intermedia (FDI)

El concepto de **fiebre de duración intermedia** incluye aquella situación clínica en la que se detecta una temperatura axilar superior a 38°C, sin foco aparente, con una duración superior a 1 semana e inferior a 3 semanas (7,8). Se excluyen de esta definición, ya que su manejo es diferente a cinco grupos de pacientes: *i)* los que presentan datos de inmunodeficiencia (incluida la infección por VIH), *ii)* aquellos hospitalizados recientemente, *iii)* las personas con enfermedad subyacente crónica que pueda ocasionar fiebre (p. ej. lupus eritematoso sistémico), *iv)* los viajeros recién llegados de países en vías de desarrollo y *v)* los portadores de dispositivos protésicos.

Para la delimitación concreta del síndrome es necesario realizar una historia clínica completa y protocolizada, un hemograma, un estudio bioquímico sanguíneo básico, un sistemático de orina y una radiografía de tórax.

1.1.3. Epidemiología y causas de fiebre de duración intermedia (FDI)

Tiene interés señalar que la identificación del problema de la fiebre de duración intermedia (9) y la mayor parte de las series publicadas del mismo corresponden a autores españoles (10,11,12,13). En estas series, la mayor parte de los casos corresponden a enfermedades infecciosas [principalmente fiebre Q, rickettsiosis, brucelosis, y agentes causales de mononucleosis infecciosa (14,15)] (**tabla II**). Otras causas descritas de este síndrome son las bartonelosis (16), anaplasmosis (17) seguidas de infecciones focales (7%) [particularmente abscesos intraabdominales y prostatitis (18)] y, finalmente, vasculitis y neoplasias (2%). En aproximadamente el 20% de los casos no se llega a un diagnóstico final (7).

En las Consultas externas de la UEIMT la fiebre prolongada supone un problema clínico muy frecuente (**19**). Específicamente desde el 1 de Junio de 1998 al 31 de Mayo de 2015 se han evaluado 2054 pacientes con FDI (**Tabla II**).

	Parra et al (12)	Espinosa (13)		Pérez Arellano (19)
Años	2000-05	1983-9	2004-5	1998-2015
Nº pacientes	233	505	179	2054
Sexo*	164 V/69M	404V/95M	117V/62M	1384V/706M
Edad**	15-89	32.6±17.4	39.7±15.8	14-89
Diagnóstico final	34%	81,1%	60,9%	43%
Fiebre Q	13,6%	21,4%	11,7%	14,5%
Citomegalovirus	6,8%	2,5%	6,7%	3,7%
Rickettsiosis	4,7%	18,5%	6%	10,1%
Virus Epstein Barr	2,5%	5,9%	5,5%	4,1%
Brucelosis	2,1%	19,2%	3,3%	0%
VIH***	0%	0%	4,4%	1,1%

*V/M: Varón /Mujer **En años *** Primoinfección

Tabla II: Series de Fiebre de duración intermedia en España

El análisis global de los datos indica tres aspectos: (*i*) los casos de esta entidad indican una incidencia importante en los tres estudios mencionados (*ii*) un tanto por ciento de casos importantes permanecen sin diagnóstico al finalizar el estudio y (*iii*) globalmente, la fiebre Q y las rickettsiosis son las enfermedades infecciosas más frecuentes responsables de este síndrome.

1.2. Fiebre Q

La fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial causada por *Coxiella burnetii* (20-25). En este apartado, revisaremos los aspectos más importantes de esta infección, incluyendo aspectos históricos, características taxonómicas y microbiológicas, epidemiología, patogenia y fisiopatología, manifestaciones clínicas y complementarias, métodos diagnósticos, posibilidades terapéuticas y métodos de prevención.

1.2.1. Aspectos históricos

Las primeras menciones de la enfermedad referidas en la literatura corresponden al final de la década de los 30 en el siglo XX (26,27,28). Así, en 1935 apareció una enfermedad que afectó a nueve trabajadores de un matadero de Queensland (Brisbane, Australia) (Figura 2). Esta enfermedad recibió la denominación de fiebre Q por E. Derrick (Figura 3) quien describió el cuadro clínico que correspondía a un síndrome febril con una duración entre 7 y 24 días acompañado de cefalea, astenia, anorexia y dolor en las extremidades inferiores con hemocultivos y pruebas serológicas frente a influenza, tifus, leptospiras, fiebre recurrente, fiebre tifoidea y paratifoidea negativos. La denominación de esta enfermedad como “fiebre Q” (“until fuller knowledge should allow a better name”) hace referencia al “misterioso” origen de la enfermedad (en inglés “query” significa duda, pregunta o interrogación) y no a su descripción en Queensland (26).



Figura 2: Matadero de Old Cannon Hill (Brisbane). Tomado de la referencia 27

La identificación del agente causal tiene lugar, de forma casi simultánea ,en dos partes del Mundo en esa época. Por un lado, el agente causal fue aislado de los trabajadores infectados tras inoculación a cobayas, identificándose en el hígado y bazo como una rickettsia por F.M. Burnet y M. Freeman en 1937 (**figura 3**). En ese momento se denominó al microorganismo causal *Rickettsia burnetii*. Por otro lado, en Nine Mile Creek (Montana, EE.UU.) G.E. Davis y H.R Cox (**figura 4**) publicaron en 1938 la detección de un agente filtrable en un garrapata de la zona (*Dermacentor andersoni*) al que denominaron *Rickettsia diaporica*. Además, el propio director de los NIH (R.E. Dyer), revisando los estudios de Cox desarrolló un cuadro clínico similar al descrito por Derrick en Australia lo que sugirió que ambos agentes causales eran similares. Teniendo en cuenta que algunas de las características de los microorganismos no correspondían exactamente a las de las especies del género Rickettsia, se denominó al agente causal como *Coxiella burnetii*, en honor a dos de los autores responsables.

Junto con la fiebre de las trincheras y el tifus epidémico, la fiebre Q causó epidemias en los ejércitos que lucharon en Europa durante la Segunda Guerra Mundial. Así, las tropas estadounidenses que ocuparon Italia presentaron cinco brotes bien documentados de fiebre Q entre el invierno de 1944 y la primavera de 1945, principalmente relacionados con la residencia en edificios ocupados previamente por animales domésticos. También los soldados alemanes fueron afectados por esta enfermedad tras su estancia en Serbia (denominándose *Balkan Grippe*), Italia, Crimea, Grecia, Ucrania y Córcega. Curiosamente, los civiles residentes habituales de esas regiones parecían resistir la infección y, de hecho, se encontraba entre ellos una alta tasa de anticuerpos residuales frente a *Coxiella burnetii*. Esto sugería que la infección era ya endémica en la cuenca del Mediterráneo en la época de su descripción en Australia.

Desde entonces y hasta la actualidad, la bibliografía acerca de diferentes aspectos de la fiebre Q (caracterización del agente causal, aspectos genéticos, patrones epidemiológicos, formas clínicas, métodos diagnósticos y medidas terapéuticas) se han incrementado de forma exponencial. En apartados posteriores se indicarán los principales datos de interés.



E. Derrick



F.M. Burnet



G.E. Davis



H.R. Cox

Figura 3: Autores de la descripción de fiebre Q e identificación de *Coxiella burnetii*

1.2.2. Taxonomía y microbiología

1.2.2.1. Taxonomía

La clasificación taxonómica del único agente causal de la fiebre Q (*Coxiella burnetii*) ha ido variando considerablemente desde su descripción inicial. Como se indicaba en el apartado anterior, debido a las características fenotípicas se clasificó en el género *Rickettsia* (*R. burnetii*, *R. diaporica*). Posteriormente, se detectaron características diferenciales que llevaron a la clasificación en un género aislado (*Coxiella*) dentro de la familia *Rickettsiaceae* y orden *Rickettsiales* (figura 4).

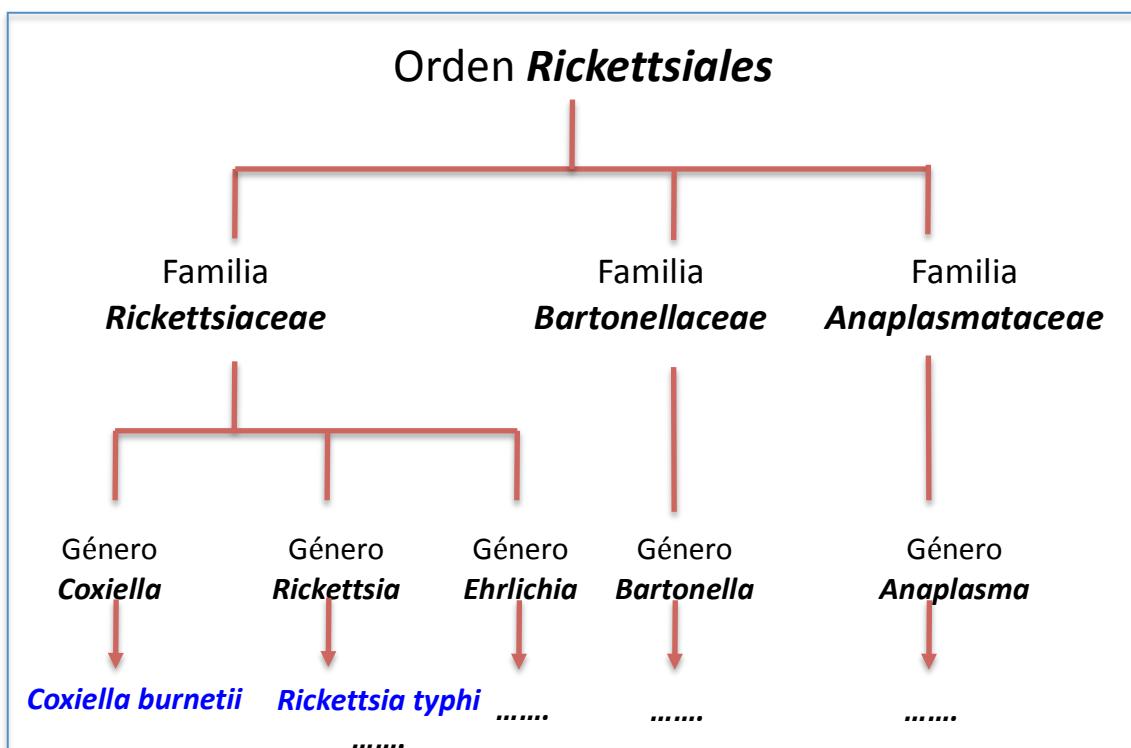


Figura 4: Taxonomía clásica de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia typhi*

Sin embargo, la secuenciación del RNAm y del genoma completo de *C. burnetii* ha permitido reclasificar al microorganismo dentro de la familia *Legionellaceae*, incluida en la división γ de las Proteobacterias(29) (figura 5) .

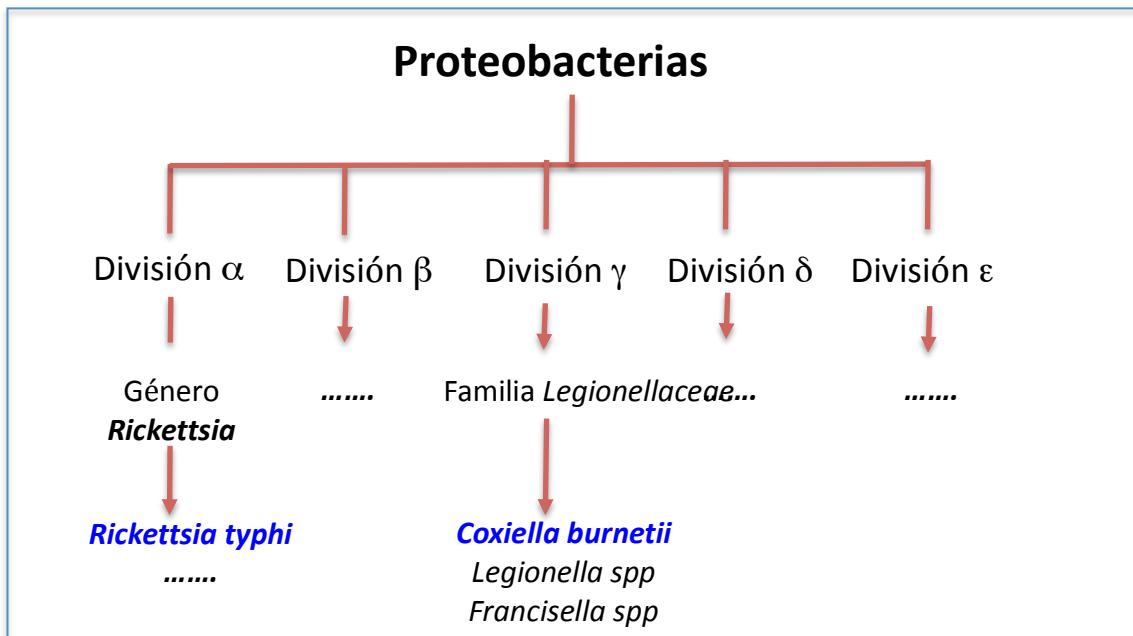


Figura 5: Taxonomía actual de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia typhi*

1.2.2.2. Microbiología

Coxiella burnetii es un bacilo pequeño que presenta dos **variedades diferentes morfológica y funcionalmente**: SCV (*small cell variants*) y LCV (*long cell variants*) (30). Ambas formas han podido ser separadas para su análisis mediante gradientes de cloruro de cesio. Las SCV miden entre 0,2 y 0,5 µm, tienen forma bacilar, presentan una cromatina condensada, mientras que las LCV son mayores (> 1 µm), pleomórficas, con cromatina dispersa y una estructura típica de membrana con peptidoglicano, espacio periplásмico y membrana externa. Ambas formas son capaces de infectar células aunque poseen diferencias funcionales. Así, las SCV poseen una escasa actividad metabólica, se replican de forma escasa y son estables en el ambiente, mientras que las LCV son muy activas metabólicamente, se replican de forma activa y son mecánicamente frágiles. Además, se han identificado en algunas LCV unas estructuras similares a esporas (SLP, *spore like particles*) de significado incierto. En la **figura 6** se muestran imágenes características de estas formas.

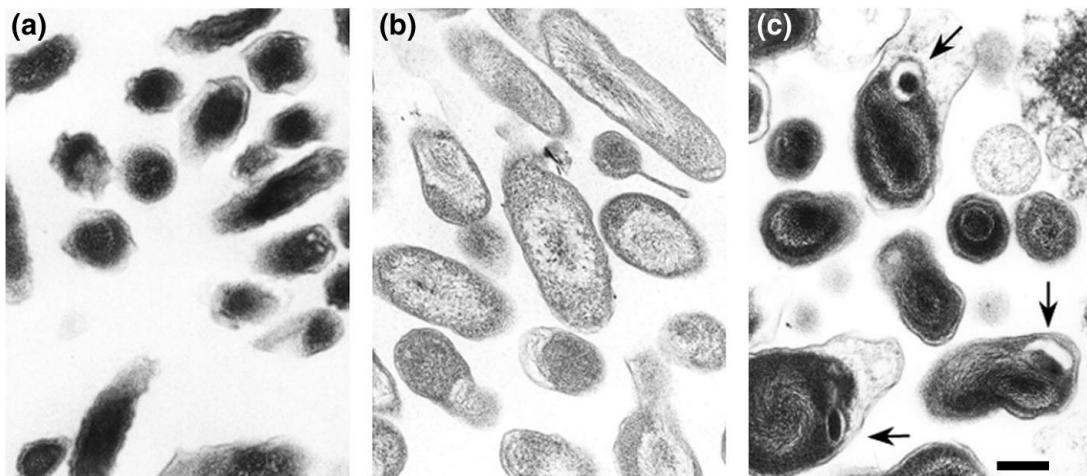


Figura 6: Variedades morfológicas de *Coxiella burnetii*

a. SCV (*small cell variants*), LCV (*long cell variants*) y SLP (*spore-like particles*)

El análisis de la composición proteica de estas variantes también ha demostrado diferencias notables. Así, las SCV presentan una proteína externa de membrana (OMP) característica OMP34 , a diferencia de las LCV que presenta OMP P1. Además las SCV poseen una gran concentración de dos proteínas (Hq1 y ScvA) de carácter básico que juegan un papel importante en la condensación de la cromatina. Por el contrario, las LCV presentan una mayor expresión de dos proteínas de 35 y 45kDa que desempeñan funciones como factores de elongación.

Estas características estructurales hacen que *Coxiella burnetii* posea una extraordinaria capacidad para ***la supervivencia extracelular y de resistencia a agentes físicos o químicos***. Así, sobrevive de 7-10 meses en lana a 15-20°C, durante más de un mes en carne fresca almacenada en frío y por más de 40 meses en leche desnatada a 4-6°C. Por otro lado, se han recuperado microorganismos viables tras calentamiento a 63 °C durante 30 minutos, tras exposición a una solución salina al 10% durante 180 días, después de la exposición a formalina al 0,5% y tras sonicación en agua destilada durante más de 30 minutos.

Aunque posee una membrana similar a la de los bacilos gramnegativos, no se observa en la tinción de Gram. Las principales métodos para la ***visualización microscópica*** en tejidos son la tinción de Giemsa, la tinción de Giménez y la tinción de Machiavello.

Un aspecto de gran relevancia en la biología de *Coxiella burnetii* es su variación antigénica, también denominada “**variación de fase**”. Este fenómeno se debe a modificaciones en el principal mecanismo de virulencia del microorganismo: el lipopolisacárido (LPS). En la naturaleza, *Coxiella burnetti* expresa antígenos de fase I que corresponden a LPS con cadenas O laterales completas. Este LPS completo permite enmascarar antígenos de superficie bacterianos a los receptores de reconocimiento de patrones de las células dendríticas, permitiendo su infección sin activación posterior. Tras subcultivo en medios celulares o en el curso de la enfermedad en hospedadores, se produce un cambio del LPS a antígenos de fase II (con una cadena O lateral truncada), que no limita el acceso de los anticuerpos a la superficie bacteriana. Por ello, los microorganismos en fase II son mucho menos virulentos. El estudio de los anticuerpos generados frente a ambos tipos de antígenos tiene utilidad en el diagnóstico (ver más adelante).

Tradicionalmente, para el **cultivo** de *Coxiella burnetii* se requieren medios celulares con condiciones estrictas de aislamiento (P3). Sin embargo recientemente se han desarrollado medios axénicos, diseñados atendiendo a las características de la vacuola intracelular en la que se multiplica *Coxiella burnetii* y a los requerimientos metabólicos de esta bacteria (31). En la composición de estos axénicos de cultivo son necesarios varios requerimientos: (i) un pH moderadamente ácido ($\text{pH} \approx 5$) mantenido por un tampón citrato, (ii) una concentración de iones Na^+ , K^+ y Cl^- similares a los del medio extracelular, (iii) un aporte principal de péptidos (aporte de carbono preferido frente a los glúcidos), aportados en forma de neopeptona, casaminoácidos y L-cisteina y (iv) una concentración de oxígeno baja (1-5%).

El **genoma** de *Coxiella burnetti* ha sido caracterizado en diferentes estudios (29,32,33). El tamaño oscila entre 1,5 y 2,4 M de pares de bases (2,1 en la cepa de referencia Nine Mile). Es un genoma menor que el de bacterias extracelulares pero considerablemente superior al de otras intracelulares. El genoma de *Coxiella burnetii* está formado por un cromosoma bacteriano y plásmidos facultativos.

El **cromosoma bacteriano** es circular (29), aunque en trabajos previos se sugería la posibilidad de una estructura lineal (32). El contenido de G+C es del 42,6% y el número de

genes codificantes de proteínas es de 2094. Los genes codificantes más importantes pueden clasificarse en varios grupos:

- Cuatro intercambiadores de Na+/H+ probablemente implicados en la homeostasis del pH y la supervivencia en medio ácido.
- Tres transportadores osmoprotectores.
- Un número elevado de sistemas de eflujo de drogas, que facilitan resistencia a las defensinas en el fagolisosoma.
- Dos trasportadores para glúcidos (xilosa y glucosa).
- 15 transportadores para aminoácidos y tres para péptidos, lo que ejemplifica su papel básico en el aporte de carbono.
 - Un transportador para glutamato.
 - Enzimas para la vía de Embden-Meyerhof (glucólisis) y la ruta de Entner-Doudoroff (vía alternativa que cataboliza glucosa a piruvato), gluconeogénesis, cadena transportadora de electrones, vía de las pentosas y vía de los ácidos tricarboxílicos.
 - Enzimas implicadas en la síntesis de purinas y pirimidinas, ácidos grasos y fosfolípidos.
 - Componentes del lipopolisacárido: lípido A, “core” y antígeno O.
 - Trece proteínas con dominio ankirina relacionadas con la adhesión entre el microorganismo y las células del hospedador.

Además, el cromosoma de *Coxiella burnetii* presenta otras características de interés: (i) A diferencia de otras bacterias intracelulares obligadas, en las que habitualmente existe escasa oportunidad de intercambio genético, las diferentes variantes de *Coxiella burnetii* poseen entre 31 y 59 secuencias de inserción (IS) pertenecientes a 8 familias. (ii) En el gen de 23S rRNA existen dos tipos de intrones tipo I, que modulan el crecimiento de la bacteria y (iii) el análisis del genoma ha demostrado un número muy elevado de pseudogenes (hasta 207 en la cepa Nine Mile) lo que sugiere que el microorganismo se encuentra en una primera fase de adaptación al hospedador.

Se han descrito cuatro tipos de *plásmidos* en diferentes aislados de *Coxiella burnetii*: QpH1, QpRS, QpDG y QpDV (**34,35,36,37,38**). Además, se ha descrito una secuencia homóloga a la de estos plásmidos insertada en el cromosoma bacteriano de

algunas variantes genéticas (*plasmidless* o “S”) . Es importante señalar que, en estudios de hibridación cruzada, se observa una parte conservada denominada “core” que representa aproximadamente el 50% de la información genética de todos los plásmidos o pseudoplásmidos indicados. La fecha de detección, origen biológico de las muestras, cepas y tamaño de los plásmidos se indican en la **tabla III** . El plásmido ***QpH1*** fue descrito inicialmente por Samuel et. al. en 1983 en la cepa Mile Nine obtenida de garrapatas y tiene un tamaño de 37 kb. EL segundo plásmido descrito en 1985 por el grupo de Samuel et al fue ***QpRS*** en una cepa de *Coxiella burnetii* (Priscilla) procedente de una placenta de cabra y tiene un tamaño mayor (39 kb) . La identificación del plásmido ***QpDG*** se realizó en 1989 por Mallavia et. al. en roedores salvajes de Utah (Dugway) siendo su tamaño el mayor de los plásmidos (42 Kb). Finalmente, en 1995 se identificó el plásmido ***QpDV*** aislado en dos cepas rusas (neumonía en un paciente, leche de vaca) y tres francesas (fiebre Q aguda, aneurisma aórtico y endocarditis crónica), siendo el de menor tamaño (33,5 kb).

Plásmido	Autores (año)	Origen	Cepa	Tamaño
QpH1	Samuel et al. (1983)	Garrapata	Nine Mile	37 Kb
QpRS	Samuel et al. (1985)	Cabra	Priscilla	39 Kb
QpDG	Mallavia et al. (1989)	Roedores	Dugway	42 Kb
QpDV	Valkova et. al. (1995)	Humanos (4)	Q1940	35,5 Kb
			MAC MAN ME	
		Leche de vaca (1)	Q321	

Tabla III: Plásmidos de *Coxiella burnetii*

Desde un punto de vista patogénico, parece que el papel fundamental de los plásmidos reside en la presencia de genes que codifican sustratos del sistema de transporte tipo IV, un importante factor de virulencia (39). Por otro lado, los plásmidos

descritos se asocian a grupos genéticos diferentes (ver a continuación) y se han asociado a diferentes formas clínicas de fiebre Q, aunque los resultados no son concluyentes (35).

El empleo de técnicas de biología molecular ha permitido demostrar la **variabilidad genética** de *Coxiella burnetii*. Existen muchos estudios que han empleado técnicas diversas, enzimas de restricción diferentes y material genético procedente de humanos, otros mamíferos y garrapatas para caracterizar la variabilidad genética de *Coxiella burnetii* (40,41,42,43,44,45,46). El número de “variantes fenotípicas” varía mucho dependiendo de las técnicas empleadas, aunque las principales variantes genotípicas son menos. Así, L.A. Hendrix et. al. identificaron inicialmente seis variedades (41) y posteriormente Beare et. al. ampliaron este número a ocho (45). En la **tabla IV** se indican algunas características importantes de la clasificación de Hendrix (incluyendo el patrón de plásmidos).

Grupo genómico	Plásmido	Ejemplo/s de aislado	Origen aislado	Enfermedad en hospedador
I	QpH1	Nine Mile RSA493	Garrapata	-
		Dyer RSA 345	Humano	Fiebre Q aguda
		Ohio 314 RSA2707	Leche de vaca	“Enfermedad persistente”
II	QpH1	Henzerling RSA33 I	Humano	Fiebre Q aguda
III	QpH1	Idaho Goat Q195	Cabra	Aborto
		Koka	Garrapata	-
IV	QpRS	Canada Goat 421 8	Cabra	Aborto
		K Q154	Humano	Endocarditis
V	No	G Q212 S Q217	Humano	Endocarditis Hepatitis
VI	OpDG	Dugway 7E22-57	Roedores	-

Tabla IV: Grupos genómicos iniciales de *Coxiella burnetii*

En la **tabla V** se indican los siete genes/ORF (*open reading frames*) empleados por Beare en la identificación de los 8 grupos genómicos actuales.

	GG I	GG II	GG III	GG IV	GG V	GG VI	GG VII	GG VIII
CBU0007	+	+	+	-	+	+	+	+
CBU 0071	+	+	+	+	-	+	+	-
CBU 0168	+	+	+	-	+	+	-	+
CBU 0598	+	+	-	+	+	+	+	+
CBU 0881	+	+	+	+	+	-	-	-
CBU 1805	+	+	+	+	-	+	+	+
CBU 2026	+	-	+	+	+	+	+	+

Tabla V: Grupos genómicos actuales de *Coxiella burnetii*

Aunque inicialmente se intentó relacionar el grupo genómico con diferentes manifestaciones clínicas, en estudios más amplios no se ha podido confirmar este hecho. Por ello parece que las manifestaciones clínicas dependen primordialmente lo de factores del hospedador. Sin embargo el diferente grupo genómico o fenotípico parece asociarse a localizaciones geográficas determinadas. Así, en el estudio de O. Glazunova et al (43), basado en la secuenciación de regiones intergénicas (MST; *multispace sequence typing*) se describieron 3 clusters principales, con una distribución geográfica diferente.

En la búsqueda de marcadores asociados a determinadas manifestaciones clínicas de la fiebre Q, tiene interés señalar la expresión de un antígeno concreto denominado ***adaA* (acute disease antigen)**. En su descripción inicial por investigadores de la Universidad de Texas (USA) se describió esta proteína inmunodominante de 28 kD, de función hipotética, así como el gen que la codifica (47). Los estudios iniciales sugerían que su expresión se asociaba a fiebre Q aguda mientras que su ausencia lo hacía a fiebre Q crónica (47). Sin embargo, estudios posteriores no han confirmado esta asociación, detectándose además varios polimorfismos del gen: dos delecciones (Q212 y Q154), un SNP en la posición 431) y una repetición en tandem en la posición 226) (48). Sin embargo, el estudio de las modificaciones de este gen en *Coxiella burnetii* es un arma importante de estudio de su epidemiología molecular.

1.2.3. Epidemiología

1.2.3.1. Aspectos generales

La fiebre Q es una **antropozoonosis**, con **diferentes patrones epidemiológicos** de **distribución mundial** (aunque con una prevalencia diferente atendiendo a países y regiones geográficas), y con una **repercusión importante** desde el punto de vista médico y económico (21,22,23,24,49). En este sentido, desde el punto de vista veterinario y ganadero, la enfermedad acarrea pérdidas económicas al ser una causa importante de abortos . Por otra parte, en algunas zonas endémicas, la fiebre Q aguda puede presentarse en forma de brotes epidémicos que suponen un claro problema de salud pública, con padecimientos individuales, alto coste sanitario y absentismo laboral. Finalmente, aunque infrecuente, la forma crónica de la enfermedad humana es muy grave, de tratamiento complejo y costoso y mortalidad no despreciable.

En los próximos apartados señalaremos las principales características de esta definición y las **características epidemiológicas básicas** de esta infección.

1.2.3.2. Fiebre Q como antropozoonosis

Las zoonosis son infecciones que se transmiten desde los animales al ser humano o viceversa en condiciones naturales. Se subclasifican en dos tipos principales: las antropozoonosis, en las que el agente patógeno es transmitido principalmente desde el animal al ser humano y las zooantroposis en las que el microorganismo es transmitido desde las personas a los animales. La fiebre Q puede clasificarse principalmente como una **antropozoonosis**. Lógicamente, estas entidades son de más difícil erradicación que las infecciones cuyo único reservorio es el ser humano.

En la epidemiología de la fiebre Q es importante distinguir tres tipos de **reservorios y/o fuentes de infección**. En primer lugar se encuentran los animales domésticos o peridomésticos, constituidos principalmente por ganado caprino, ovino y bovino, y en menor medida gatos y perros (50). Un segundo reservorio estaría formado por animales “silvestres”, principalmente roedores y pequeños mamíferos, aunque también ocasionalmente aves, reptiles, anfibios y peces (20). Finalmente, varios tipos de garrapatas constituyen un importante reservorio de este agente patógeno (ver más

adelante). La interacción entre el ser humano y los tres reservorios/ fuentes de infección adopta dos patrones diferentes, aunque ligados entre sí: el ciclo salvaje y el ciclo doméstico (**figura 7**). En el **ciclo salvaje**, la infección de los animales salvajes y las garrapatas es el elemento clave mientras que en el **ciclo doméstico** es la interacción entre seres humanos y ganado. La confluencia, cada vez más estrecha, entre ambos ciclos ha llevado probablemente a una emergencia de casos en humanos.

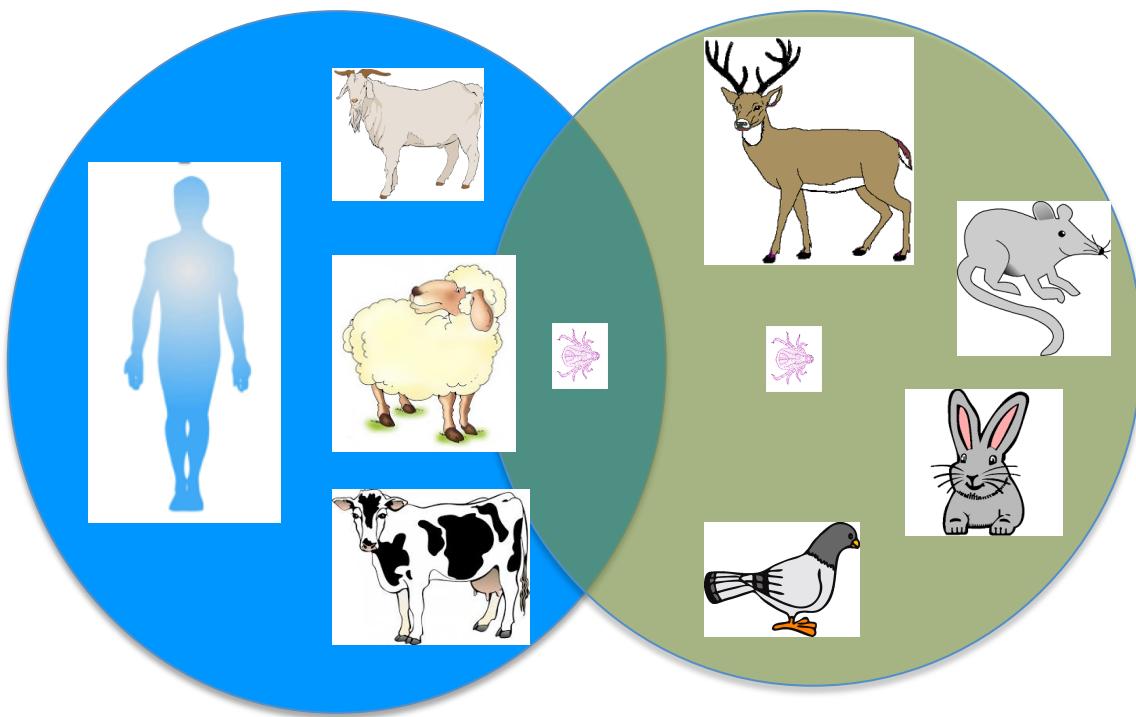


Figura 7 : Ciclo doméstico y silvestre de la infección por *Coxiella burnetii*

1.2.3.3. Transmisión de *Coxiella burnetii* al ser humano

La infección en humanos por fiebre Q se produce principalmente por vía aérea, aunque se han descrito otras vías de menor importancia como la vía oral o la transmisión interhumana no profesional y otras excepcionales como la picadura de garrapatas (20,21,22,23) (**figura 8**).

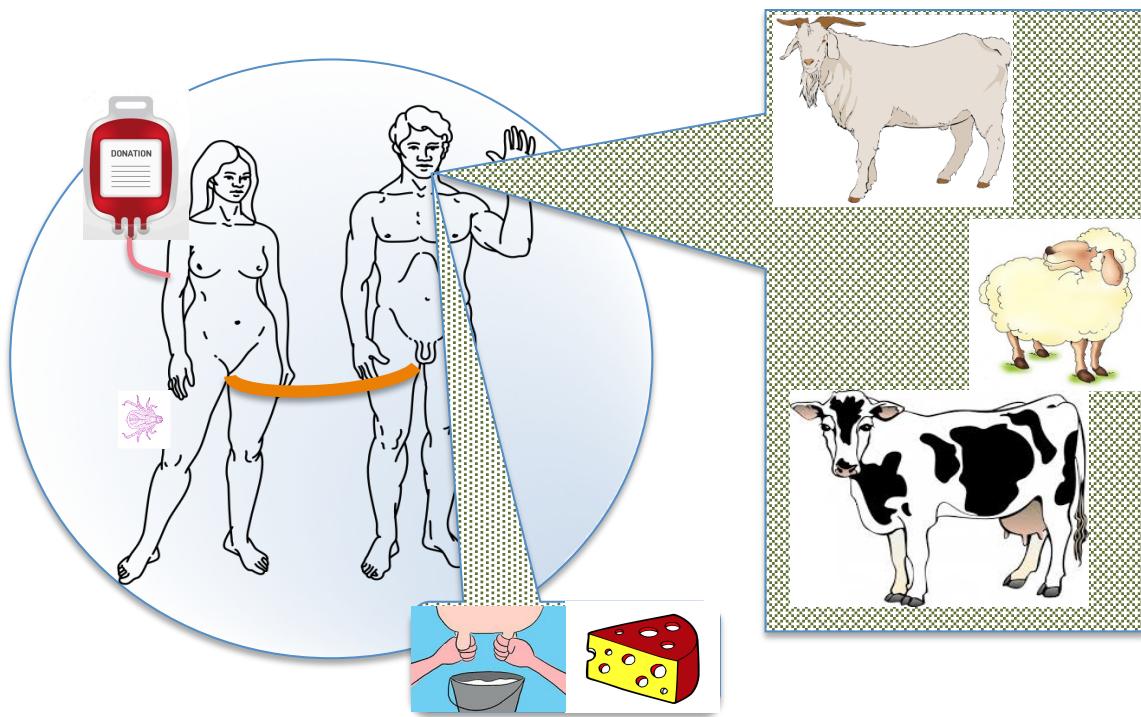


Figura 8: Formas de transmisión de *Coxiella burnetii* al ser humano

1.2.3.3.1. Transmisión por vía aérea

Sin lugar a dudas, la forma más habitual de trasmisión de infección por *Coxiella burnetii* es la inhalación del agente patógeno procedente de productos patológicos de los animales domésticos infectados. Los principales fluidos contaminantes son la leche, orina, heces y, principalmente los derivados placentarios (51). Como resulta intuitivo, la infección es más frecuente en personas que están en *contacto directo* con ganado o sus productos biológicos (lana, cuero, leche y derivados, paja infectada o polvo de la ropa) ya que la carga bacteriana ambiental es lógicamente más elevada y además persiste durante mucho tiempo (meses e incluso años). Por todo ello, esta infección es más frecuente en granjeros, veterinarios o trabajadores de mataderos. Además, esta infección puede transmitirse por esta vía entre humanos principalmente a sanitarios en contacto con tejidos de pacientes con fiebre Q [p. ej. microbiólogos (27,28), obstetras (52) o anatomopatólogos (23)].

Sin embargo, en un tanto por ciento importante de casos no se encuentra este factor epidemiológico, correspondiendo a *casos urbanos sin contacto directo* con

animales o productos derivados. La explicación más plausible es la gran virulencia de *Coxiella burnetii* y su capacidad para ser transmitida a muchos kilómetros de distancia del foco de origen (53,54). Además, en los últimos años se ha comprobado la capacidad de *Coxiella burnetii* para infectar amebas de vida libre (p. ej. *Acanthamoeba castellanii*), presentes en sistemas de aire acondicionado y responsables potenciales de algunos brotes (55). Desde un punto de vista biológico no resulta incongruente, debido a las características que incluyen a *Coxiella burnetii* en la familia *Legionellaceae*. Por ello, las amebas de vida libre podrían constituir un nuevo nicho ecológico.

1.2.3.3.2. Transmisión por vía oral

Aunque se ha demostrado de forma constante la presencia de *Coxiella burnetii* en la leche de animales infectados (56) y se ha asociado la fiebre Q a la ingesta de queso (57), no existen datos concluyentes de que la ingesta de estos productos sea responsable de la aparición de fiebre Q (23).

1.2.3.3.3. Transmisión interhumana no profesional

De forma excepcional se ha documentado la transmisión de *Coxiella burnetii* por hemoderivados (58) y por vía sexual, identificándose el microorganismo en el semen (59,60).

1.2.3.3.4. Transmisión directa desde garrapatas

Aunque las garrapatas juegan un papel importante en los ciclos biológicos de *Coxiella burnetii*, la transmisión directa de garrapatas a humanos es excepcional (61).

1.2.3.4. Patrones epidemiológicos

La infección por *Coxiella burnetii* en la naturaleza se relaciona con un gran número de posibilidades epidemiológicas (**figura 9**). Así, las infecciones por este microorganismo son adquiridas de forma **accidental**, aunque *Coxiella burnetii* es un potencial agente de **bioterrorismo** (28,62). Las principales características que sustentan su clasificación como agente de bioterrorismo B son su facilidad de obtención y multiplicación, la resistencia a condiciones ambientales adversas, la vía aérea de transmisión y la diseminación a grandes distancias (20). Sin embargo, la letalidad es baja y no todas las personas expuestas desarrollan enfermedad (20).

Dentro de las formas accidentales, la fiebre Q posee importancia en dos contextos diferentes: la afectación de la cabaña ganadera y la **infección en humanos**. En esta revisión se considerarán principalmente los aspectos médicos, señalando exclusivamente los **datos veterinarios** en relación a la infección humana.

Tras el contacto del ser humano con *Coxiella burnetii*, no todos los sujetos desarrollan infección. Por otro lado, dentro de los que produce la infección (detectada por métodos serológicos), no todos ellos desarrollan manifestaciones clínicas, es decir, enfermedad.

La fiebre Q se presenta habitualmente como enfermedad autóctona, aunque el número de **casos importados** publicados en los últimos años ha sido progresivamente mayor (**63,64,65,66,67,68,69,70,71**). Los casos de fiebre Q autóctonos pueden presentarse en forma de **brotes**, de mayor o menor importancia (ver más adelante) o como **casos aislados**. En ambas situaciones la fiebre Q puede manifestarse de forma **aguda** o crónica. Además, las formas agudas presentan dos formas principales: **neumónica** y **febril** (ver más adelante).

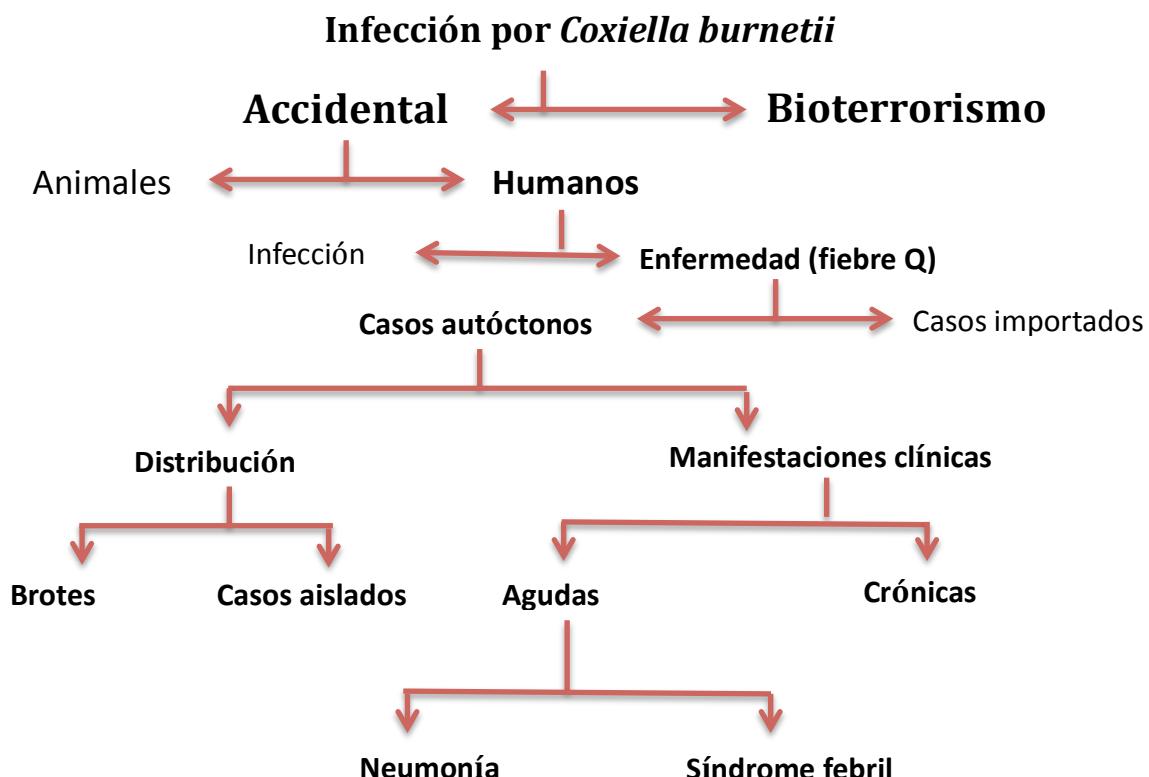


Figura 9: Patrones epidemiológicos de la infección por *Coxiella burnetii*

1.2.3.5. Distribución geográfica

La infección por *Coxiella burnetii* presenta una distribución mundial, afectando a países de los cinco continentes. Sin embargo, la construcción de un “mapa” unívoco de esta infección se encuentra con tres problemas fundamentales: (i) las múltiples formas epidemiológicas de la infección señaladas en el apartado anterior (p. ej. datos clínicos, seroprevalencia, datos en animales domésticos y salvajes, infección de garrapatas), (ii) la consideración de “no declarable de forma obligatoria” de esta enfermedad en muchos países y (iii) el interés en el estudio de esta entidad. Así, estamos totalmente de acuerdo con una sentencia clásica de Didier Raoult, uno de los autores más importantes en el estudio de la fiebre Q y de las rickettsiosis, que indica acerca de la fiebre Q: “*differences in prevalence are mainly related to differences in interest*” (72).

Las referencias publicadas recogidas en PubMed (1 de Septiembre 2015) son muy numerosas tanto acerca de la fiebre Q (4.470) como sobre *Coxiella burnetii* (2.860). Un número importante se refieren a aspectos epidemiológicos. En esta revisión nos centraremos en los datos de la bibliografía española señalando algunos aspectos importantes en otros países.

1.2.3.5.1 Fiebre Q en España

La descripción de casos de infección por *Coxiella burnetii* en España tiene lugar en torno a los años 50 del siglo XX. En aproximadamente 3 años se describe la presencia del microorganismos en garrapatas (*Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa* y *Rhipicephalus sanguineus*) en Madrid y Sevilla (73), el primer caso en humanos en Salamanca (74) y la presencia de anticuerpos en fauna silvestre (conejos y lirones) en Madrid (75).

A partir de los años 80 del siglo pasado, el interés por esta enfermedad ha sido creciente, detectándose tanto casos de fiebre Q, aislados como en brotes, estudiándose la seroprevalencia de la infección en diferentes regiones y evaluándose la infección en animales domésticos y salvajes.

En la **tabla VI** se indican las principales series de casos publicados de fiebre Q en España desde 1980 hasta la actualidad (**12,13,73-110**). Específicamente, en la **Tabla VIa** se indica la fecha de publicación y el primer autor responsable de la misma, la comunidad en la que se describió, el perfil epidemiológico básico (brote y/o casos esporádicos), el número de casos, la edad de los pacientes y la distribución por sexos. En la **Tabla VIb** se incluyen otros datos de interés como el ámbito de adquisición (distinguiendo los casos rurales y urbanos), la distribución estacional [Primavera (Marzo, Abril y Mayo); Verano (Junio, Julio, Agosto), Otoño (Septiembre, Octubre, Noviembre) e Invierno (Diciembre, Enero, Febrero)] o no, el contacto con animales y la forma clínica de presentación (aguda o crónica y, dentro de los casos agudos la presencia de neumonía o síndrome febril sin foco aparente).

En la **figura 9** se representan las comunidades con series publicadas de fiebre Q.

Además existen dos publicaciones basada en los datos microbiológicos sobre la incidencia de fiebre Q (**110,111**).

En la **tabla VII** se indican los principales estudios seroepidemiológicos acerca de la prevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en humanos, el año de estudio y el contexto en el que se realizó (**114,115,116,117,118,119,120,121,122,123, 124,125,126,127**).

Los datos acerca de la prevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en animales domésticos (**128,129,130,131,132,133,134,135**) se expresan en la **tabla VIII**.

Finalmente, en la **tabla IX**, se indican los datos acerca de la infección por *Coxiella burnetii* en diferentes especies de garrapatas en varias regiones españolas (**136,137**).

En las **figuras 10, 11 y 12** se recopila la información de estos estudios.

Ref	Primer autor	Año	Comunidad	Tipo	Nº casos	Edad	Varones
76	Sobradillo V.	1983	Euskadi	Brote	10	15-59	30%
77	Montejo M.	1983	Euskadi	Esporádicos	11	17-65	80%
78	Aguirre C.	1984	Euskadi	Brote	42	5-56	58%
79	Martinez F.	1985	Andalucía	Esporádicos	34	8-68	59%
80	Fernandez R.	1985	Madrid	Esporádicos	37	13-57	72%
81	Montejo M	1985	Euskadi	Mixto	130*	5-67	74%
82	Rubiés J	1986	Cataluña	Esporádicos	5	25-38	100%
83	Fernández M.	1998	Madrid	Esporádicos	3	28-43	33,3%
84	Sobradillo V.	1999	Euskadi	Esporádicos	116	30 ± 15	77%
85	Millán M.	1989	Canarias	Esporádicos	35	40	80%
86	Rotaeché R.	1990	Euskadi	Brote	5	12-46	60%
87	Antón E.	1990	Euskadi	Esporádicos	60	14-87	80%
88	Murie M.	1991	Navarra	Esporádicos	19	27	83%
89	Martinez JM.	1992	Euskadi	Brote	30	17-55	90
90	Bella F.	1994	Cataluña	Esporádicos	17	32 ± 11	82%
91	Pascual F.	1996	Canarias	Esporádicos	94	39 FID 54 Neumonía	ND
92	Merino FJ.	1998	Castilla-León	Esporádicos	13	10-41	85%
93	Abad A.	1999	Euskadi	Esporádicos	73	1-68	78%
94	Domingo P.	1999	Cataluña	Esporádicos	63	19-72	92%
95	Nebreda	2001	Soria	Brote	18	14-26	86%
96	Nuño FJ.	2002	Asturias	Mixto*	12	24-85	75%
97	Alarcón A.	2003	Andalucía	Esporádicos	231	8-77	85%
98	Bolaños M.	2004	Canarias	Esporádicos	40	20-74	85%
99	Sampere M.	2003	Cataluña	Esporádicos	66	45±18	85%
100	Romero MJ	2003	Andalucía	Esporádicos	109	31±12	92%
101	Miguel M.	2003	Canarias	Esporádicos	47	22-77	96%
102	Bartolomé J.	2004	Castilla-La Mancha	Esporádicos	35	7-67	71%
103	Ramos JM.	2005	Valenciana	Esporádicos	30	ND	73%
104	de los Ríos R.	2006	Madrid	Brote	22	ND	ND
105	García M.	2004	Asturias	Esporádicos	60	46 ± 17	72%
106	Muñoz A.	2007	Extremadura	Esporádicos	124	14-77	80%
12	Parra J.	2008	Andalucía	Esporádicos	32	ND	ND
13	Espinosa N.	2010	Andalucía	Esporádicos	111	ND	ND
107	Ruiz Seco MP.	2011	Madrid	Esporádicos	54	ND	81%
108	Mogollón MV.	2011	Multicéntrico	Esporádicos	83	44 ± 14	78%
109	Raya M.	2014	Baleares	Esporádicos	87	21-89	79%
110	Espejo E.	2014	Cataluña Canarias La Rioja	Esporádicos	71 85 27	42 ± 15	80%

* Incluye pacientes de referencias previas

Tabla VI a. Series de casos de fiebre Q publicadas en España

Ref	Comunidad	Ámbito	Estación	Animales	Forma clínica
76	Euskadi	Rural	Verano	NO	Aguda (Neumonía)
77	Euskadi	Mixto Rural (50%)	-	SI	Aguda (Neumonía)
78	Euskadi	Rural	Primavera	SI	Aguda (Neumonía)
79	Andalucía	Mixto Rural (50%)	-	SI (50%)	Aguda Fiebre (2/3) Neumonía (1/3)
80	Madrid	-	Verano	SI (30%)	Aguda (32)/Crónica (5)
81	Euskadi	Rural	Prim.	SI	Aguda (Neumonía)
82	Cataluña	Urbana	-	NO	Aguda (Fiebre)
83	Madrid	-	-	-	Crónica
84	Euskadi	Mixto Rural (50%)	Invier/Prim.	SI (18%)	Aguda (Neumonía)
85	Canarias	Rural	Prim/ Ver	SI (85%)	Aguda (Fiebre)
86	Euskadi	Rural	Inviero	SI	Aguda Neumonía (3) Fiebre (2)
87	Euskadi	Rural	Otoño	Si (17%)	Aguda (Neumonía)
88	Navarra	-	Invier/Prim	-	Aguda (Neumonía)
89	Euskadi	Rural	Primavera	-	Aguda (Fiebre)
90	Cataluña	Urbana	-	-	Aguda (Fiebre)
91	Canarias	Rural	-	-	Aguda (Fiebre)
92	Castilla-León	-	-	Si (15%)	Aguda (Neumonía)
93	Euskadi	-	-	-	Aguda Neumonía (75%)
94	Cataluña	Urbana	Primavera	NO	Aguda Fiebre (54%)
95	Soria	Rural	Primavera	SI (21%)	Aguda (Neumonía50%)
96	Asturias	Urbana	-	SI (25%)	Aguda (Neumonía)
97	Andalucía	Mixto Urbana (53%)	Primavera	SI (39%)	Aguda Fiebre (90%)
98	Canarias	Mixto Rural (67%)	Prim/ Ver	SI (38%)	Aguda Fiebre (92%)
99	Cataluña	Urbano	Invier/Prim	SI (33%)	Aguda (Neumonía 55%)
100	Andalucía	Mixto Rural (50%)	-	SI (27%)	Aguda Fiebre (98%)
101	Canarias	-	-	SI (51%)	Aguda (Fiebre)
102	Castilla La Mancha	Mixto Urbana (71%)	No	SI (27%)	Aguda Fiebre (71%
103	Valenciana	Mixto Urbano (67%)	No	SI (80%)	Aguda Fiebre (87%)
104	Madrid	Rural	Primavera	SI	Aguda (Fiebre)
105	Asturias	Mixto Urbana (52%)	Inviero	Si (7%)	Aguda (Neumonía)
106	Extremadura	Mixto Rural (61%)	Inviero Primavera	SI (47%)	Aguda (Fiebre 94%) Crónica (6%)
12	Andalucía	-	-	-	Aguda (Fiebre)
13	Andalucía	-	-	-	Aguda (Fiebre)
107	Madrid	Mixto Urbano (52%)	No	SI (59%)	Aguda (92%) Neumonía (55%) Crónica (8%)
109	Baleares	Mixto Rural (45%)	Prim/Ver	SI (46%)	Aguda Neumonía (66%)
110	Cataluña Canarias La Rioja	- - -	Primavera Primavera Inviero	-	Aguda (Fiebre 80%) Aguda (Fiebre 70%) Aguda (Fiebre 54%)
111	Múltiple	-	-	SI (70%)s	Crónica

Tabla VI b. Series de casos de fiebre Q publicadas en España

Ref	Primer autor	Año	Comunidad (Nº)	Contexto (Nº)	Técnica / Seroprevalencia
114	Daza RM.	1980	Madrid	Donantes	Microaglutinación 6,2%
115	Tellez A.	1989	Madrid	Población general Rural N=130, Urbana N =91	IFA 8,8% (urbano)-15,4%(rural)
116	Cour MI.	1990	Extremadura Castilla-La Mancha Madrid	Población general (180) (86) (577)	Fijación de complemento 59,3% 32,3% 27,5-34,5%
117	Ruiz Beltrán R.	1990	Castilla-León	Población general (400)	IFA :50,2% (IgG fase II \geq 1:40)
118	Pascual F.	1992	Canarias (390)	Población general (390)	Fijación de complemento 4,7-13,5% (IgG fase II \geq 1:8)
119	Saz J.V.	1993	Castilla León	Población general (298)	Inmunofluorescencia indirecta 20,8% (IgG fase II \geq 1:80)
120	Sanzo J.M.	1993	Euskadi	Población general (810)	IFA \geq 1/20: 32,35% IFA \geq 1/40:26,4%
121	Pérez Trallero E.	1995	Euskadi	Mataderos (39)	Inmunofluorescencia indirecta 91,7%(IgG fase II \geq 1:80)
122	Suárez J	1996	Castilla-León	Población general (406)	IFA 60,6% (IgG fase II \geq 1:80)
123	Pascual F.	1998	Cantabria	Población general (595)	IFA 48,6% (IgG fase II \geq 1:16) IFA 37,8% (IgG fasell \geq 1:64)
124	Valencia MC	2000	Aragón	Estudiantes de Veterinaria (480)	Fijación del complemento \geq 1:10 10,02% comienzo de curso 11,02% final de curso
125	Cardeñosa N.	2006	Cataluña	Población general 216	IFA 15% (IgG fase II \geq 1:40)
126	Bartolomé J.	2007	Castilla-La Mancha	Donantes de sangre 863	Inmunofluorescencia indirecta 23% (IgG fase II \geq 1:80)
127	González S.	2014	Castilla-La Mancha	Enfermedad cardiovascular 164	IFA 52% (IgG fase II \geq 1:256)

Tabla VII. Estudios de infección en humanos por *Coxiella burnetii* publicados en España

Introducción

Ref	Primer autor	Año	Comunidad	Tipo/s de mamífero/s Número	Técnica/Prevalencia
128	Palau L.	1989	Madrid	Rumiantes domésticos Bovinos 106	Fijación de Complemento* 67% (IgG fase II ≥1:8)
115	Tellez A.	1999	Madrid	Rumiantes domésticos	Fijación de complemento≥1:8 Caprino (76,6%) Bovino (17,7%)
129	Barandika J.	2007	Euskadi	Micromamíferos silvestres (253) <i>Apodemus sylvaticus</i> (162) <i>Mus domesticus</i> (28)	PCR 3/253 <i>Apodemus sylvaticus</i> (1/162) <i>Mus domesticus</i> (2/28)
130	Ruiz Fons F	2008	Andalucía Asturias	Rumiantes domésticos Mamíferos silvestres	Inmunofluorescencia indirecta (IgG fase II ≥ 1:16) Corzos (15,4%) Ciervo rojo silvestre (5,6%) Ciervo rojo doméstico (40%) Ganado bovino (39%)
131	Navarro J.A.	2009	Murcia	Ovinos Caprinos	PCR en placenta
132	Ruiz Fons F.	2010	Euskadi	Rumiantes domésticos Ovinos (1379) Bovinos (626) Caprinos (115)	ELISA con FC posterior Ovinos (11,8%) Bovinos (6,7%) Caprinos (8,7%)
133	Astobiza I.	2011	Euskadi	Mamíferos silvestres Carnívoros (206) Lagomorfos (28) Ungulados (199) Pájaros silvestres	PCR Carnívoros (0%) Lagomorfos (7,1%) Ungulados (8%) Pájaros (2%)
134	Alvarez J.	2012	Madrid	Rumiantes domésticos Bovinos (1100)	ELISA*** 6,76%
135	Mentaberre G.	2013	Canarias	Camellos (100)	ELISA**** 19%

Tabla VIII. Prevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en mamíferos en España

* Behring ** ELISA Cox kit *** IDVET **** LSIVET

Ref	Primer autor	Año	Comunidad	Nº	Especies (n)	Infección por <i>C. burnetii</i>
136	Barandika J.	2008	Euskadi	691	<i>Ixodes ricinus</i> (288) <i>Haemaphysalis punctata</i> (109) <i>Haemaphysalis inermis</i> (95) <i>Haemaphysalis concinna</i> (52) <i>Dermacentor reticulatus</i> (97) <i>Rhipicephalus bursa</i> (50)	0% 1 (09%) 0% 0% 0% 0%
137	Toledo A.	2009	Madrid	1482	<i>Hyalomma lusitanicum</i> <i>Dermacentor marginatus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Rhipicephalus pusillus</i>	7,7% (80/1039)* 3,4% (15/443)**
133	Astobiza I	2011	Euskadi	340	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes hexagonus</i>	0%

Tabla IX. Prevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en garrapatas en España

* Aisladas en la naturaleza ** Adheridas a animales

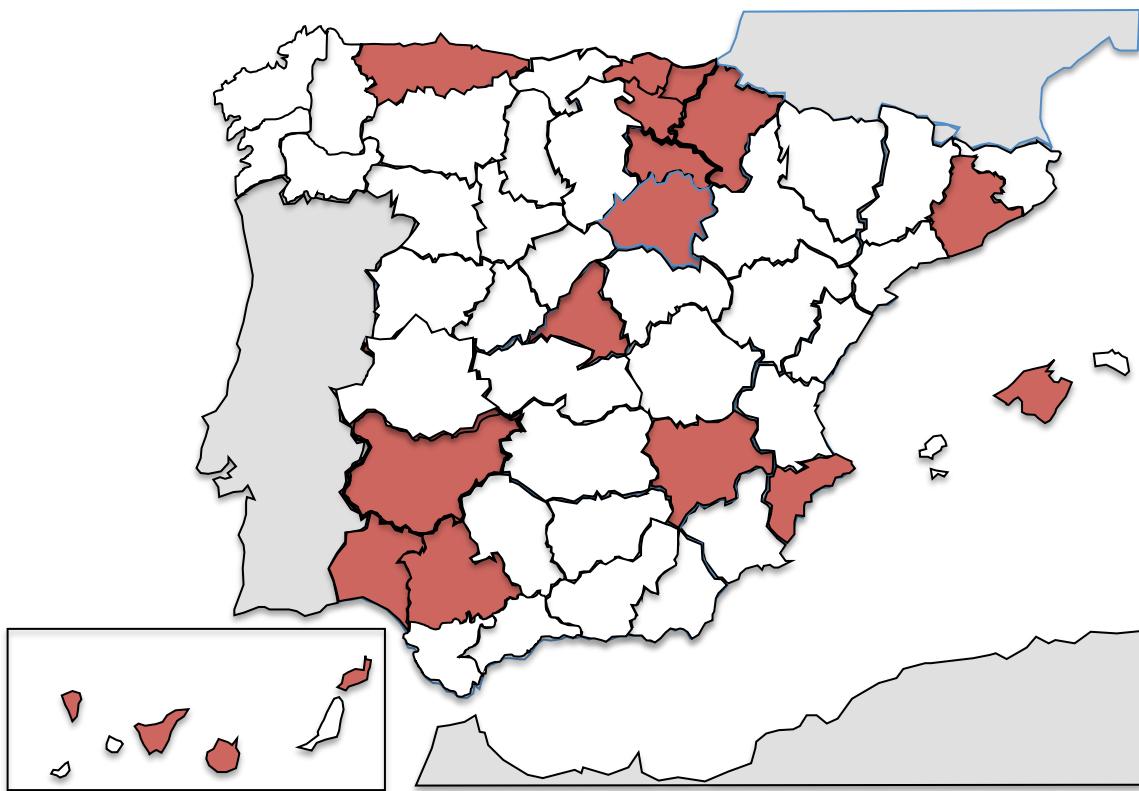


Figura 10 : Provincias con series publicadas de fiebre Q en España

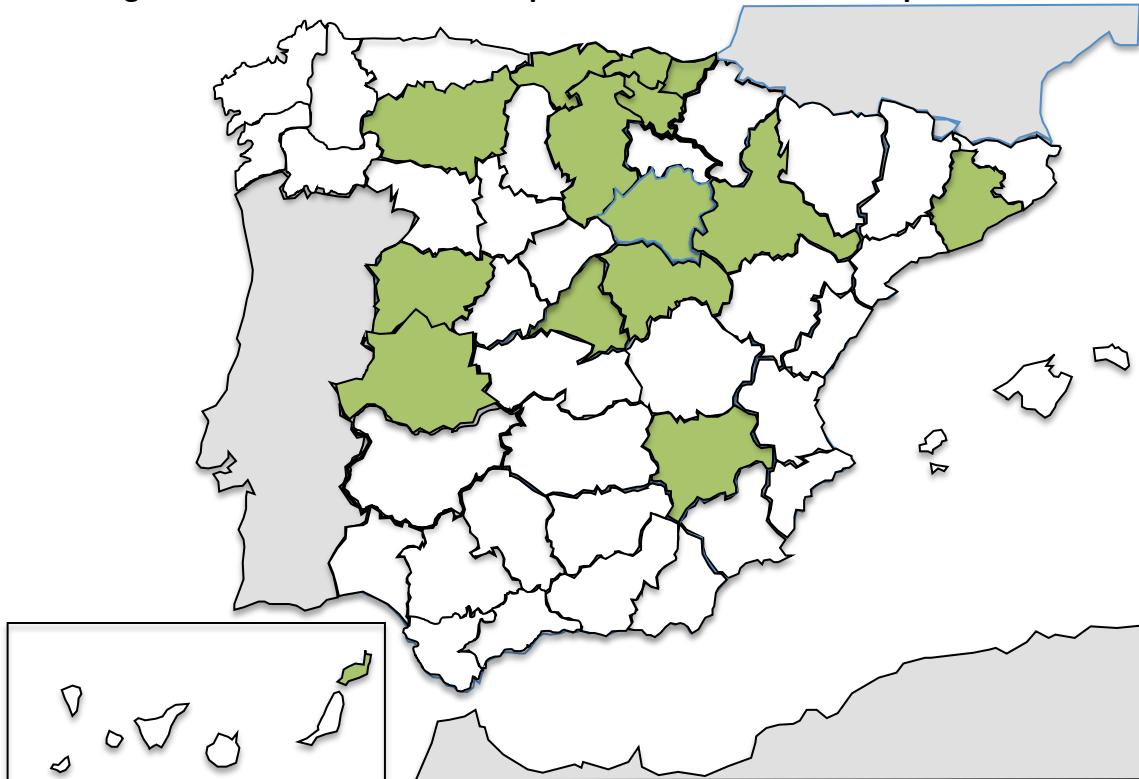


Figura 11 : Provincias con datos sero-epidemiológicos de infección por *C. burnetii* en España

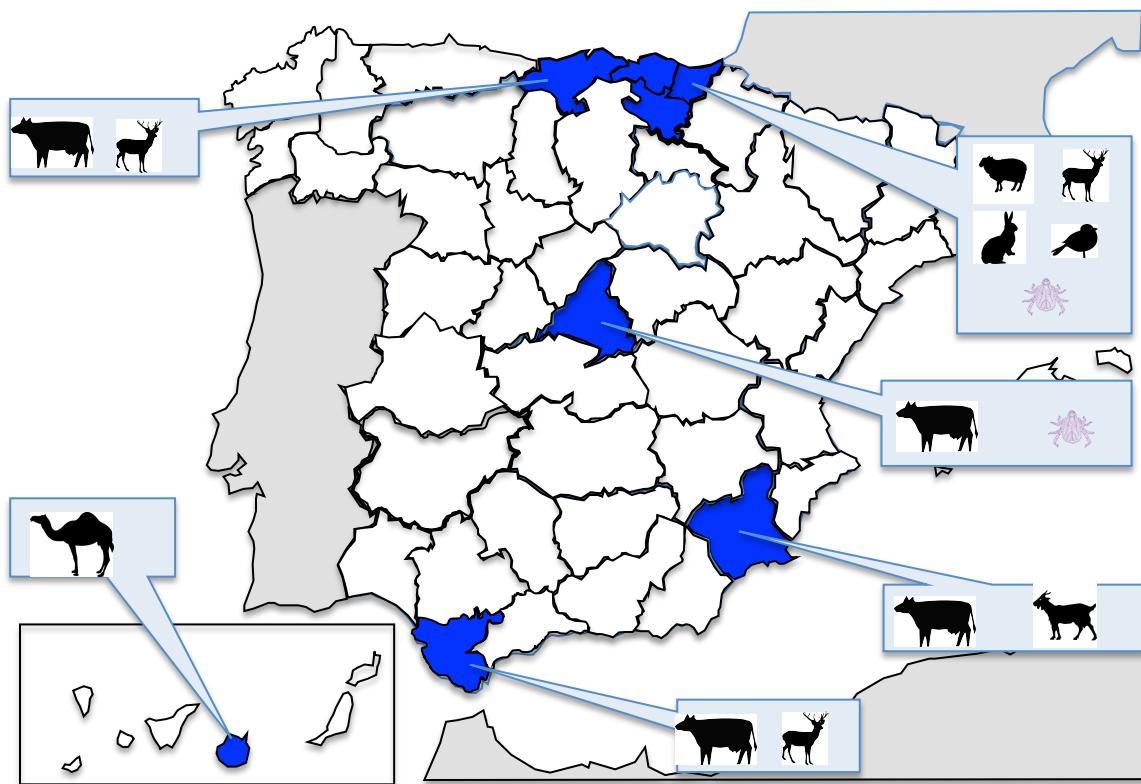


Figura 12: Estudios de infección por *C. burnetii* en animales

1.2.3.5.2. Fiebre Q en otros países

Existe una abundante información acerca de la fiebre Q y la infección por *Coxiella burnetii* en humanos y animales en todo el mundo. Una revisión exhaustiva de este aspecto escapa a los objetivos de esta revisión, por lo que únicamente señalaremos algunos aspectos de especial interés en humanos en los últimos años.

1.2.3.5.2.1. Otros países europeos

En los últimos años se han publicado un número importante de trabajos sobre la infección por *Coxiella burnetii* en varios países europeos (**138,139,140,141, 142,143,144,145,146,147**).

En *Francia*, los estudios realizados entre 1982 y 2010 muestran una seroprevalencia entre el 1% (donantes de sangre) y el 71% en personas pertenecientes a grupos de riesgo (**138**). En ese mismo periodo de tiempo, se han descrito siete brotes que incluían desde 5 hasta 289 personas, localizados en el Sudeste de Francia (Provenza , Alpes y Ródano) (**138**). En otro trabajo, realizado en el mismo periodo de tiempo por el grupo de

D. Raoult (**139**), basado en la recogida de datos de 3.723 pacientes con confirmación serológica se observan los siguientes datos: *i)* la incidencia anual de fiebre Q aguda es de 2,5/100.000 personas mientras que la de endocarditis es de 0,1/100.000 personas, *ii)* en los años de estudio se ha observado un incremento continuo en el número de casos y *iii)* la incidencia máxima tiene lugar entre Abril y Septiembre.

En *Suiza*, la incidencia de fiebre Q es baja (0,15/100.000 habitantes), aunque recientemente se ha descrito un brote de 15 personas en la zona de viñedos de Lavaux (próxima a las regiones francesas afectadas (**140**)).

Sin lugar a dudas, el mayor brote de casos de fiebre Q en la historia hasta la actualidad ha tenido lugar en *Holanda* durante los años 2007 a 2010 (**138,141,142,143,144**). Este brote afectó a 4.026 personas en los cuatro años, siendo la incidencia máxima en 2008 (2354). El análisis de las características de este brote indicó varios aspectos de interés: *i)* La edad media de los pacientes fue de 50 años (RIC 21), con un discreto predominio en varones 62%). *ii)* La región que presentó un mayor número de casos fue Noord-Brabant, que aportó más del 50% de los pacientes, *iii)* existía una asociación estadística con el hábito tabáquico. *iv)* Un 21% de los pacientes requirieron ingreso hospitalario *v)* la forma clínica más frecuente fue la respiratoria (61,5%), describiéndose endocarditis en 3,1% de los pacientes. *vi)* Aunque existieron datos de asociación epidemiológica en varios grupos de paciente, no pudo identificarse un único origen global de todo el brote. *vii)* Tampoco pudo identificarse un único genotipo en pacientes o animales estudiados, detectándose 10 tipos diferentes en el brote. *viii)* Las principales razones que sustentan la aparición de este brote son: el aumento de la cabaña ganadera en la región afectada, la estabulación en áreas abiertas, el método intensivo de cría , el aumento del número de abortos y la proximidad de la población a las granjas animales (aumento de casos si la distancia era < 5 Km) y *ix)* el control de la epidemia mediante diferentes medidas como la declaración obligatoria de abortos en animales, la implementación de las medidas de limpieza, la investigación de genoma de *Coxiella burnetii* en los depósitos de leche y la vacunación, inicialmente voluntaria y posteriormente obligatoria de los animales.

Debido a la proximidad geográfica con Holanda, se realizó un estudio clínico y serológico en esas fechas en 69 trabajadores que manipulaban lana y pelo de animales en *Bélgica* (145). De ellos, el 50,7% presentaban evidencia serológica de contacto; 26/69 datos de infección pasada, 8/69 de infección reciente y 1/69 de infección crónica.

Se han publicado dos artículos de revisión importantes acerca de la incidencia de fiebre Q en *Alemania* que resumen las características de esta enfermedad desde 1947-1999 (146) y de 1982-2010 (138). Los datos más destacables son: *i)* La identificación de 49 brotes con un número variable de personas afectas entre 1947-2010. *ii)* El aumento progresivo de casos en el periodo de tiempo mencionado. *iii)* Las diferencias geográficas, siendo la incidencia menor en el norte del país y máxima en el sur, especialmente en Baden-Württemberg, Hesse y Baviera y *iv)* el cambio estacional, desplazándose el mayor número de casos del periodo invierno-primavera a la temporada primavera-verano.

En Europa del Este, se han descrito brotes de fiebre Q especialmente en *Bulgaria* (136). En este país se han descrito entre 1982 y 2010, seis brotes caracterizados por un numero elevado de casos (desde 121 a más de 1.000 casos). Todos ellos se localizan en 5 distritos (Sofia, Lovech, Pazerdjik, Veliko y Vraza) situados en la zona central y norte del país.

Finalmente, aunque se han demostrado casos de fiebre Q en las islas británicas, la incidencia de la enfermedad es estable y baja (en torno a 0.15 a 0.35 casos por 100.000 habitantes) y no presenta características diferenciales. Específicamente existen datos acerca de esta entidad en *Inglatera* (147), *Escocia* (148), *Gales* (149) e *Irlanda del Norte* (150).

1.2.3.5.2.2. África

La información acerca de la infección humana por *Coxiella burnetii* en África es fragmentaria (151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161). La mayor parte de las publicaciones evalúan la seroprevalencia de la infección en zonas concretas y sólo escasos trabajos estudian la participación de *Coxiella burnetii* en enfermos. Como se muestra en la **figura 13**, la mayor parte de los estudios han sido realizados en África del Norte y del Oeste.

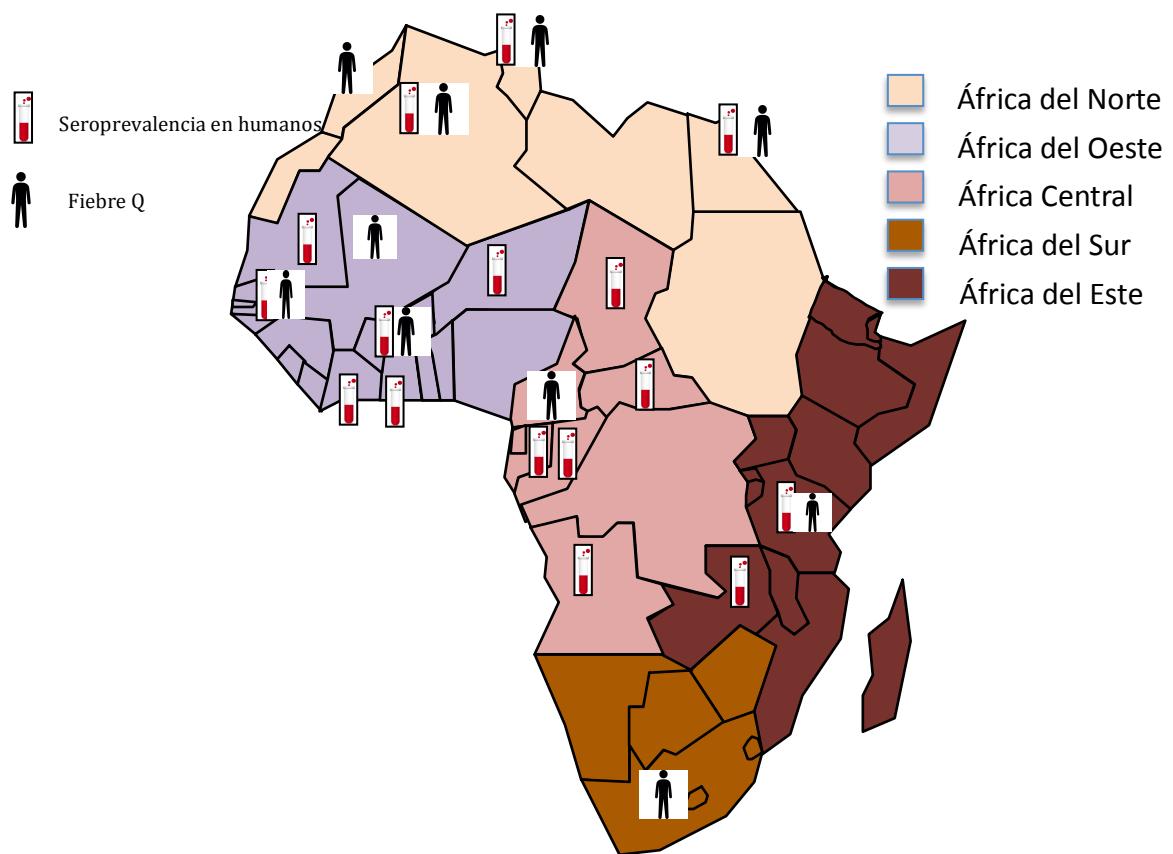


Figura 13: Estudios de infección por *C. burnetii* en humanos (África)

En la **tabla X** se indican los datos relevantes en los países señalados

Región	País/Referencia	Prevalencia	Observaciones
África del Norte	Argelia (Ref 158,160)	7,5 (Urbanos) 35,5% (Rurales)	Seroprevalencia
		0,3%	Síndrome febril
		3%	Endocarditis
	Túnez (Ref. 152,160,161)	26%	Seroprevalencia
		0-9%	Síndrome febril
		1-3%	Endocarditis
	Egipto (Ref. 157,160)	32%	Seroprevalencia
		0%	Neumonía
África del Oeste	Mauritania (Ref 153)	33%	Seroprevalencia
	Senegal (Ref 159)	3,7% (Región de Diop) 24,8% (Región de Dielmo)	Seroprevalencia
		2,5%	Síndrome febril
	Burkina Fasso (Ref 160)	8%	Seroprevalencia
		5%	Síndrome febril
	Costa de Marfil (Ref 160)	5%	Seroprevalencia
	Ghana (Ref 156, 160)	16,9% Niños 8,9% Adultos	Seroprevalencia
	Costa de Marfil (Ref 160)	5%	Seroprevalencia
	Niger (Ref 160)	10%	Seroprevalencia
	Mali (Ref 155, 161)	0-9,5%	Síndrome febril
		24%	Seroprevalencia
África Central	Chad (Ref 160)	1%	Seroprevalencia
	Camerún (Ref 160)	6-9%	Neumonía
	Gabón (Ref 161)	0%	Síndrome febril
	R. Central Africana (Ref 151)	9,1%	Seroprevalencia
	Congo (Ref 151)	1%	Seroprevalencia
	Angola (Ref 151)	1,8%	Seroprevalencia
África del Sur	Sudáfrica (Ref 160)	0%	Neumonía
África del Este	Zambia (Ref 154)	8,2%	Seroprevalencia
	Tanzania (Ref 160)	5%	Seroprevalencia
		5%	Síndrome febril

Tabla X: Estudios de infección por *C. burnetii* en humanos (África)

1.2.3.5.2.3. América

Se ha documentado infección humana por *Coxiella burnetii* en las Américas.

En *América del Norte* se han descrito casos en Greenland (políticamente dependiente de Dinamarca) (162), Canadá (Alberta y Nueva Escocia) (51,163), U.S.A (164,165) y México (166). El número de casos notificados es muy escaso en todos los países mencionados.

Existen muy pocos datos de la incidencia de fiebre Q en *América Central*, aunque se ha estudiado la prevalencia de infección de *Coxiella burnetii* en la zona peninsular (Panamá) (**167**) y en el Caribe (**168**) siendo de 9,4% y 2,3% respectivamente.

En *América del Sur* la infección por *Coxiella burnetii* (específicamente el genotipo 17) es responsable de hasta el 24% de las neumonías adquiridas en la comunidad en la Guayana Francesa (**169,170**). Por el contrario, la principal manifestación de la infección por *C. burnetii* en Ecuador es la fiebre sin foco aparente (**171**). En Brasil se han descrito casos con ambas formas clínicas de la enfermedad (**172 ,173**). Finalmente, en Uruguay se ha descrito un número importante de brotes de fiebre Q (**174**).

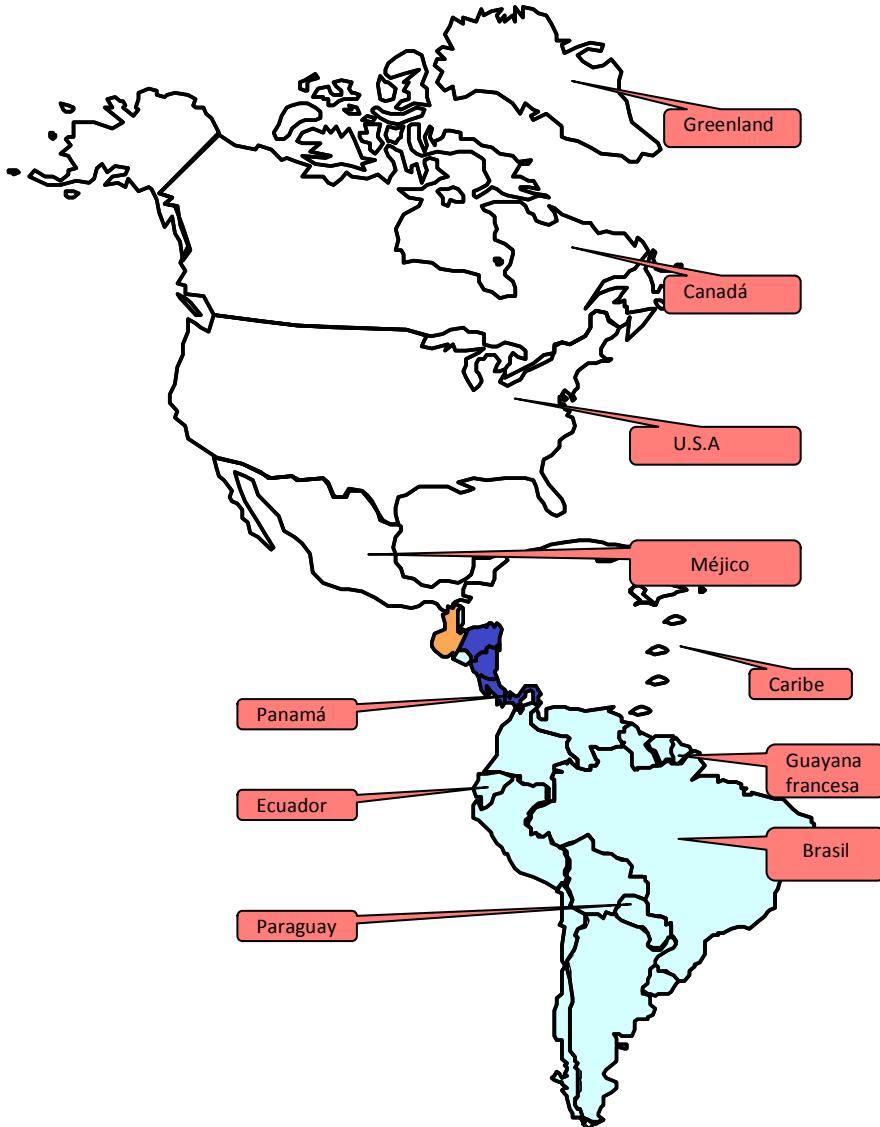


Figura 14: Estudios de infección por *C. burnetii* en humanos (América)

1.2.3.5.2.4. Asia

Con excepción de Asia Central se ha descrito la infección en todas las regiones de este continente (**figura 15**).

Así, en *Asia Occidental* se han descrito brotes rurales y urbanos de fiebre Q en Israel, (175,176,177), en Turquía (zona del Mar Negro) (178), Arabia Saudita (179) y Omán (180). La manifestación clínica predominante en esta región es la fiebre de duración intermedia.

También la fiebre Q está bien descrita en *Asia Oriental*. Así, recientemente se ha publicado una revisión de 29 publicaciones en China, siendo la prevalencia en humanos

del 10%, en bovinos del 15% y en caprinos del 12% (181). Tiene interés señalar que en este país se ha observado una alta prevalencia de infección por *C. burnetii* en ratones. También se han descrito casos de fiebre Q en Hong Kong (182) y Taiwan (183,184,185). Por otro lado, en una revisión actual se recogen los casos de fiebre Q en Japón en los últimos años (186). En este trabajo se señalan dos datos diferenciales con otras series: el mayor número de casos en edad pediátrica y la importancia de los gatos en el ciclo biológico.

Finalmente también se han descrito casos de fiebre Q en *Asia del Sur y Sudeste Asiático*, específicamente en Irán, India, Sri Lanka y Tailandia (187,188,189,190,191).

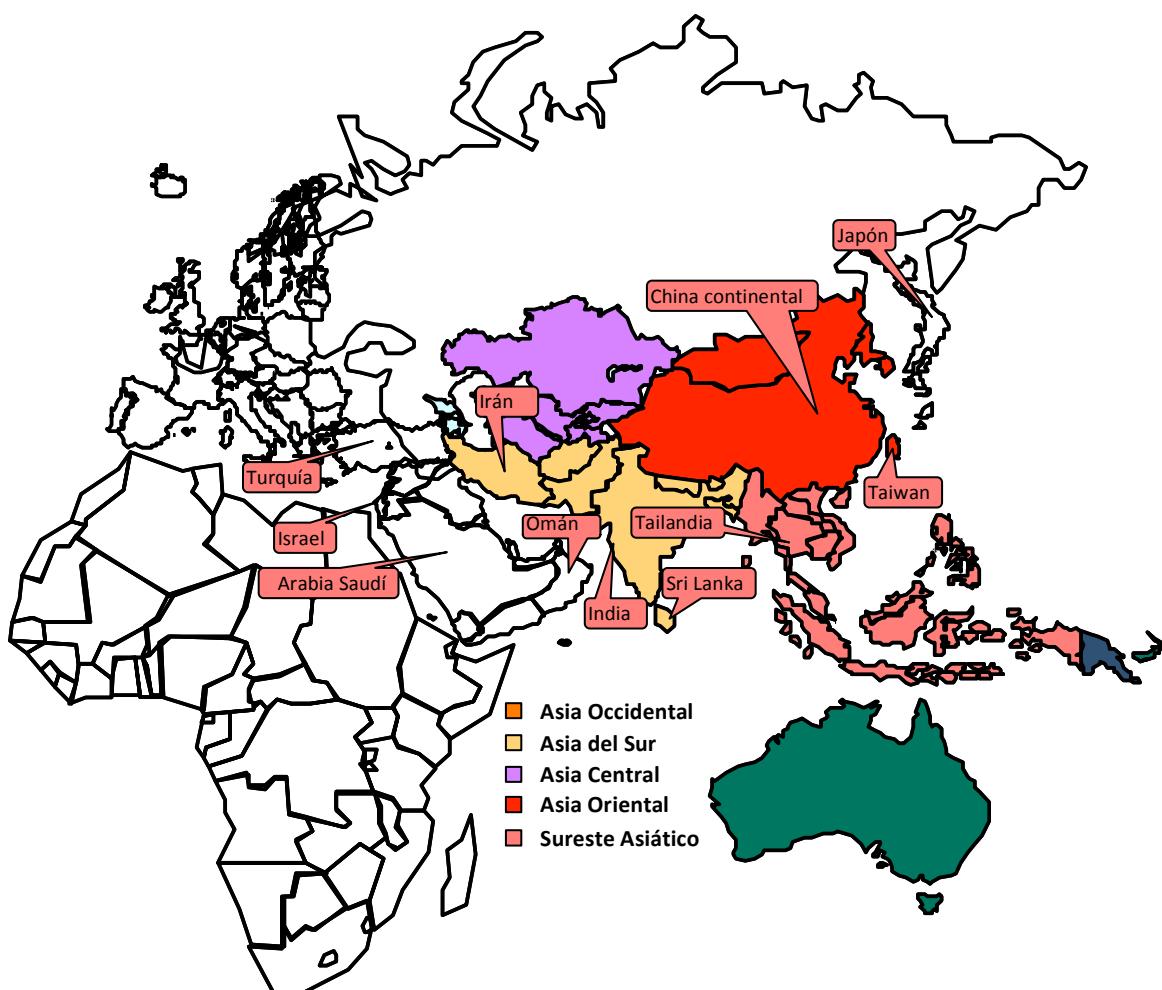


Figura 15: Estudios de infección por *C. burnetii* en humanos (Asia)

1.2.3.5.2.5. Oceanía

La incidencia actual de fiebre Q en Australia es baja debido a tres factores: la vacunación, la falta de interés en el diagnóstico y limitaciones diagnósticas (**20**).

1.2.3.6. Resumen de las características epidemiológicas de la infección por *Coxiella burnetii*.

El análisis de todos los datos referidos en la literatura acerca de la infección por *Coxiella burnetii* permite realizar varias generalizaciones:

(i) Existe un importante **sesgo en la identificación** de casos de infección por *Coxiella burnetii*, tanto en España como en el resto del Mundo. A modo de ejemplo, existen regiones en las que no se han publicado casos clínicos y la prevalencia de infección y viceversa. Por otro lado, el número de casos clínicos publicados en determinadas zonas geográficas es mucho menor que los detectados en laboratorios de referencia.

(ii) La infección por *Coxiella burnetii* presenta un **patrón epidemiológico similar a otras enfermedades infecciosas intracelulares** (p. ej. tuberculosis), de tal forma que del contacto con el microorganismo no siempre deriva la infección y, por otro lado, no todos los casos de infección se manifiestan clínicamente (enfermedad). Finalmente la enfermedad puede manifestarse de forma aguda o crónica, dependiendo principalmente de las características del hospedador.

(iii) En general, la fiebre Q es una enfermedad que afecta predominantemente a adultos en **edad** media de la vida. No obstante, también se describen casos en niños y ancianos dependiendo de las series estudiadas. Entre los factores implicados se han descrito las modificaciones hormonales que tienen lugar tras la pubertad, el riesgo de exposición ambiental y determinadas regiones geográficas (**23,186**). En algunos estudios se ha observado que La media de edad fue significativamente menor en pacientes con hepatitis y significativamente mayor en pacientes con afectación pulmonar.

(iv) Con algunas excepciones, las diversas series de fiebre Q muestran un claro predominio en el **sexo** masculino. Este hecho se ha interpretado por el papel protector del 17-β-estradiol en la expresión clínica de la infección (**192,193**).

(v) Existe una **distribución interanual y estacional** variable de la fiebre Q dependiendo de los países y dentro de las diferentes regiones de cada país. De forma general, predomina en primavera y verano, lo que se ha relacionado con la exposición ambiental, aunque en otras series se observa un mayor número de casos en otoño o invierno.

(v) Clásicamente la fiebre Q se ha considerado una enfermedad que predomina en **ámbito rural** y en personas en **contacto con animales** (principalmente ganado vacuno y caprino). No obstante, y dependiendo de las series, un número importante de casos aparecen en zonas urbanas, sin contacto con rumiantes o relacionadas con contacto con otro tipo de animales (gatos, ratones).

1.2.4. Patogenia y Fisiopatología

En los últimos años se han publicado múltiples artículos acerca de la patogenia y fisiopatología de la fiebre Q tanto en forma de revisiones (**193,194,195,196,197,198,199**), como en estudios realizados en animales de experimentación (**198,199,200**), datos histopatológicos en enfermos (**203,204,205,206,207**), estudios en cultivos celulares (**208-216**) y medida de citocinas circulantes y estudio fenotípico de las células inmunes circulantes (**222,223,224**). Inicialmente se revisaran los datos concretos y posteriormente se integrarán en una aproximación patogénica.

1.2.4.1. Estudios en animales de experimentación

Existen diferentes modelos animales de fiebre Q atendiendo a la especie, vía de administración de *Coxiella burnetii* y otros factores (p. e. inmunosupresión, modificación genética), cada uno de los cuales ha aportado información relevante.

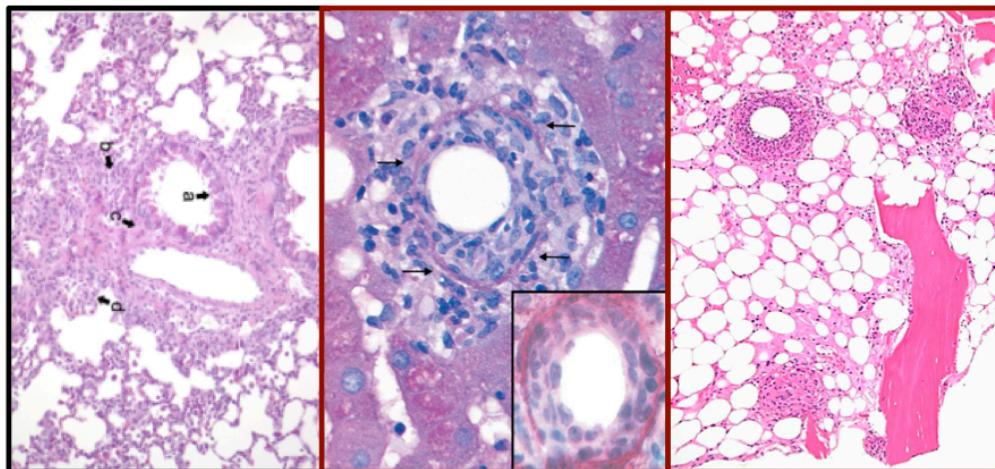
Así, varias especies singénicas de **ratón** (particularmente As/J y BALBc) son susceptibles a *Coxiella burnetii* tanto por vía inhalatoria como intraperitoneal (**200, 201,202,203**). De hecho, en estas especies se ha establecido el papel protector del 17 β -estradiol en esta enfermedad. También estas especies se han utilizado en otros modelos de fiebre Q; en concreto ratonas BALB/c embarazadas o ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida que desarrollan cuadros de endocarditis. Por otro lado, existen varios modelos murinos que aclaran aspectos importantes de la patogenia de la fiebre Q, como las cepas SCID (*severe combined immunodeficiency*) y el desarrollo de endocarditis con calcificación focal muy similar a la humana, los ratones que sobreexpresan IL-10 con disminución de formación de granulomas y acumulación de *Coxiella burnetii* en los tejidos, o ratones knockout para TLR-2 o IFN- γ , que presentan una respuesta febril a *Coxiella burnetii* fase II. Finalmente la manipulación de los subtipos de linfocitos B, CD4 y CD8 en ratones SCID o *wild-type* ha permitido establecer el papel de estas estirpes celulares en la patogenia de la fiebre Q.

Otro tipo de micromamífero empleado en estudios experimentales es el **cobaya** (200). Tanto por vía intraperitoneal como por vía inhalatoria, la infección por *Coxiella burnetti* son muy similares a la infección en humanos. Además, la lesión previa de las válvulas aórticas a la infección por *Coxiella burnetii* desencadena una endocarditis, aunque con características más agudas.

Aunque no se han realizado muchos estudios, el modelo de fiebre Q más similar al humano es el descrito en primates, especialmente en **macacos** (*M. fascicularis* y *M. mulatta*) lo que constituye un dato importante en el desarrollo de vacunas (203).

1.2.4.2. Estudios histopatológicos en humanos

En la fiebre Q aguda se describen dos tipos de afectación histopatológica dependiendo del órgano afecto e independientemente de la especie animal (66, 204,205,206,207,208,209,210). Así, en **pulmón** (fig 16a), los hallazgos más importantes son (a) la hipertrofia epitelial de los bronquiolos, (b) la presencia de edema , (c) la “bronquiolización” del epitelio alveolar y (d) la aparición de infiltrados inflamatorios por células redondas (linfocitos, macrófagos) y plasmáticas. Es inhabitual la presencia de granulomas en pulmón. Sin embargo, en **hígado** (fig 16b), **médula ósea** (fig 16c) y **piel**, la afectación más característica es la presencia de granulomas, que en su forma más característica aunque no patognomónica, adoptan una estructura denominada “en doughnut”. El dato característico es una vacuola lipídica central, con o sin leucocitos polimorfonucleares, rodeada de una empalizada de células mononucleares. La formación de granulomas bien estructurados se asocia a una resolución rápida de la infección.



a) Pulmón (ref 202)

b) Hígado (ref 66)

c) Médula ósea (ref 208)

Figura 16: Histopatología de la fiebre Q aguda

Por otro lado, los datos característicos de la **fiebre Q crónica** son la fibrosis valvular, asociada a calcificaciones, vegetaciones de pequeño tamaño e infiltrados de células mononucleares sin formación de granulomas (**figura 17**).

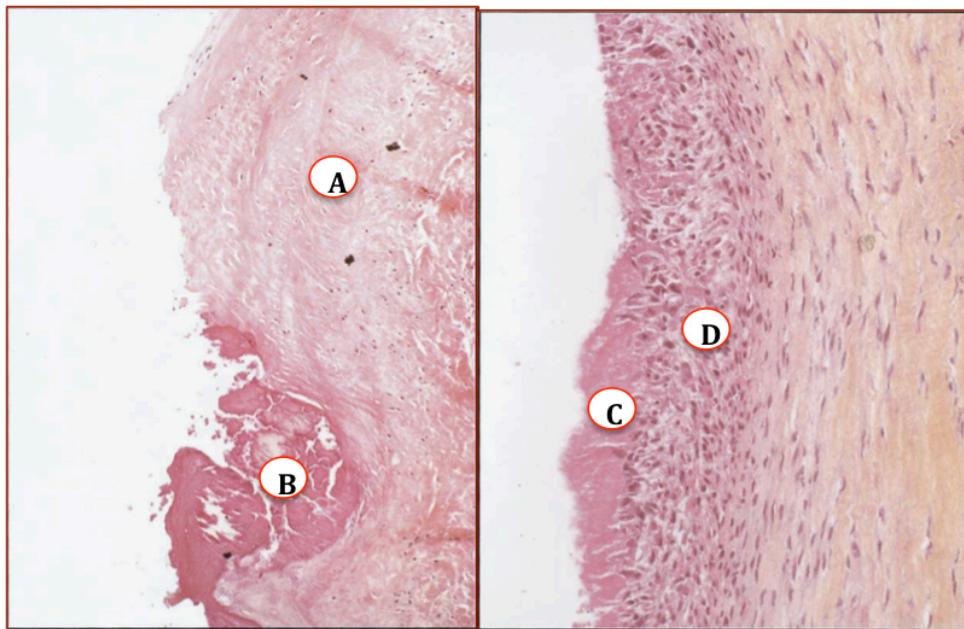


Figura 17: Histopatología de la fiebre Q crónica

a. Fibrosis valvular. b. Calcificación. c. Vegetación. d. Infiltrado mononuclear. Tomado de referencia 208

1.2.4.3. Estudios en cultivos celulares

En la **tabla XI** se indican varios estudios recientes realizados en cultivos de células del sistema mononuclear-fagocítico acerca de aspectos clave en la patogenia de la fiebre Q.

Ref	Año/Autor	Resultados
210	2003/Tyczka	Papel de la respuesta Th 2 en la fiebre Q en ovinos.
211	2003/Ghigo	Efecto positivo de IL-4 sobre replicación de <i>Coxiella burnetii</i> en monocitos.
212	2003/Honstettre	Diferente patrón de producción de citocinas en la forma aguda (hepática o pulmonar) y crónica de fiebre Q
213	2004/Zamboni	Importancia de TLR-2 en el control de la replicación de <i>Coxiella burnetii</i> en macrófagos.
214	2008/Benoit	Polarización de los macrófagos en la respuesta a <i>Coxiella burnetii</i> .
215	2008/Benoit	Papel de la fagocitosis de leucocitos apoptóticos en la polarización macrofágica durante la infección por <i>Coxiella burnetii</i> .
216	2010/Vazquez	Importancia de la inhibición de la apoptosis por <i>Coxiella burnetii</i> a través de la disminución de beclina
217	2014/Faugaret	La formación de granulomas inducidos por <i>Coxiella burnetii</i> es un factor protector de la evolución de la enfermedad mediado por la polarización M1
218	2015/Conti	En la replicación intracelular de <i>Coxiella burnetii</i> es clave la alteración de la asociación de TLR-2 y TLR-4
219	2015/ Ammerdorffer	TLR-10 tiene efecto inhibitorio sobre la producción de citocinas en macrófagos infectados por algunas cepas de <i>Coxiella burnetii</i> .
220	2015/ Ammerdorffer	Los polimorfismos de TLR-1, TLR6 y NOD modulan la producción de citocinas en macrófagos infectados por algunas cepas de <i>Coxiella burnetii</i> .
221	2015/ Schoffelen	Los polimorfismos de TLR-1, TLR6 y MyD88 se asocian a la predisposición de desarrollar fiebre Q crónica

Tabla XI. Estudios en cultivos celulares de *Coxiella burnetii*

1.2.4.4. Estudios de citocinas y células mononucleares circulantes

En estudios realizados sobre citocinas circulantes se ha observado un aumento de citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF α) en las formas agudas y un aumento de IL-10 en las formas crónicas (222). Por otro lado, en las formas agudas no existe una asociación entre los polimorfismos de TLR-2 y TLR-4 con la gravedad o curso de la enfermedad (223).

Finalmente, en las formas crónicas, se ha observado un aumento de linfocitos T reguladores (CD4+CD25+FoxP3) circulantes en pacientes con fiebre Q crónica (223).

1.2.4.5. Integración de los aspectos patogénicos y fisiopatológicos de la fiebre Q

Aunque existen múltiples aspectos sin aclarar en la patogenia y fisiopatología de la fiebre Q, se puede establecer un esquema tentativo de los fenómenos que tienen lugar tras la entrada en el ser humano de *Coxiella burnetii*.

a. **Entrada del microorganismo.** Como se ha indicado en apartados previos, la vía fundamental de penetración en el ser humano de *Coxiella burnetii* es el aparato respiratorio. El tamaño del microorganismo y sus características estructurales permiten el acceso directo a la región alveolar (de hecho, los estudios de detección en vías respiratorias altas en pacientes con fiebre Q han sido infructuosos). En la región alveolar las células principales con las que se produce la interacción de *C. burnetti* son los macrófagos.

b. **Penetración en los macrófagos alveolares (figura 18).** La entrada en las células macrofágicas es diferente en el caso de las formas virulentas (fase I) y avirulentas (fase II). En las formas virulentas es mediada por integrinas ($\alpha V\beta 3$) y moléculas de reconocimiento de patrones (principalmente TLR-2 y TLR4, aunque también desempeñan un papel importante TLR1, TLR6 y NOD) mientras que las formas avirulentas requieren integrinas ($\alpha V\beta 3$) y receptor del complemento tipo 3 (CR3), sin necesidad de empleo de moléculas de reconocimiento de patrones. La internalización de formas avirulentas es más eficiente que la de bacterias en fase I, lo que explica la menor rapidez de proliferación intracelular de estas.

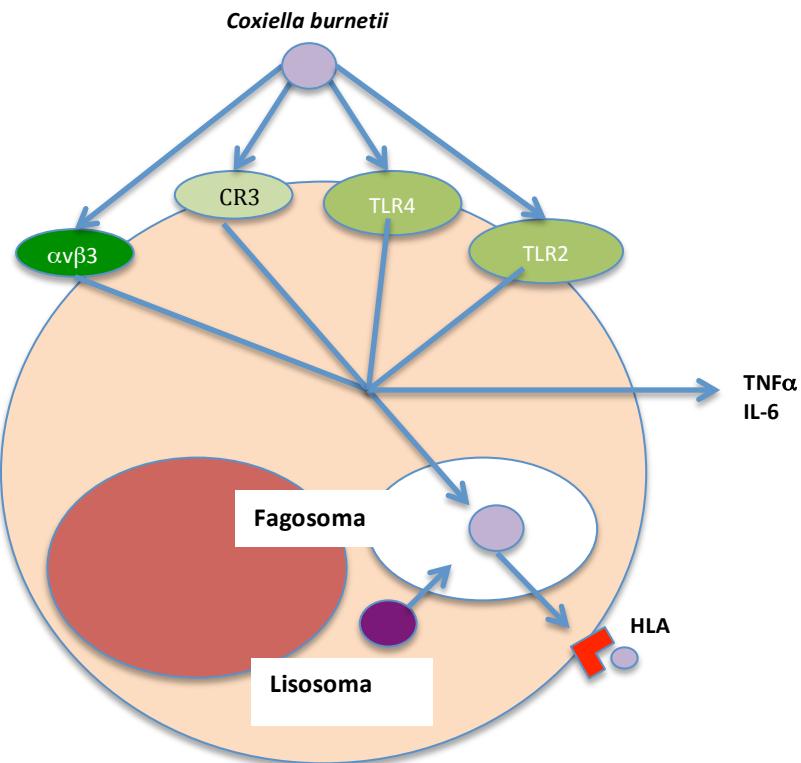


Figura 18. Entrada de *Coxiella burnetii* en los macrófagos alveolares

c. **Fases iniciales en el destino intracelular en los macrófagos.** La captación de las bacterias en fase I promueve a través de las integrinas y de la asociación TLR2-TLR4 una reorganización del citoesqueleto, que se traduce morfológicamente en la formación de “ruffles” (arrugas, frunces) en la membrana plasmática y en la activación de p38 α -MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Entre otros, la activación de esta enzima inhibe la apoptosis macrofágica, disminuyendo los niveles y/o afinidad de la beclina, y facilita la supervivencia bacteriana. Sin embargo, la internalización de las formas avirulentas, no induce estos fenómenos y, por ello dificulta la proliferación bacteriana.

d. **Formación de la vacuola parasitofónica y evolución de los endosomas.** Tanto las cepas virulentas como avirulentas se encuentran inicialmente en el interior de los macrófagos en endosomas iniciales. Posteriormente adquieren proteínas del hospedador (LAMP1, M6PR y V-ATPasa) y del propio microorganismo que permiten una acidificación del fagosoma y facilitan la captación de nutrientes. Sin embargo, en el caso de microorganismos virulentos, no se produce la incorporación de lisosomas (ricos en catepsina D) por lo que la destrucción del microorganismo es limitada. Por el contrario,

los organismos avirulentos, a través de la incorporación de la proteína adaptadora Rab7 permiten la fusión con lisosomas que, a través de la catépsina D, destruyen al microorganismo. Esta secuencia de fenómenos explica que los antígenos de fase II sean expresados precozmente cuando se produce el control de la infección, mientras que en formas crónicas, se expresen ambos tipos de antígenos. Morfológicamente, en las formas agudas de fiebre Q se forman endosomas de pequeño tamaño, mientras que en las formas crónicas, el volumen de los endosomas es mucho mayor.

e) **Evolución de la infección (figura 19).** La proliferación de *Coxiella burnetii* en los macrófagos infectados es muy lenta y las consecuencias de la misma van a depender tanto de los genotipos del microorganismo (ver apartados anteriores) como de la respuesta del hospedador. Los tres patrones característicos son la infección asintomática, la fiebre Q aguda y la fiebre Q crónica. En las *formas asintomáticas*, la respuesta del hospedador corresponde a una polarización macrofágica tipo M1, con destrucción del microorganismo, sin ocasionar manifestaciones clínicas, con desarrollo de una respuesta inmune muy eficaz. En las *formas agudas* se produce una polarización macrofágica tipo M2 “atípica” caracterizada por una destrucción más o menos precoz y más o menos completa del microorganismo, generándose al final una respuesta inmune eficaz. Esta respuesta es responsable de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Así, la hiperproducción de IL-6 explica la fiebre elevada de los pacientes y la generación de autoanticuerpos en algunos casos, mientras que la infiltración por células mononucleares, con o sin formación de granulomas es responsable de las manifestaciones tisulares (neumonía, hepatitis, citopenias, etc). Finalmente en las *formas crónicas*, la incapacidad del sistema inmune para la destrucción del microorganismo con una polarización M2 clásica, lleva a su persistencia y a la generación de una inflamación crónica responsable de las lesiones. La fagocitosis de leucocitos apoptóticos en pacientes con valvulopatías, la inmunosupresión (embarazo, inmunodeficiencias) llevan a la producción de IL-10, por macrófagos y linfocitos T reguladores responsables de la persistencia del microorganismo.

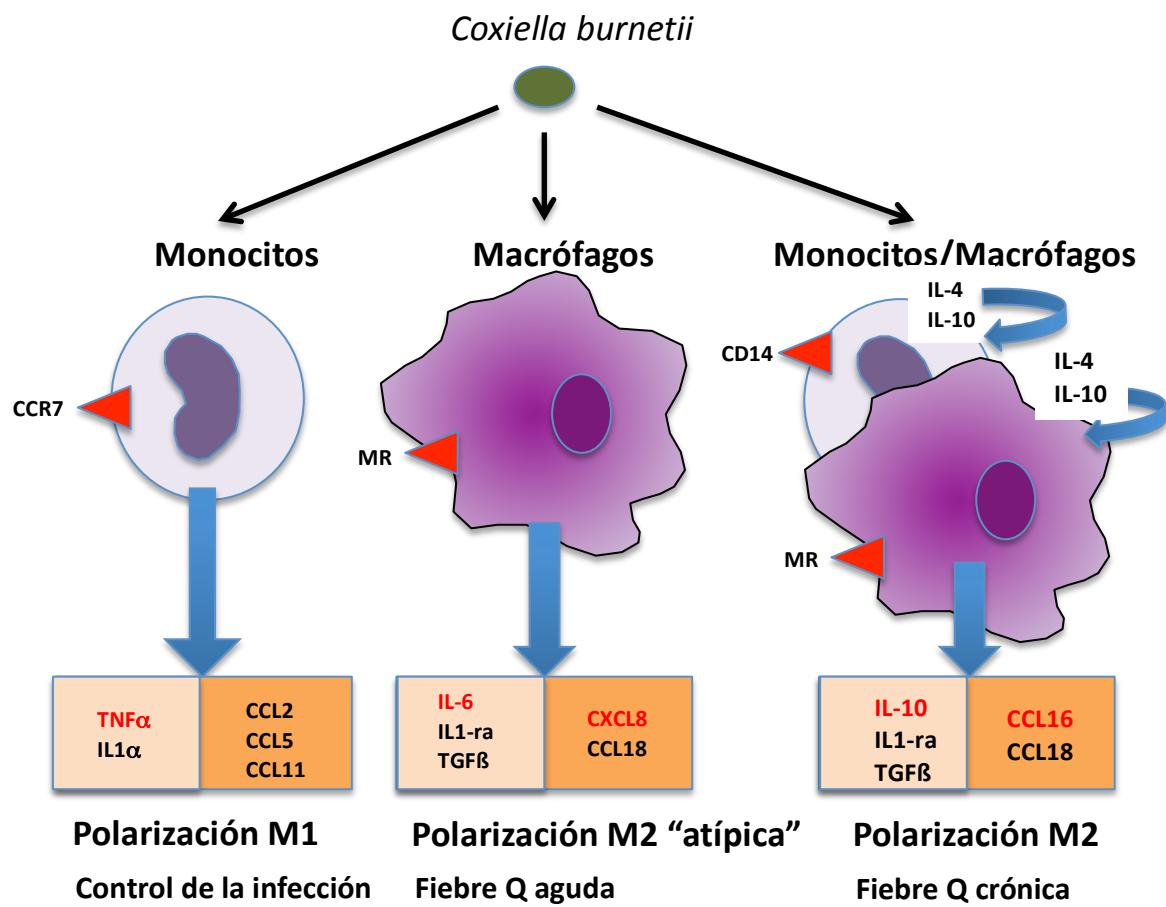


Figura 19. Relación entre la patogenia y la evolución de la infección.

1.2.5. Manifestaciones clínicas y datos de laboratorio

La interacción entre *Coxiella burnetii* y el ser humano presenta un perfil evolutivo muy variable y, debido al de su espectro clínico, por lo que debe entrar a formar parte del diagnóstico diferencial de un gran número de síndromes infecciosos.

Aproximadamente un 60% de los casos de fiebre Q son asintomáticos. Cuando aparecen manifestaciones clínicas, estas pueden ser agudas o crónicas. En el 40% de los pacientes sintomáticos, la mayoría se manifestará como una enfermedad leve sin necesidad de hospitalización. Los pacientes hospitalizados representan sólo el 2% de los individuos infectados, y el 10% de ellos (0.2%) padecerán una fiebre Q crónica (**138**). En Francia, la incidencia de fiebre Q es de 50 casos/100.000 habitantes y la incidencia de endocarditis por fiebre Q es de 1/1.000.000 habitantes (**25**). En el año 2009, en la epidemia producida en Holanda, la incidencia fue de 69 casos /100.000 habitantes en las

zonas de mas cercanas a la granja afectada y de 6 casos /100.000 en aquellos que vivían en un radio superior a los 5 Km de dicha granja (**225**).

1.2.5.1. Infección aguda.

Manifestaciones clínicas frecuentes

El periodo de incubación es de 20 días aproximadamente, con un rango de 14 a 39 días, dependiendo del inóculo bacteriano. En pacientes sintomáticos el comienzo suele ser abrupto, con fiebre alta, astenia, escalofríos y cefalea. La manifestación clínica mas frecuente probablemente sea una enfermedad febril autolimitada asociada a cefalea intensa. No existe una forma típica de fiebre Q aguda, siendo sus manifestaciones muy diferentes en cada paciente. Existen tres patrones característicos que pueden aparecer tanto de forma aislada como combinada.

Fiebre prolongada. En pacientes con fiebre Q aguda la temperatura corporal oscila entre 39 y 40 °C, y generalmente permanece elevada todo el día. El patrón característico es una elevación rápida de la temperatura que alcanza una meseta en 2 a 4 días, disminuyendo después de 5 a 14 días a la normalidad. Sin embargo, en pacientes sin tratamiento, la fiebre puede durar de hasta 57 días. Por ello, la fiebre Q es una causa de fiebre prolongada de etiología desconocida (**10,11,12,13,101**). En aproximadamente una cuarta parte de los pacientes con fiebre Q aguda presentan una fiebre bifásica, con una primera fase similar a la descrita y una segunda caracterizada por la reaparición de la fiebre, usualmente a niveles bajos e intermitentes que dura de 1 a 19 días. La fiebre parece ser mas prolongada en pacientes ancianos, durando mas de 40 días en el 60% de los mayores de 40 años, y en el 29% de los menores de esta edad.

Neumonía atípica. Es una de las formas características de la fiebre Q aguda en Nueva Escocia, Canadá, en el País Vasco y en Suiza (**225,226,227**). El cuadro clínico habitual se caracteriza por fiebre, tos no productiva (24 al 90%), cefalea intensa y mialgias. La auscultación pulmonar es frecuentemente normal y es excepcional la presencia de esplenomegalia (5%). Otras manifestaciones menos frecuentes son el dolor torácico, las alteraciones digestivas (náuseas, vomitos, diarrea), odinofagia y exantema.

Los datos radiológicos son muy variados (patrón reticular, atelectasias, derrame pleural), siendo el más característico, aunque infrecuente la neumonía “redonda” (**figura 22**).

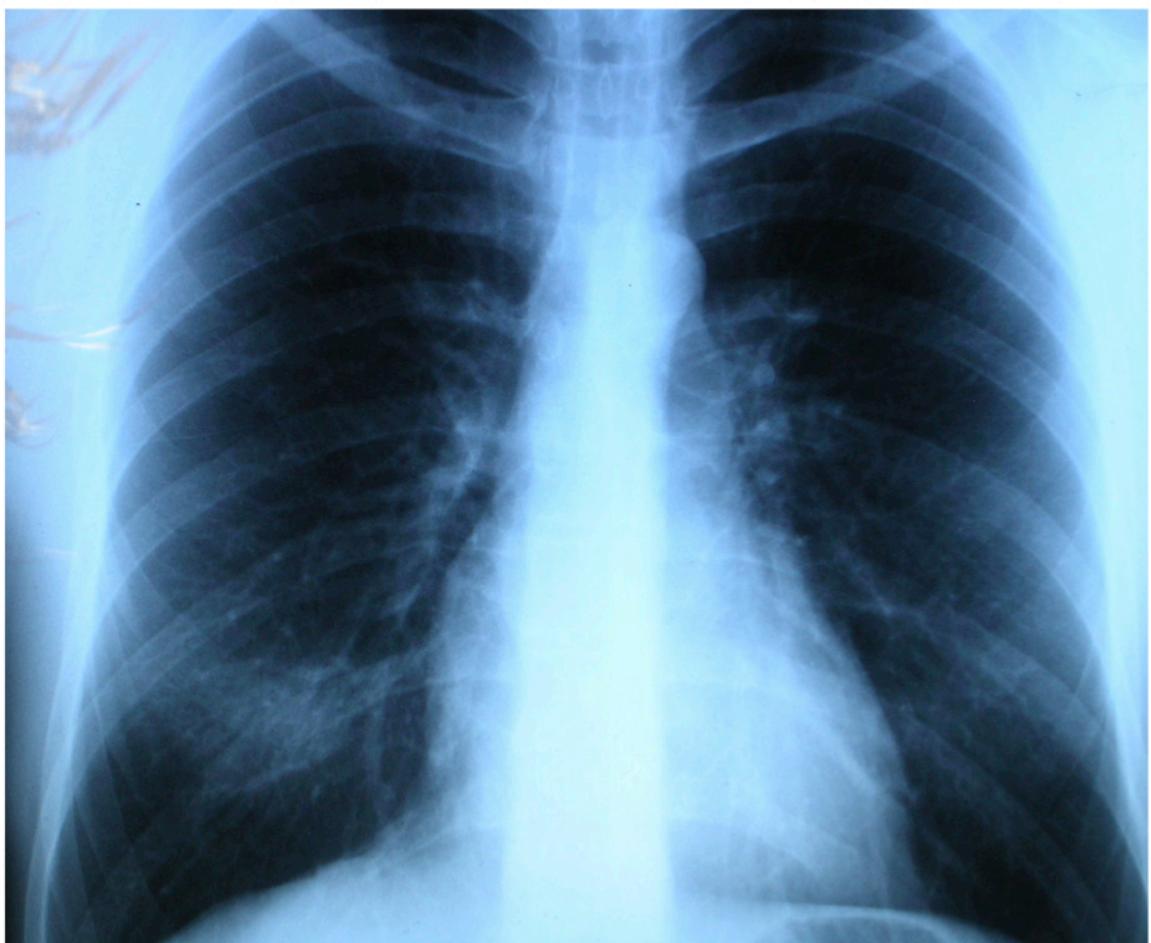


Figura 20: Neumonía “redonda” en un paciente con fiebre Q (Cortesía de JLPA)

Existen otras dos presentaciones de neumonía en la fiebre Q: la forma rápidamente progresiva, que imita a la enfermedad por *Legionella pneumophila* y la forma subclínica que se presenta con fiebre y ausencia de síntomas pulmonares en presencia de datos radiológicos patológicos.

La duración de los síntomas oscila entre 10 y 90 días, siendo la tasa de mortalidad inferior al 3%. Las muertes relacionadas con las formas respiratorias de fiebre Q aparecen habitualmente en paciente con enfermedad pulmonar o cardiaca previa.

Hepatitis. Esta forma clínica suele acompañarse de fiebre y, raramente por dolor abdominal, náuseas, vómitos o diarrea. Aunque de forma excepcional se han descrito casos de ictericia progresiva, hepatomegalia e insuficiencia hepatocelular grave. Los datos más característicos son la elevación de enzimas de citolisis (GOT y GPT) y colestasis (GGT y fosfatasa alcalina). Aunque no es precisa su realización en la mayor parte de los casos, si se realiza una biopsia hepática, los datos habituales encontrados, como se indicó previamente, son los de una hepatitis granulomatosa.

Otras manifestaciones

En la forma aguda de fiebre Q pueden afectarse prácticamente todos los órganos y tejidos, aunque su incidencia es baja (menor del 1%). Tiene interés señalar algunos aspectos especiales. Por un lado, la *afectación cardíaca* en la fase aguda, a diferencia de la forma crónica, afecta principalmente al miocardio y/o al pericardio. La miocarditis aguda se manifiesta por arritmias o fallo ventricular, que pueden ocasionar la muerte. La pericarditis aguda suele asociarse a otras serositis (p. ej. pericarditis). Las *manifestaciones neurológicas* son muy diversas , en forma de encefalitis, meningitis linfocitaria, mielitis, síndrome de Guillain-Barré o afectación extrapiramidal (**228**). La *afectación cutánea* es rara en la fiebre Q, a diferencia de las rickettiosis. Además, cuando aparece se relaciona principalmente con los fenómenos inmunológicos asociados, mas que con la afectación directa por *Coxiella burnetii* (eritema nudoso, urticaria, pitiriasis rosada de Gibert) (**figura 21**). Las principales alteraciones de los *órganos linfáticos* son las adenopatías mediastínicas (excepcionales) y las alteraciones esplénicas (p. ej. infarto) (**figura 22**). En el *sistema genitourinario* se han descrito casos de epididimiis, orquitis, priapismo y glomerulonefritis (relacionadas con los fenómenos inmunológicos previamente descritos). Las principales *alteraciones endocrinas* que han sido descritas en la fiebre Q son la tiroiditis y el síndrome de secreción inadecuada de ADH. Finalmente, se han descrito casos de lesión oftalmológica en forma de neuritis óptica.

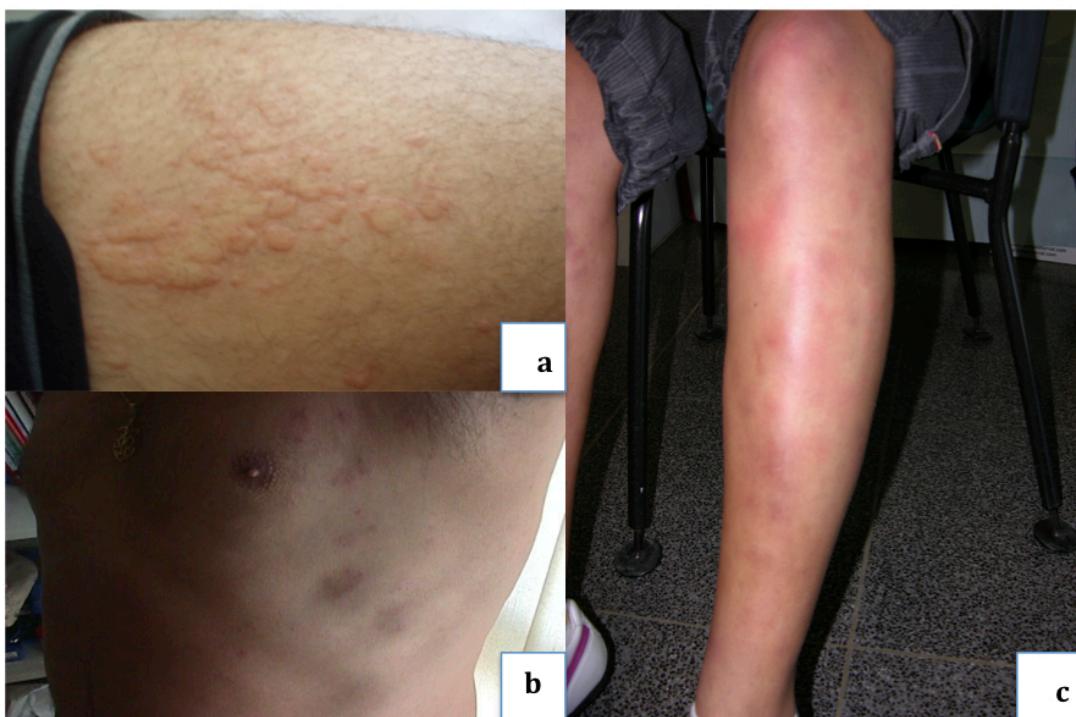


Figura 21: Lesiones cutáneas en pacientes con fiebre Q (Cortesía de JLPA)

a. Urticaria; b. Pitiriasis rosada de Gibert; c. Eritema nudoso



Figura 22: Infarto esplénico en un paciente con fiebre Q (Cortesía de JLPA)

Hallazgos biológicos.

En el hemograma, la mayor parte de pacientes presentan datos normales. Ocasionalmente se observa anemia, que presenta las características de una anemia hemolítica. En el 90% de los casos el recuento leucocitario es normal, aunque se han descrito casos de leucocitosis (3-29%) y leucopenia. La trombopenia aparece en el 25 % de los casos en el momento inicial. La VSG está elevada en el 43-87% de los casos.

En el estudio de la hemostasia, el dato más característico, aunque no presente en todos los casos es el alargamiento del tiempo de tromboplastina parcial activada, debido a la presencia de anticuerpos anticardiolipina.

Además, es relativamente frecuente la presencia de autoanticuerpos (p. ej. anticardiolipina, antinucleares y anticuerpos contra el músculo liso).

1.2.5.2. Infección crónica

La fiebre Q crónica fue descrita inicialmente como aquella que persiste mas de seis meses después del comienzo. Ocurre en aproximadamente en el 5% de los pacientes infectados por *C. burnetii* y puede desarrollarse insidiosamente de meses a años después de la enfermedad aguda.

De forma característica, el corazón es el órgano más frecuentemente afectado, seguido de los vasos (y hueso. La endocarditis es la forma habitual de la fiebre Q crónica, y en los casos no tratados tiene una mortalidad de hasta el 60% (229) (tabla XII) . Aparece de forma habitual en pacientes con lesiones valvulares previas, inmunocomprometidos o embarazadas Clínicamente se presenta de forma subaguda como endocarditis con hemocultivos negativos. El diagnóstico es difícil, ya que los síntomas no son específicos, no se asocia con fiebre y las vegetaciones son pequeñas (nodulares y lisas) o están ausentes. Por ello, el diagnóstico suele ser tardío (12-24 meses). El embolismo arterial ocurre en un 20% de los pacientes. Debido a la falta de especificidad de los síntomas, el diagnóstico se suele retrasar de 12 a 24, lo que origina un incremento en la mortalidad. En pacientes con factores predisponentes, y presumiblemente en todos los pacientes con fiebre Q, es pertinente el estudio de los anticuerpos IgG frente a fase I y un ecocardiograma transtorácico. Asimismo, la detección de factores predisponentes

justifican la práctica de una ecocardiografía transesofágica y un PET (tomografía con emisión de positrones).

Otras manifestaciones de la fiebre Q crónica incluyen infecciones de aneurismas o injertos vasculares, osteoartritis y osteomielitis, derrame pericárdico, fibrosis pulmonar intersticial, amiloidosis y crioglobulinemia (**228**).

Criterio/s	
Definitivo (A)	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo positivo o PCR de la válvula cardíaca
Mayores (B)	<ul style="list-style-type: none"> • Microbiológicos (Cultivo positivo o PCR de la sangre, del embolo o serología con IgG frente a fase I $\geq 1/6.400$) • Evidencia de afectación endocárdica mediante ecocardiograma • PET-Scan que demuestre fijación valvular específica y aneurisma micótico.
Menores (C)	<ul style="list-style-type: none"> • Condición cardiaca predisponente • Temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ • Fenómenos vasculares (embolia arterial, infartos pulmonares sépticos, aneurismas micóticos, hemorragia intracranal, hemorragias subconjuntivales y lesiones de Janeway.) • Serología IgG frente a fase I $\geq 1/800$ y $\leq 1/6.400$.
Diagnóstico	
Definitivo	<ul style="list-style-type: none"> • Criterio A • 2 criterios del grupo B • 1 criterio del grupo B + 3 criterios del grupo C, incluyendo C1 y C4
Possible	<ul style="list-style-type: none"> • 1 criterio del grupo B + C1 y C4 • 3 criterios del grupo C (incluyendo C1 y C4)

Tabla XII: Criterios y Diagnóstico de endocarditis por fiebre Q

1.2.5.3. Situaciones especiales (embarazo)

Las características clínicas de la infección por *C. burnetii* en pacientes embarazadas o no embarazadas es similar. Sin embargo, presenta varios aspectos peculiares que debemos señalar: (*i*) La fiebre Q aguda puede reactivarse durante el embarazo o puede progresar a la cronicidad, (*ii*) El riesgo de desarrollar una fiebre Q crónica después de una

fiebre Q aguda es mucho mayor en embarazadas (229) y (iii) Las complicaciones obstétricas incluyen prematuridad, retraso en el crecimiento intrauterino, incremento de defectos congénitos, bajo peso al nacer, muerte fetal intraútero o aborto espontáneo (229,230). El pronóstico es peor si la infección ocurre en el primer trimestre del embarazo. La aparición de anticuerpos antifosfolípidos está asociada al aborto precoz, y también participa en las muertes fetales del primer trimestre (230).

1.2.6. Diagnóstico etiológico y seguimiento

1.2.6.1. Recogida y conservación de las muestras.

C. burnetii es un microorganismo muy contagioso, por ello se precisa de un laboratorio con un nivel 3 de bioseguridad y personal experimentado para manipular las muestras contaminadas y para el cultivo del microorganismo.

La detección directa de *C.burnetii* puede realizarse en múltiples muestras biológicas (sangre, líquido cefalorraquídeo, médula ósea, biopsia de válvulas cardíacas, aneurisma vascular o injerto, biopsia ósea, o muestras de biopsia hepática). En casos de aborto, se puede realizar de muestras de leche, placenta y muestras fetales. Además se puede realizar del sobrenadante de los cultivos celulares. La sangre debe ser recogida en EDTA o en citrato sódico, y la capa leucocitaria debe ser guardada para la amplificación. Las muestras sólidas deben congelarse a -80°C antes de analizarlas.

C. burnetii puede ser cultivada de la capa leucocitaria de sangre heparinizada (pero no si es recogida con EDTA o citrato sódico), sangre total, plasma, médula ósea, LCR, biopsia de válvula cardíaca, aneurisma o injerto vascular, biopsia ósea o hepática, y, en casos de aborto, de leche, placenta o muestras fetales.

Todas las muestras, excluyendo la sangre total, deben ser conservadas a -80°C y deben ser enviadas en hielo seco para el diagnóstico. La sangre total debe conservarse a 4°C (durante menos de 48 horas).

1.2.6.2. Diagnóstico directo.

1.2.6.2.1. Cultivo de *C. burnetii*.

El aislamiento de *C. burnetii* mediante cultivo se realiza en pocos laboratorios, debido al elevado riesgo de transmisión de la enfermedad en el personal que manipula las muestras y por la falta de sensibilidad de la técnica.

El microorganismo puede ser aislado tras la inoculación de las muestras en *cultivos celulares clásicos* [(células Vero- células de riñón de mono verde africano) y fibroblastos de pulmón embrionarios humanos- línea celular MRC-5)]. Otro sistema disponible es el *shell-vial*. Las muestras se inoculan en unos tubos que poseen en el fondo en un cubreobjetos, en el que ha crecido la línea celular. Para aumentar la rentabilidad se deben hacer dos o tres inoculaciones por cada muestra a procesar. Las muestras centrifugan durante una hora a 700 g y a 20ºC, para favorecer la penetración de la bacteria dentro de las células. Después de un período de incubación de 5 a 7 días en una atmósfera del 5% de CO₂ y tras su tinción, se detecta *C.burnetii* dentro de las células. El organismo aparece como un pequeño bacilo que no se tiñe con la tinción de Gram pero que son visibles después de hacer la tinción de Giemsa o Giménez. La identificación de *C. burnetii* dentro de las células se realiza mediante una inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-*C.burnetii* conjugados con isotiocianato de fluoresceína. Además el sobrenadante del *shell-vial* se puede amplificar mediante técnicas de PCR. Los mejores resultados se obtienen de muestras obtenidas previo al tratamiento antibiótico.

Otras formas de aislamiento se basan en la inoculación de la muestra en saco vitelino de huevos embrionados o en animales de laboratorio como el ratón o cobaya. Las muestras clínicas se inyectan intraperitonealmente en el cobaya que se sacrifican después de 5 a 8 días. Los extractos de bazo de los animales infectados son las muestras de mayor valor para el aislamiento de *C. burnetii*. En estos estudios, en presencia de *C. burnetii*, los huevos embrionarios mueren de 7 a 9 días tras la inoculación y los cobayas desarrollan fiebre de 5 a 8 días tras la inoculación intraperitoneal. Estas técnicas son mas laboriosas que los cultivos celulares y existe un alto riesgo de contaminación cruzada entre los

animales infectados y los no infectados. Sin embargo, el modelo animal en el cobaya continua siendo útil para el aislamiento de *C. burnetii* de muestras contaminadas con otras bacterias.

1.2.6.2.2. Amplificación de material genético.

El elemento de insercion *IS1111* es la secuencia diana más usada para la detección del DNA de *Coxiella burnetii* (**231**). Se suelen emplear otros genes como *icd*, *com1* o *sod* para garantizar la cuantificación y para evitar la detección de casos falsos positivos. Se han realizado varios estudios para estudiar la rentabilidad de las diversas técnicas. Así, Fournier et al (**232**) realizó una PCR en suero, que amplifica el elemento asociado a *htp AB* usando una nested PCR en una epidemia en Chamonix. De los 100 pacientes estudiados, la detección de genoma de *Coxiella burnetii* fue positiva en el 18% de los pacientes. Sin embargo, estudiando sólo los pacientes con serología inicial negativa, fue positiva en el 26% de los pacientes. En otro estudio realizado en Holanda (**233**) en el que emplearon una PCR a tiempo real casera que usa como diana las secuencias de inserción *IS1111* en muestras de suero la rentabilidad de la prueba fue del 98 %. En estudios realizados en Suiza se comparó una PCR a tiempo real que amplifica los genes *ompA* con la nested PCR que amplifica la secuencia *IS1111* durante un período de siete años y en 89 muestras, siendo la sensibilidad global del 81,2 %. Estos autores indican que la muestra de sangre recogida con EDTA es mas rentable que el suero (**234**). En un estudio complicado de analizar, realizado en el Centro de Referencia de Rickettsias en Marsella durante tres años, se empleó una PCR a tiempo real, que detecta las secuencias *IS1111* y *IS30a*. Este trabajo evaluó diferentes tipos de muestras (suero, sangre y biopsias) en en distintos estadios de la enfermedad. Globalmente se analizaron 3.219 muestras correspondientes a 1.748 pacientes (**235**) . De ellas fueron positivas 145 muestras de 115 pacientes (6,5%), 101 muestras de suero y 8 muestras de sangre con EDTA.

La PCR es un elemento importante en el diagnóstico precoz en la fiebre Q aguda cuando la serología es negativa o no es concluyente. Los porcentajes de positividad varían en los distintos estudios, aún empleando la misma secuencia diana de ampliación. En cambio, es mucho mas rentable en los casos de fiebre Q crónica (biopsias).

Recientemente se han introducido otras técnicas como LAMP (*loop –mediated isothermal amplification assay*), que tiene ventajas como que no necesita termociclador y se realiza en 60 minutos (236).

1.2.6.3. Técnicas indirectas.

En la mayoría de los casos, el diagnóstico de fiebre Q se efectúa mediante inmunodiagnóstico. En este apartado se indicarán las principales pruebas diagnósticas, la cinética de aparición de los anticuerpos y la interpretación práctica de los datos de serología.

1.2.6.3.1. Pruebas serológicas

Las principales técnicas serológicas empleadas en el diagnóstico de fiebre Q en humanos y sus características particulares se indican a continuación.

- *Inmunofluorescencia indirecta (IFA)*. Es el método de referencia para el diagnóstico serológico de fiebre Q. Para la preparación de antígenos para este test, la cepa de referencia Nine Mile de *C.burnetii* en fase II se hace crecer en líneas confluentes de fibroblastos de ratón L929. Los antígenos de fase I son obtenidos de bazos de ratón inoculados con organismos en fase II. Este método de preparación ha demostrado producir los antígenos con la mayor sensibilidad para la detección de anticuerpos anti- *C. burnetii*. Este método puede usarse para determinar anticuerpos de fase I y II de las fracciones de IgG, Ig M e IgA. Debido a que los resultados pueden ser confusos por la presencia de factor reumatoide, se usa un absorbente del factor reumatoide para eliminar la IgG antes de la determinación de IgM e IgA. Se comienza con una dilución de 1:50 o 1 para el screening con antiinmunoglobulina antifase II. Los casos positivos se siguen diluyendo para estudiar los antígenos de fase I y II de IgG, IgM e IgA. La seroconversión se suele detectar de 7 a 15 días tras el inicio de la clínica. Cerca del 90% de los pacientes tienen anticuerpos detectables a la tercera semana.

- *Fijación de complemento*. Ha sido ampliamente usada, pero en la actualidad poco laboratorios la emplean. Aunque es muy específica (pero menos que la inmunofluorescencia indirecta) , carece de sensibilidad, además de ser una técnica muy

laboriosa. El suero se inactiva por calor y se analiza contra los antígenos de *C. burnetii* en fase I y fase II. Sin embargo, un fenómeno de prozona puede estar presente en las muestras de suero de pacientes con fiebre Q crónica y este fenómeno puede dar un resultado falso negativo. Además, las reacciones cruzadas con antígenos de huevo pueden originar resultados falsos-positivos. La interpretación de los resultados requiere muestras de suero de fase aguda y convaleciente. La seroconversión es detectada de forma más tardía con esta técnica que con la inmunofluorescencia o con el ELISA (de 10 a 20 días del comienzo de los síntomas). Un título de anticuerpos de la clase IgG contra los antígenos de fase II por fijación del complemento mayor o igual de 1:40 es diagnóstico de fiebre Q aguda y un título de IgG anti fase I mayor o igual de 1:200 es diagnóstico de fiebre Q crónica.

- *ELISA*. Fue descrito como más sensible y específico que la fijación del complemento para el diagnóstico de fiebre Q por lo que ha sido propuesto como un buen método para estudios de seroprevalencia. Es una técnica mas laboriosa y requiere una considerable experiencia para la interpretación de los resultados. Por ello, su aplicación para el diagnóstico serológico de fiebre Q es todavía limitado. Detecta anticuerpos anti fase I y II.

- *Western blot*. Es un método sensible y específico para el diagnóstico de fiebre Q. Consuma mucho tiempo y no puede usarse como screening. Permite una diferenciación de la respuesta humoral a diferentes componentes antigenicos del microorganismo. Las diferentes masas moleculares de los diferentes antígenos detectados varían de 10 a 100 kDa. Los anticuerpos que reaccionan con antígenos de 50, 80 y 160 kDa se consideran sugestivos de fiebre Q crónica.

1.2.6.3.2. Cinética de la respuesta humoral frente a *Coxiella burnetii*

Aproximadamente al séptimo día del comienzo de los síntomas aparecen títulos significativos de IgM ($\geq 1:80$), y a las dos semanas aparecen respuesta IgG. En el 80% de los casos, la IgM persiste a títulos altos durante 6 meses. Debido a que los anticuerpos de clase IgM específicos preceden a los anticuerpos de la clase IgG, la presencia de IgM es compatible con infección reciente.

1.2.6.5. Interpretación de los resultados de los tests serológicos.

El valor predictivo positivo y negativo depende de la prevalencia de la enfermedad. Un test diagnóstico necesita ser muy sensible, y para un estudio seroepidemiológico precisa ser muy específico para prevenir los falsos positivos debido a la reacción cruzada de los anticuerpos.

La variación antigénica de *C.burnetii* es extremadamente útil para diferenciar la enfermedad en fase aguda o crónica. En la fiebre Q aguda predominan los anticuerpos frente a los antígenos de fase II y su título es más alto que el título de anticuerpos frente a la fase I. La IgM es el primer anticuerpo que aparece. En las formas crónicas de la enfermedad como la endocarditis, aparecen uniformemente altos títulos de anticuerpos anti-fase I. Para el diagnóstico de fiebre Q aguda se recomienda un título de anticuerpos por inmunofluorescencia de IgG anti fase II mayor o igual de 200 y un título de IgM anti-fase II mayor o igual de 50. Para el diagnóstico de fiebre Q crónica los anticuerpos de clase IgG anti fase I mayor o igual de 1.600.

En la fiebre Q aguda los títulos por inmunofluorescencia alcanzan su máximo nivel de 4 a 8 semanas después del comienzo de la enfermedad y disminuyen gradualmente en 12 meses. La IgM se hace indetectable de 10 a 12 semanas. La técnica de ELISA puede detectar anticuerpos después de 5 años del episodio agudo.

En la **tabla XIII** se describen los puntos de corte de la IFA para el diagnóstico de fiebre Q (**234**).

Fase II	Fase II	Fase I	Interpretación
IgG	IgM	IgG	
<1: 100			Fiebre Q improbable
≥1 :200	≥ 1: 50		Fiebre Q aguda(100%VPP)
		≥ 1:800	Fiebre Q crónica (98% VPP)
		≥ 1:1.600	Fiebre Q crónica (100% VPP)

Tabla XIII. Puntos de corte propuestos para el diagnóstico de fiebre Q ,

La persistencia de altos niveles de anticuerpos anti fase I a pesar del tratamiento adecuado, o la reaparición de tales anticuerpos debe hacer sospechar una fiebre Q crónica. Los pacientes con alteraciones valvulares o vasculares, personas con inmunodeficiencias y embarazadas se debe repetir el estudio serológico si tienen historia de fiebre Q aguda o episodios de fiebre inexplicable. En casos de fiebre Q en estos pacientes se debe realizar una inmunofluorescencia mensual durante 6 meses.

1.2.7. Tratamiento

El tratamiento antimicrobiano está indicado tanto en la fiebre Q aguda como en la fiebre Q crónica. Para la **fiebre Q aguda** se han usado varios antimicrobianos pero el tratamiento de elección es doxiciclina. La doxiciclina ha demostrado la defervescencia del cuadro clínico en dos o tres días tras el comienzo del tratamiento. Los antibióticos β-lactámicos tiene poco efecto en *Coxiella* pero se han publicado buenos resultados con macrólidos, cotrimoxazol, quinolonas y rifampicina. Las guías para el tratamiento y control de la fiebre Q aguda del CDC y el grupo de trabajo de la fiebre Q en adultos recomiendan una dosis de 100 mg de doxiciclina dos veces al día durante dos semanas (237) .

En la meningoencefalitis se considera eficaz un tratamiento con fluoroquinolonas, puesto que éstas penetran la barrera hematoencefálica. En la hepatitis por fiebre Q, como suele estar asociada a una fuerte respuesta inmune, con producción de autoanticuerpos y anticuerpos antinucleares, se aconseja administrar prednisona 40 mg/día durante 7 días (24).

El tratamiento de la **fiebre Q crónica** es mucho más complicado. Las recomendaciones actuales son 100 mg de doxiciclina dos veces al día con hidroxicloroquina 200 mg tres veces al día durante, al menos, 18 meses. En caso de pacientes con prótesis valvular el tratamiento deberá prolongarse durante 24 meses. Aunque sigue siendo un tratamiento largo, el uso de hidroxicloroquina ha reducido el tiempo de tratamiento, ya que previamente se empleaba durante cinco años. Estos pacientes precisan controles oftalmológicos semestrales ya que la hidroxicloroquina causa retinopatía. Además, ambos fármacos causan fotosensibilidad. El diagnóstico

precoz y el tratamiento combinado de la endocarditis por fiebre Q reduce la mortalidad del 60% (la existente en la década de los 70) hasta el 5% en los años 90 (**238**).

El fármaco recomendado para el tratamiento de la fiebre Q aguda durante el **embarazo** es cotrimoxazol. En el caso de formas crónicas, debe administrarse doxiciclina y hidroxicloroquina tras el parto durante doce meses.

1.2.7. Prevención

Debido a la forma de transmisión de *C. burnetii* y sus características epidemiológicas es prácticamente imposible evitar de forma sistemática la exposición a este patógeno. Sin embargo, en algunos contextos debe extremarse el contacto con focos de alta exposición (embarazadas, inmunodeprimidos y personas con valvulopatías). Además, el manejo de laboratorio de muestras presumiblemente contaminadas por *C. burnetii* debe realizarse en laboratorios de bioseguridad P3.

En lo que respecta al desarrollo de vacunas se han descrito dos tipos: (*i*) una vacuna completa (Q-Vax) comercializada en Australia, muy eficaz pero con efectos secundarios importantes en personas que hayan padecido la fiebre Q o con vacunación previa y (*ii*) vacunas acelulares (tras extracción por tricloroacético, Checoslovaquia) o (cloroformo USA), mejor toleradas y aparentemente con similar efectividad. Se requiere la realización de tests cutáneos previamente al empleo de las vacunas ya que se han descrito casos graves en casos de exposición previa a la bacteria (**228**).

Asimismo se han ensayado vacunas en el ganado (**240,241**), con resultados variables.

Dos grupos de moléculas no antimicrobianas como las estatinas y el omeprazol han demostrado cierta actividad frente a *C. burnetii*. Las estatinas tienen actividad en la multiplicación de *C. burnetii* y en la secreción de anticuerpos antifosfolípidos. Sería interesante realizar análisis retrospectivos de la epidemia de Holanda para determinar si ambas moléculas tienen efecto protector en la fiebre Q (**242**).

1.3. Tifus murino

Los organismos que causan el tifus endémico (*R.typhi* y *R. felis*) se incluyen dentro del género Rickettsia. Tradicionalmente, este género se ha subdividido en el grupo de las fiebres exantemáticas (como la fiebre botonosa y la fiebre manchada de las Montañas Rocosas) y grupo tifus (tifus exantemático y fiebre de las trincheras). Asimismo se ha añadido un grupo transicional (*R. felis*, *R. australis* y *R. akari*) y un grupo ancestral (grupo de *R. belli* y el grupo de *R. canadensis* (243)). En todas las especies de rickettsias la localización de la bacteria es intracelular, se localizan en el citoplasma celular como microorganismos libre siendo su genoma circular y de pequeño tamaño. Además tienen en común su corta viabilidad fuera de los reservorios y vectores que infectan y la dificultad para ser cultivadas en el laboratorio.

1.3.1. Aspectos históricos

El tifus murino fue descrito por primera vez en 1922 por F. Hone como una enfermedad similar la fiebre tifoidea. En 1926 Maxcy diferenció ambas entidades y en 1931, cuando Dyer aisló la nueva especie de rickettsia en ratas y pulgas, fue reconocida como una zoonosis de distribución mundial (244,245,246,247). Posteriormente se describieron casos en múltiples países, entre ellos en España (9, 248, 249,250,251).

1.3.2. Taxonomía y microbiología

1.3.2.1.Taxonomía

En la familia *Rickettsiaceae* se incluyen dos géneros, *Rickettsia* y *Orientia*. Aunque el número y diversidad de las cepas patógenas en estos géneros son similares, la designación de las especies, difiere de forma considerable. La segunda edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (última revisión en 2005) valida 20 especies de *Rickettsia*, aunque hay otras especies propuestas.

El género se divide dos grupos de especies pertenecientes al grupo del tifus y al grupo de las fiebres manchadas (SFG) definidas por sus antígenos lipopolisacáridos distintivos. El grupo del tifus esta formado por dos especies: *Rickettsia prowazekii* y

Rickettsia typhi. El SFG contiene patógenos humanos reconocidos como *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. africae*, *R. sibirica*, *R. japonica*, *R. honie*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, *R. monacensis*, *R. slovaca*, *R. aeschlimannii* y *R. helvetica*, y otras descritas solo en artrópodos. Actualmente, han sido descritas 26 especies de rickettsias (<http://www.bacterio.cict.fr/qr/rickettsia.html>), incluyendo aquellas descritas desde el año 2005 (*Rickettsia asiatica*, *R. heilongjiangensis*, *R. hoogstraalii*, *R. raoultii* y *R. tamurae* (252). También han sido propuestas subespecies en *R. conorii* y *R. sibirica*. Los criterios taxonómicos usados para describir nuevas especies no han variado en los últimos diez años y el aumento en la descripción de nuevas especies se debe al uso de técnicas moleculares y el uso de cultivos celulares.

1.3.2.2. Microbiología

Las rickettsias son bacterias intracelulares obligadas, de pequeño tamaño (0.3 a 0.5 µm por 1 a 2 µm) pertenecientes a la Clase *Alphaproteobacteria*. La pared celular posee una estructura de gramnegativos que contiene lipopolisacáridos, peptidoglicano, y proteínas de superficie. Se dividen por fisión binaria y el tiempo de duplicación es de 8 a 10 horas. Estudiando el tamaño del genoma, Merhej et al. demostró que la degradación del genoma, especialmente la pérdida de genes, ha forzado la adaptación de las rickettsias a la vida intracelular en las células eucariotas (253).

Se ha secuenciado el genoma de *R. typhi* y consta de un cromosoma circular formado por 1.111.496 pb, con un contenido en G+C del 28,9% (254). El porcentaje de genoma codificante es del 76,27%. Posee 877 genes, que codifican 3rRNAs, 33 tRNAs, 3 RNAs no codificantes y 838 proteínas. Además posee 40 pseudogenes incluyendo el sistema del citocromo oxidasa c, factores de virulencia y genes de resistencia (gen *erm*, metaloβlactamasa).

Las rickettsias están rodeadas por una capa proteica con proteínas antigenicas inmunodominantes de superficie (SPA; *surface protein antigens*). Dos de estas SPA, OmpA y OmpB son los principales determinantes antigenicos involucrados en la respuesta inmune en pacientes con rickettsiosis. Son proteínas de gram tamaño, constituidas por 1600 a 2000 aminoácidos, con un peso molecular de 170-190 kDa y 135 kDa,

respectivamente. Intervienen en la adhesión de las rickettsias a las células que infectan. Además de estos elementos, el genoma de *R. typhi* codifica cuatro proteínas tlyA, tlyC, pldA y pat-1 que facilitarían la invasión celular o la introducción en el endosoma. Estos microorganismos están bien adaptados para la vida intracelular ya que carecen enzimas para el metabolismo de los carbohidratos y amoniálicos, para la biosíntesis de lípidos y de nucleótidos pero poseen abundante genes codificadores de enzimas para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y múltiples copias de la translocasa ATP/ADP, tanto para generar su propia energía como para utilizar la del hospedador. *Rickettsia typhi* carece de rick A, que codifica una proteína para la movilidad intracelular mediante la polimerización de la actina. *R. felis* comparte antígenos y componentes genéticos con *R. typhi*.

1.3.3. Epidemiología

1.3.3.1. Aspectos generales

El ciclo biológico de la *R. typhi* se mantiene en la naturaleza entre hospedadores mamíferos (ratas y humanos) y vectores (pulga). El ciclo clásico natural de esta entidad incluye dos especies de ratas (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) y la pulga oriental de la rata (*Xenopsylla cheopis*). Las pulgas adquieren la infección a partir de las ratas y mantienen la infección el resto de su vida. El reservorio de las pulgas se mantiene por transmisión horizontal a los vertebrados, y en menor magnitud a otras pulgas. Una vez infectada, la pulga mantiene la infección por rickettsia durante toda su vida. La transmisión de la enfermedad ser humano y a otras ratas ocurre de tres formas: La más frecuente es la autoinoculación a partir de las heces de la pulgas en la zona de la picadura, debido a que presenta un carácter pruriginoso que conlleva al rascado (255). Otras formas son la transmisión directa por la picadura y la inhalación de heces de pulga contaminadas (256). Este ciclo clásico sigue siendo la forma de transmisión del tifus endémico en países como Grecia y Tailandia. En otras zonas existen otros reservorios (gatos, perro), otro vector (*Ctenocephalides felis*) y otra especie (*Rickettsia felis*) (257,258,259,260). *C. felis* no solo parasita gatos sino otros mamíferos, como perros, lo que facilita su diseminación en el ámbito doméstico. Además, la pulga del gato es capaz

de transmitir las dos especies de garrapatas relacionadas con el tifus endémico, y la transmisión transovárica de *R. felis* es muy eficaz, lo que facilita su diseminación.

En la mayor parte de las series, el tifus endémico tiene un patrón temporal característico, predominando durante el verano y el principio del otoño. Sin embargo, en otras zonas se describen casos durante todo el año. No existe relación entre esta infección y el hábitat urbano o rural. Esta enfermedad aparece en todos los grupos de edad y es frecuente la afectación infantil. La seroprevalencia de anticuerpos en *R. typhi* aumenta con la edad y no existen diferencias significativas en cuanto a la distribución por sexos. Aunque tiene una distribución mundial, es más prevalente en regiones marítimas de áreas tropicales y subtropicales.

1.3.3.2. Estudios de seroprevalencia

En la **tabla XIV** se exponen los principales estudios de seroprevalencia publicados.

Ref	Primer autor	Año	Distribución geográfica	Nº	Tipo muestra	Prevalencia	Técnica empleada
EUROPA							
117	Ruiz-Beltrán R	1990	España (Salamanca)	400	Población general	12,5%	IFA ≥1:40
261	Lledó L	2001	España (Madrid)	640	Población general	6,8%	IFA ≥1:40
262	Santibáñez Sl	2009	España (Jaén)	734	Población general	18%	IFA ≥1:64
11	Bernabéu M	2006	España (Sevilla)	504	Población general	3,8%	IFA ≥1:64
263	Nogueras MM	2006	España (Cataluña)	217	Sueros pacientes	8,8%	IFA ≥1:40
264	Daniel SA	2002	Grecia	1.584	Población general	2%	IFA ≥1:64
265	Punda-Polic V	1995	Bosnia-Herzegovina	183	Población general	37,7%	IFA ≥1:40
266	Badiaga S	2012	Francia (Marsella)	299	Indigentes	22%	IFA ≥1:25
AMÉRICA							
267	Comer JA	2001	EE.UU (Nueva York)	204	Usuarios drogas IV	0%	IFA ≥1:64
268	Smith HM	2002	EE.UU (Los Angeles)	200	Indigentes	0%	IFA ≥1:64
269	Marshall GM	2000	EE.UU (Sudeste)	1999	Personas 1-17 años	0,6%	IFA ≥1:64
270	Purcell K	2007	EEUU (Texas)	513	Niños (1-17 años), muestras laboratorio	12%	IFA ≥1:64
271	Acuna-Soto R	2000	Méjico	100	Donantes de sangre	14%	IFA ≥1:80
ÁFRICA							
151	Dupont HT	1995	Angola	113	Población general	0%	IFA ≥1:50
151	Dupont HT	1995	Burkina Faso	102	Población general	5,9%	IFA ≥1:50
151	Dupont HT	1995	Congo	100	Población general	5,0%	IFA ≥1:50
151	Dupont HT	1995	Costa de Marfil	89	Población general	2,3%	IFA ≥1:50
151	Dupont HT	1995	Islas Comoras	93	Población general	2,2%	IFA ≥1:50
151	Dupont HT	1995	Mali	100	Población general	11,0%	IFA ≥1:50
152	Niang M	1998	Mauritania	118	Población general	1,7%	IFA ≥1:50
272	Meskini M	1995	Marruecos (Casablanca)	300	Donantes de sangre	1,7%	IFA ≥1:32
272	Meskini M	1995	Marruecos (Fez)	126	"Muestras de laboratorio"	4%	IFA ≥1:32
151	Dupont HT	1995	República Centroafricana	99	Población general	10,1%	IFA ≥1:50
273	Anstey NM	1997	Tanzania	150	Mujeres embarazadas	28%	IFA ≥1:50
274	Dill T	2013	Tanzania	1229	Población general	9,3%	IFA ≥1:64
152	Letaief AO	1995	Túnez	500	Donantes de sangre	3,6%	IFA ≥1:32
153	Okabayashi T	1999	Zambia	377	Población general	5%	IFA ≥1:64
ASIA							
275	Richards AL	1997	Indonesia	464	Población general	34,7%	ELISA
276	Strickman D	1994	Tailandia	215	Donantes de sangre	8%	Peroxidasa
277	Maude RR	2014	Bangladesh	805	Población general	67%	ELISA

Tabla XIV. Estudios seroepidemiológicos de prevalencia de infección por *Rickettsia typhi*

1.3.3.3. Series de casos. En la tabla XV se indican las características epidemiológicas más importantes de las principales series publicadas de tifus murino.

Introducción

Autor. Ciudad (País) Año	Ref	Nº pacientes	Distribución temporal	Edad (media)	Intervalo edad	Sexo V: M	Urbanos
Dumler. Texas (EE.UU) 1991	278	80	Abril-Junio	48	-	2:3	-
Silpapojakul. Tailandia 1992	279	137	No variación	-	4-76	1,3:1	43%
Fergie .Texas (EE.UU) 2000	280	30	Mayo-Noviembre	10	2-17	3:4	-
Whiteford. Texas (EE.UU) 2001	281	97	Mayo-Julio	8	5m-16años	1,2:1	-
Gikas. Creta (Grecia) 2002	282	83	Julio-Octubre	50 V 40 M	14-76	3:2	46%
Gray. Nueva Zelanda 2006	284	12	Junio-Agosto	46	19-69	1:1	0%
Koliou. Chipre. Niños 2007	285	21	Verano-otoño	8	4-13	1:1,1	29%
Gikas . Creta (Grecia). Niños 2008	286	41	Mayo-Octubre	10	1-15	48,8:51,2	ND
AdjemianJ. Texas 2008	287	33	Mayo-Agosto	39	7-64	56:44	ND suburbano
Zimmerman . Nepal 2008	288	50	Invierno	28	15-85	36:64	ND
Chang . Taiwan 1992-2009	289	81	Mayo-Agosto	50	10-86	2,12:1	ND
Walter . Francia 2012	290	32	Agosto-Septiembre viajeros	42	1-69	1:1	-
Chaliotis . Grecia 2012	291	90	Verano	43	18-89	67,8:32,2	47,8%
Znazen Túnez 2013	292	43	Verano-Otoño	41	8-83	1,04	41,9
Aouam. Túnez 2015	293	73	Junio-Septiembre	33	13-68	64:36	48%
Balleydier. Isla Reunión 2011-2013	294	8	Verano	46	21-66	1:1	100
Hamaguchi. Vietnam 2015	295	193	Mayo-Octubre	47	ND	72:28	52,9%

Tabla XV. Características epidemiológicas de series de casos de tifus murino.

1.3.3.4. Principales series de casos de tifus murino en España

	Ref.	Nº pacientes	Distribución temporal	Edad media	Intervalo edad	Sexo V: M	Urbanos
Bernabeu. Sevilla 1999	11	104	Agosto-Octubre	37,9	12-81	1,2:1	63,5%
Hernández. Gran Canaria 2003	283	22	Verano	28	14-76	21:1	-
Miguélez. Tenerife 2003	101	32	ND	49	18-73	21/11	21,8
Gutiérrez-Rave 1985	9	10	ND	37,4	14-60	2:3	70%

Tabla XVI. Series de casos de tifus murino en España.

1.3.4. Patogenia y Fisiopatología

La entrada de *R. typhi* en el ser humano tiene lugar por vía transcutánea (autoinoculación de heces de pulga o picadura de este artrópodo) o inhalatoria. La inoculación transcutánea no se asocia a una lesión cutánea característica, propia de las rickettsiosis del grupo de las fiebres exantemáticas o de la fiebre de las trincheras. Desde la piel o del aparato respiratorio, las rickettsias se diseminan por vía linfática y/o hemática hasta las células endoteliales, que constituyen su principal célula diana.

Las rickettsias están rodeadas de una estructura proteica de superficie que contiene proteínas capaces de obtener respuesta inmune protectora. Aunque los lipopolisacáridos constituyen el mayor constituyente de la membrana externa de las bacterias gramnegativas, no intervienen en la adhesión de las rickettsias a la célula del hospedador. Antes de la secuenciación del genoma de las rickettsias, sólo se conocían dos antígenos proteicos de superficie (SPA), denominadas *rOmpA* y *rOmpB*. El análisis de la secuencia de aminoácidos demostró la presencia de un dominio autotransportador (AT) en su extremo C-terminal. La disponibilidad de los genomas de varias especies de rickettsias evidenciaron tres genes adicionales codificados en el dominio AT. Estos genes fueron descritos como *sca* genes (surface cell antigen), de los que existen *sca1, 2, 3* junto

a *rOmpA* (*sca0*) y *rOmpB* (*sca5*), mientras que el *gen D* fue renombrado como *sca4*. Existen 17 subfamilias de las proteínas *Sca* que constan de un péptido en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal un dominio AT. La función de estas proteínas permanece desconocida aunque se cree que contribuyen al reconocimiento de diferentes receptores en la célula del hospedador (243). La expresión de *rOmpB* en *Escherichia coli* permite la adherencia y entrada de la bacteria en las células epiteliales. Otras adhesinas son Adr1 y Adr2, (subunidad ku70 dependiente de la protein-cinasa). Tras su adhesión, las rickettsias penetran en las células endoteliales empleando un mecanismo denominado fagocitosis inducida (el aporte de energía corresponde al agente patógeno). Aunque inicialmente las rickettsias son englobadas en una vacuola de fagocitosis, antes de que se produzca la fusión lisosoma-fagosoma acceden al citoplasma gracias a una fosfolipasa A₂ producida por las propias bacterias. En el citoplasma se produce la división celular mediante fusión binaria. Las consecuencias de la infección celular son la diseminación de la infección a las células próximas y una lesión endotelial directa (**figura 23**).

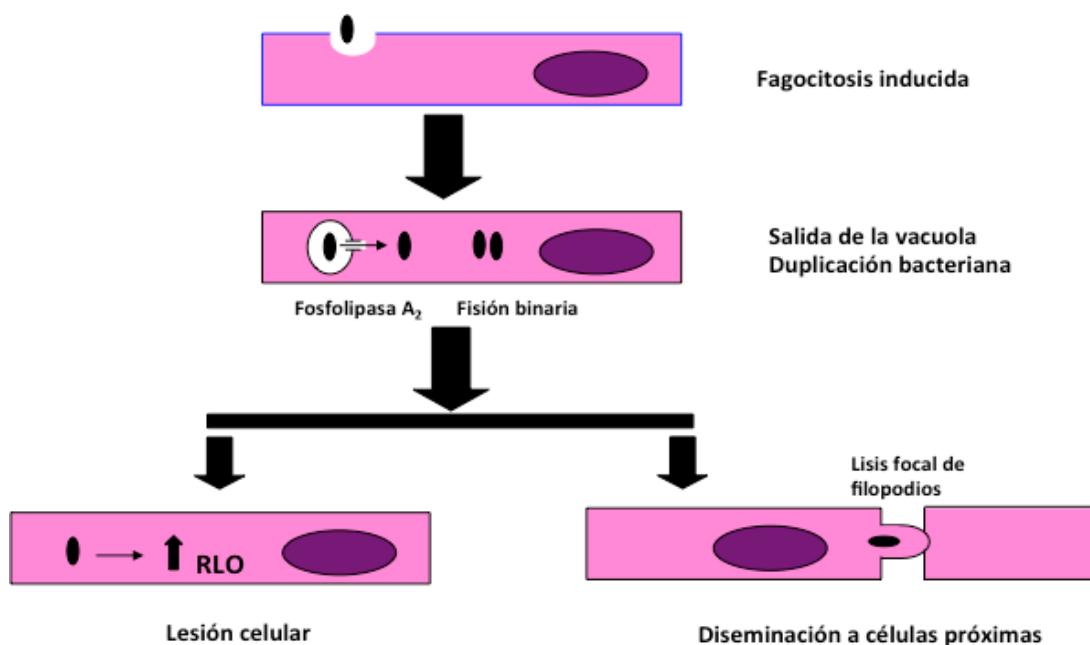


Figura 23. Patogenia general del tifus murino

Las manifestaciones del tifus endémico dependen principalmente de la presencia de endotelitis, que altera la permeabilidad capilar y promueve la salida de líquidos hacia los tejidos, con pérdida del volumen intravascular, albúmina, y electrolitos, y se consumen leucocitos y plaquetas en el foco de la infección. Por ello, se altera el funcionamiento de los órganos como el pulmón y el sistema nervioso y se desencadena una activación local de la coagulación. Otros factores asociados son la liberación de citocinas antiinflamatorias por las células endoteliales y macrófagos. La respuesta inmunitaria incluye un componente humoral (anticuerpos frente a las proteínas externas de membrana) y un componente celular mediado principalmente por linfocitos T citotóxicos y células Natural Killer. En general, el individuo queda protegido de por vida.

Para el inicio de la infección se requiere la entrada, supervivencia y replicación de las rickettsias en la célula hospedadora, y la salida de la misma para iniciar una nueva infección. Aunque la célula endotelial es la célula diana para la mayoría de las rickettsias patógenas, también la infección de monocitos y macrófagos contribuye al establecimiento de la infección y su patogenia. Mediante estudios experimentales en el ratón se ha demostrado que *R. typhi* causa citotoxicidad en los macrófagos peritoneales. La respuesta celular del hospedador en el ratón conlleva a un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 y IL-6. En cambio, los niveles de IFN- γ , IL-10 y IL-12 no cambian significativamente en el curso de la infección (**300**).

1.3.5. Manifestaciones clínicas y datos de laboratorio

1.3.5.1. Manifestaciones clínicas.

El periodo de incubación de la enfermedad oscila entre seis y catorce días. Puede existir un período prodrómico de 1 a 3 días caracterizado por cefaleas, artromialgias, astenia y náuseas. El cuadro clínico inicial se caracteriza por la triada de fiebre elevada (a menudo asociada a escalofríos), cefalea intensa y exantema cutáneo. La frecuencia de cada uno de estos datos clínicos varía en las series publicadas. Así, la mas frecuente es la fiebre presente en el 98-100% de los casos. La fiebre supera los 39°C en la mayoría de los casos, y resulta difícil de controlar con los antitérmicos habituales. La cefalea aparece en

mas del 75 % de los casos, y muchas veces su intensidad hace sospechar un síndrome meníngeo. La presencia de exantema es muy variable, del 20-80% de los casos, de carácter maculopapular, poco intenso y de predominio central (tronco y zona proximal de las extremidades) (**figura 24a**). Otras manifestaciones clínicas incluyen artromialgias, mialgias, hepatomegalia, tos, diarrea, esplenomegalia, detección de picadura (**figura 24b**), conjuntivitis (**figura 24c**) y neumonía “redonda” (**figura 24d**). La frecuencia de estas manifestaciones varía en las diferentes series, lo que se podría explicar debido a la vía de penetración (picadura o inhalación), y/o la existencia de diferentes microorganismos (*R. typhi*, *R. felis* y probablemente otras) (**Tabla XVII**).

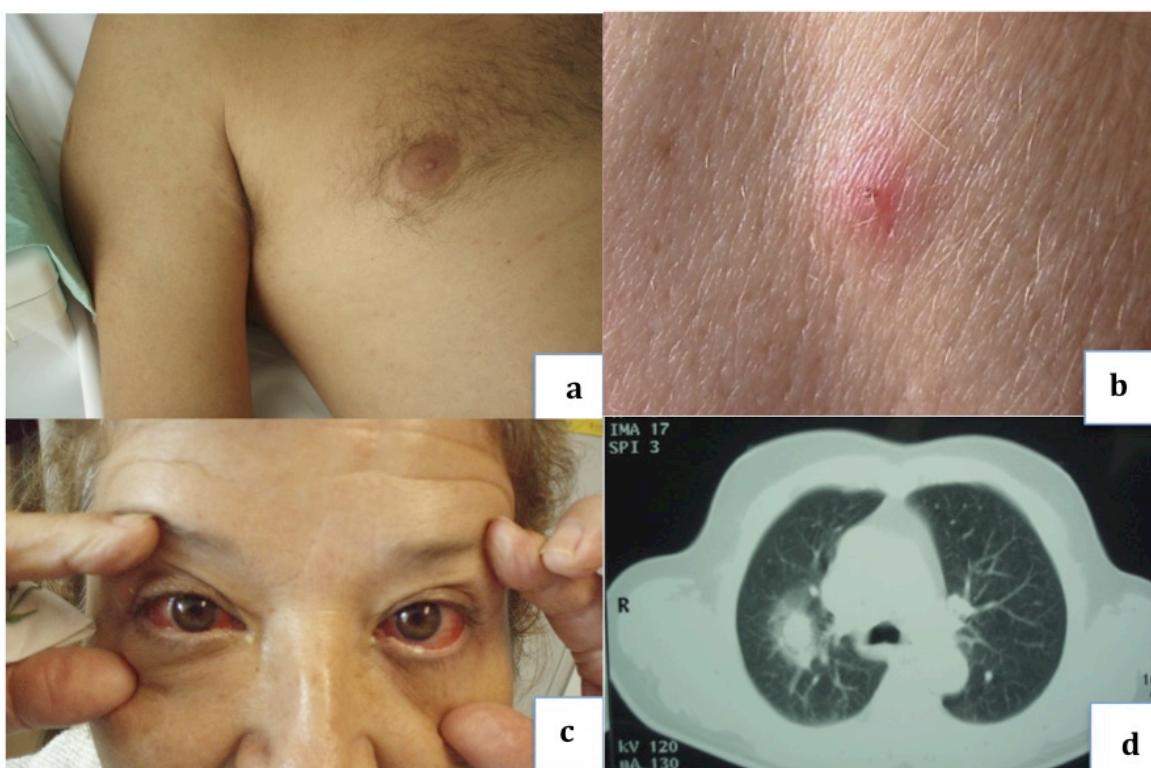


Figura 24: Lesiones clínicas en pacientes con tifus murino (Cortesía de JLPA)

Referencia	278	279	11	280	281	286	283	291	285	286	289	296
Año	1991	1992	1999	2000	2001	2002	2003	2012	2007	2009	2012	2014
Nº casos	80	137	104	30	97	83	22	90	21	41	81	49
Fiebre	98	100	100	100	100	100	100	100	100	100	96,3	100
Cefalea	75	41,6	71,1	77	76	88	90,9	87,8	29	14,6	51,9	83,7
Exantema	54	20,4	62,5	80	63	80	68,2	68,9	57	63,4	28,4	73,5
Artralgias	46	44,5	77,8	57	40	45	45,4	36,7	-	26,8	14,8	26,5
Hepatomegalia	-	24,1	29,8	-	-	22	38,1	32,2	10	61		34,7
Tos	35	-	25	40	15	28	28,6	32,2	19	9,8	30,6	30,6
Diarrea	26	5,1	5,7	40	33	11	18,2	-	19	-		-
Esplenomegalia	-	5,2	24	-	-	23	14,3	25,6	24	46,3		22,5
Picadura	39	0	3,8	3,3	34	-	13,6	-		-		
Náuseas/ vómitos	48	30,7	23	43	45	18	13,6	33,3	19	9,8		24,5
Dolor abdominal	23	10,9	-	60	27	11	13,6		10	14,6		16,3
Confusión	8	2,2	4,8	7	8	10	13,6	11,1	5	2,3		20,4
Conjuntivitis	-	2,2	-	-	7	25	4,5	21,1	14	-		23,5

Tabla XVII. Manifestaciones clínicas en las principales series de tifus murino.

(Los datos se expresan en tanto por ciento)

Los datos analíticos son también muy variables (**tabla XVIII**). En el hemograma es frecuente la anemia. El recuento leucocitario es muy variable, pudiendo aparecer leucocitopenia, leucocitosis (con neutrofilia) o, lo que es más habitual, un recuento leucocitario normal en un paciente en el que los datos clínicos apuntan a una infección bacteriana. Aproximadamente en la mitad de los pacientes aparece trombocitopenia, aunque en algunas series este hecho es menos frecuente. La afección de la coagulación se ha estudiado poco. En nuestra serie aparece un alargamiento del tiempo de protrombina y del tiempo de tromboplastina parcial activado en una cuarta parte de los pacientes (**283**).

REFERENCIA	278	279	280	281	11	282	283	291	285	286	289	299
Anemia	75	-	0,96	57	69	25	18,2	31,1	-	-	-	51
Leucocitopenia	28	3,9	18	40	37	7,2	9,0	32,2	16,7	24,4	13,6	40,8
Leucocitosis	29	-	20	3	1	0	18,2	-	-	-	12,3	16,3
Neutrofilia	-	-	-	63	77	-	36,4	-	-	-	-	-
Trombocitopenia	48	2,9	19	60	43	51	45,4	81,1	28	39	37	53,1
Elevación VSG	-		59,5	75	81	-	89,5	93,4	44	-	-	-
A.tiempo de protrombina	30			-	-	-	22,7	-	-	-	67,9	-
A. ratio TTPA	-			-	-	-	27,3	-	-	-	-	-
Aumento urea	27			0	3	-	36,4	-	0	-	-	-
Aumento creatinina	21			0	0	-	13,6	13,3	0	-	-	-
Hiponatremia	60			66	58	37	18,2	35,6	-	9,8	-	23,5
Aumento CK suero	21			-	-	42	10,0	31,1	-	-	-	-
Aumento LDH suero	87		-	-	100	82	81,8	21,1	-	-	87,5	65,3
Aumento AST suero	90		67	67	82	86	77,3	84,8	-	73	70,3	89,8
Aumento ALT suero	73		67	67	38	64	99,9	87,8	-	65,6	70,3	89,8
Aumento FA suero	60		25	-	-	15	30,0	-	-	-	70,6	16,3
Aumento GGT suero	-		-	-	-	-	57,2	48,9	-	-	-	12,3
Hipoalbuminemia	89		-	46	87	82	54,5	81,1	-	-	-	40
Hipergammaglobulinemia	-		-	-	-	-	75,0	-	-	-	-	-

Tabla XVIII. Datos complementarios en las principales series de tifus murino

La *afectación renal* es muy variable. Es excepcional en las series infantiles (280,281), pero aparece una elevación de la urea y creatinina hasta en una cuarta parte de los casos (278,283). En nuestra experiencia, hasta el 86,9% de los pacientes presentaban alteraciones en el estudio de la orina, principalmente microhematuria (283), lo que contrasta con la ausencia de alteraciones en otras series de casos (11,280,281) y la menor detección (28%) en el estudio de Dumler et al. (278). En un estudio centrado específicamente en las lesiones renales del tifus murino, Shaked et al. (298) encontraron alteraciones urinarias en 5 de los 27 pacientes estudiados. En la bibliografía se han comunicado 14 casos de insuficiencia renal aguda (278,282,283,298,299,300) asociados a tifus murino, cuyo sustrato anatopatológico era una nefritis intersticial multifocal perivasculares (característico de las rickettsiosis) (299).

La *afección hepática* es muy frecuente en todas las series revisadas. Se detectan hipoalbuminemia e hipertransaminasemia en más del 75% de los casos. La hipertransaminasemia frecuentemente alcanza el rango de las hepatitis virales, y es menos frecuente la aparición de colestasis disociada. Sin embargo, es excepcional la aparición de ictericia y/o hiperbilirrubinemia, que se presentan en tres circunstancias:

alcoholismo, infecciones concomitantes o deficiencia de glucosa 6 fosfatodeshidrogenasa (301).

La *afección pulmonar* es relativamente frecuente en el tifus endémico, y la manifestación clínica más frecuente es la tos seca. En la radiografía de tórax se objetiva, hasta en una cuarta parte de los pacientes, un patrón alveolar, asociado o no a derrame pleural mínimo. No existen suficientes datos histológicos para explicar estos hallazgos, aunque se ha atribuido a las alteraciones de la permeabilidad vascular y/o a la inflamación alveolar directa inducida por *R. typhi*. Además de las anteriores, se han descrito múltiples complicaciones como artritis, embolia pulmonar, endocarditis, insuficiencia multiorgánica, lesión retiniana, meningoencefalitis, parotiditis, pleuro-pericarditis, seudooclusión intestinal y rotura esplénica (302-315).

La mortalidad global del tifus endémico se cifra entre un 1-4% y es más frecuente en personas con enfermedad previa y/o edad avanzada.

1.3.6. Diagnóstico etiológico y seguimiento

El diagnóstico etiológico del tifus endémico se basa en varias técnicas diagnósticas, que revisaremos brevemente para exponer posteriormente la situación actual del diagnóstico de esta entidad.

1.3.6.1. Técnicas diagnósticas

1.3.6.1.1. Serología

La prueba clásica en el diagnóstico del tifus endémico ha sido la reacción de Weil-Felix empleando como antígeno *Proteus vulgaris* OX-19. Esta técnica se basa en la reacción cruzada entre la cepa mencionada de *P. vulgaris* y antígenos del grupo del «tifus» (y también de *R. rickettsii*). La reacción de Weil-Felix detecta principalmente anticuerpos de isotipo IgM, aunque su sensibilidad y especificidad son muy bajas, por lo que su empleo ha quedado restringido a zonas con pocos recursos económicos (316).

En la actualidad, las técnicas serológicas utilizan material propio de microorganismos del género *Rickettsia* como antígeno. Los métodos iniciales para demostrar la reacción antígeno-anticuerpo en las rickettiosis fueron múltiples: fijación de

complemento (**317**), microaglutinación (**318**), hemaglutinación (**319**) o aglutinación de partículas de látex (**320**). Sin embargo, la complejidad técnica, la necesidad de una gran cantidad de antígeno o la detección de isótipos aislados limitaban su utilidad práctica. Por ello, se diseñaron nuevas pruebas que cuantificar IgM e IgG frente a *R. typhi* (o al menos rickettsias del grupo del «tifus») con mayor sensibilidad y especificidad. Las más utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (**321**) y el enzimoinmunoanálisis (**322**). La técnica de referencia para el estudio de la infección y/o enfermedad por *R. typhi* es la inmunofluorescencia indirecta, apareciendo títulos diagnósticos aproximadamente a los 10 días del inicio de la fiebre. Aunque poco utilizada, se ha descrito una técnica que sustituye el método de detección final (fluorescencia) por un marcador cromático (peroxidasa) (**323**). Su ventaja estriba en que para su visualización no precisa un microscopio de fluorescencia.

Otra técnica empleada ha sido el análisis de proteínas mediante SDS-PAGE: Mediante esta técnica se obtienen dos bandas proteicas de elevado peso molecular que corresponden a las proteínas OmpA y OmpB. Es un método muy laborioso y lento. además de poco reproducible, ya que los resultados dependen en gran parte de las condiciones de preparación del gel y de su temperatura de solubilización.

Finalmente, se han desarrollado técnicas que adaptan los métodos del ELISA a laboratorios con menor dotación tecnológica (DOT-ELISA) (**324**). De cualquier forma, la prueba más utilizada es la inmunofluorescencia indirecta y, en menor medida, el enzimoinmunoanálisis. Las dos limitaciones principales de las técnicas serológicas son la necesidad de que transcurra un tiempo mínimo para la síntesis de anticuerpos (lo que disminuye su utilidad en los primeros días de la enfermedad) y las reacciones cruzadas con otras rickettsias del «grupo del tifus» (tifus epidémico y enfermedad de Brill-Zinser) así como otros microorganismos (en concreto *Legionella bozemani*) (**324,325**).

1.3.6.1.2. Cultivos

El método más habitual para el cultivo de rickettsias es la técnica de shell-vial partiendo de sangre anticoagulada con heparina (**326**). La sangre se deja sedimentar durante una hora y se recoge el sobrenadante para inocular en *shell-vials*. Un aspecto

técnico a destacar consiste en eliminar los hematíes, ya que son tóxicos para las líneas celulares.

Se puede realizar en otro tipo de muestras como biopsias cutáneas, que se homogenizan con BHI (*Brain Heart Infusion Broth*). Habitualmente se emplean las líneas celulares Vero y de fibroblastos. Tras la inoculación de los *shell-vial* (habitualmente tres por muestra) se centrifuga durante un tiempo para que los microorganismos penetren en las células de la monocapa. Los cultivos se mantienen a una temperatura entre 28 y 32 °C y a las 72 horas, 6 días y 14 días se “revelan” mediante métodos citoquímicos (principalmente la tinción de Giemsa o la tinción de Giménez), el uso de anticuerpos (monoclonales o policlonales) o técnicas de amplificación genética de ácidos nucleicos. Si las bacterias se detectan en el *shell-vial*, se procede a la inoculación en cultivo celular convencional para la recuperación de la cepa y determinación de la especie. El aislamiento de cepas de *Rickettsia* es muy difícil, ya que implica mantener los cultivos celulares y trabajar en condiciones de extrema esterilidad, ya que no es aconsejable el empleo de antibióticos (como se emplea habitualmente para el aislamiento de virus).

1.3.6.1.3. Identificación de productos de *R. typhi* en material biológico del hospedador

La detección de antígenos así como la detección de DNA y RNA de *R. typhi* se ha empleado principalmente en estudios histopatológicos retrospectivos, aunque su aplicación clínica ha sido muy limitada.

1.3.6.1.4. Técnicas de biología molecular

Estas técnicas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite amplificar secuencias específicas de ADN, la PCR-RFLP (polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción de los productos amplificados por PCR) que, mediante el uso de enzimas de restricción que cortan el ADN, obtenemos una serie de bandas características de cada especie y la secuenciación de los productos amplificados por PCR se realiza mediante secuenciadores automáticos. Posteriormente esta secuencia se

compara con las depositadas en las distintas bases de datos (GenBank). Los genes más utilizados para el análisis filogenético han sido: *i)* genes que codifican la síntesis de RNAr16S (*rrs*) y la síntesis de la enzima citrato sintasa (*gltA*), *ii)* gen *htrA* que codifica una proteína de 17kDa *iii)* genes que codifican las dos proteínas de superficie (*OmpA* y *OmpB*) y *iv)* gen que codifica la síntesis de la proteína PS120 (gen D) (327,328).

1.3.6.2. Situación actual del diagnóstico del tifus endémico

El diagnóstico de las dos formas principales de tifus endémico (infección por *R. typhi* o por *R. felis*) requiere conocer los datos epidemiológicos, clínicos y biológicos que hagan sospechar la presencia de esta enfermedad. Asimismo, el diagnóstico en fases iniciales, precisa del empleo de métodos directos (reacción en cadena de la polimerasa o cultivo) disponibles sólo en centros muy especializados.

1.3.7. Tratamiento

El tratamiento del tifus endémico en la mayor parte de los casos es muy simple, ya que ambas bacterias (*R. typhi* y *R. felis*) son sensibles a varios antimicrobianos y la respuesta es muy rápida. En ambos casos, el fármaco de elección es la doxiciclina en dosis convencionales. Las quinolonas constituyen un fármaco alternativo (329,330), aunque ya se han detectado cepas resistentes a este grupo (331). La sensibilidad de ambas especies también incluye la rifampicina, el cloranfenicol y la telitromicina (329,330,332). Ambas especies son resistentes a los betalactámicos, aminoglucósidos y cotrimoxazol. La sensibilidad a los macrólidos es diferente en *R. typhi* y *R. felis*, lo que traduce su diferente situación taxonómica. Así, *R. typhi* es sensible a los macrólidos, especialmente a josamicina, lo que supone una alternativa útil en el tratamiento de niños y mujeres embarazadas, mientras que *R. felis* es resistente a este grupo farmacológico.

No existen estudios comparativos acerca de la duración del tratamiento. En general se recomienda que sea de 5 días, aunque presumiblemente una menor duración (incluso una dosis única) pueda ser igualmente eficaz.

El tratamiento de elección es una tetraciclina, principalmente doxiciclina. *In vitro*, minociclina, rifampicina, cloranfenicol, quinolonas, y azitromicina inhiben el crecimiento

de las rickettsias. La dosis recomendada es 100 mg vía oral cada 12 horas, o intravenosa en casos de enfermedad grave (**333**).

1.3.8. Prevención

Las medidas de profilaxis consisten fundamentalmente en desparasitar a los animales mediante el uso de repelentes, evitar el contacto con animales parasitados por pulgas y desinfectar los lugares frecuentados por perros y gatos.

La infección puede ser prevenida a través del control de las pulgas en los animales domésticos, especialmente los gatos domésticos. La vegetación cercana a los domicilios debe ser podada para que no sirva de refugio a roedores o gatos salvajes. También se debe evitar la entrada de animales en los domicilios.

1.4. Bibliografía

1. Vanderschueren S, Knockaert D, Adriaenssens T, Demey W, Durnez A, Blockmans D et al. From prolonged febrile illness to fever of unknown origin: the challenge continues. *Arch Intern Med.* 2003;163:1033-4.
2. Amin K, Kauffman CA. Fever of unknown origin. A strategic approach to this diagnostic dilemma. *Postgrad Med* 2003;114:69-75.
3. Bryan CS. Fever of unknown origin: the evolving definition. *Arch Intern Med* 2003; 163: 1003-4.
4. De Kleijn EHA, Vandenbroucke JP, van der Meer JW. Fever of unknown origin (FUO): I. A prospective multicenter study of 167 patients with FUO, using fixed epidemiologic entry criteria. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:392-400.
5. De Kleijn EHA, van Lier HJJ, van der Meer JW. Fever of unknown origin (FUO): II. Diagnostic procedures in a prospective multicenter study of 167 patients. *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:401-414.
6. Mourad O, Palda V, Detsky AS. A comprehensive evidence-based approach to fever of unknown origin. *Arch Intern Med.* 2003;163:545-51.
7. Rivero A, Zambrana JL, Pachón J. Fiebre de duración intermedia. *Enf Infect Microbiol Clin* 2003; 21: 145 - 50.
8. Oteo JA. Fiebre de duración intermedia: nuevos tiempos, nuevas herramientas y cambio de espectro. *Enf Infect Microbiol Clin* 2010;28: 407-8.
9. Gutierrez-Ravé Pecero VM, Luque-Marquez R. Tifus murino: una causa frecuente de síndrome febril de media evolución. *An Med Intern (Madrid)* 1986; 460-1.
10. Bernabeú- Wittel M, Cordero E, Viciana P, Pachón J. Etiología y criterios de ingreso en el síndrome febril sin focalidad. *Med Clin (Barc)* 1999; 113:718-19.
11. Bernabeu Wittel M, Pachón J, Alarcón A, López Cortés LF, Viciana P, Jiménez Mejías ME, et al. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration. A 17-year study in the south of Spain. *Arch Intern Med* 1999; 159:872-876.
12. Parra Ruiz J, Peña Monje A, Tomás Jiménez C, Parejo Sánchez MI, Vinuesa García D, Muñoz Medina L, et al. Clinical spectrum of fever of intermediate duration in the south of Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008 ;27:993-5

13. Espinosa N, Cañas E, Bernabeu-Wittel M, Martín A, Viciiana P, Pachón J. Cambios en el espectro etiológico de la fiebre de duración intermedia. Enf Infect Microbiol Clin 2010;28:416-20.
14. Rodríguez-Baño J, Muniain MA, Borobio MV, Corral JL, Ramírez E, Pereira EJ, Pérez-Cano R. Cytomegalovirus mononucleosis as a cause of prolonged fever and prominent weight loss in immunocompetent adults. Clin Microbiol Infect. 2004;10:468-70.
15. Pannuti CS, Vilas Boas LS, Angelo MJ, Amato Neto V, Levi GC, de Mendonca JS, de Godoy CV. Cytomegalovirus mononucleosis in children and adults: differences in clinical presentation. Scand J Infect Dis. 1985;17:153-6.
16. Schiellerup P, Krogfelt KA, Andersen AB. *Bartonella henselae* causing severe and protracted illness in an otherwise healthy person. Scand J Infect Dis. 2004;36:316-8
17. Roland WE, McDonald G, Caldwell CW, Everett ED. Ehrlichiosis-a cause of prolonged fever. Clin Infect Dis. 1995;20:821-5.
18. Ulleryd P, Zackrisson B, Aus G, Bergdahl S, Hugosson J, Sandberg T. Prostatic involvement in men with febrile urinary tract infection as measured by serum prostate-specific antigen and transrectal ultrasonography. BJU Int. 1999;84:470-4.
19. Pérez Arellano JL, et al. Fiebre de duración intermedia. Análisis de 2054 casos de un único centro (1998-2015).
20. Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. Lancet. 2006;367:679-88.
21. Alarcón A. Fiebre Q: todavía muchas preguntas por responder. Enferm Infect Microbiol Clin 2007; 25: 165-7.
22. Hartzell JD, Wood-Morris RN, Martinez LJ, Trotta RF. Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc. 2008;83:574-9.
23. Angelakis E, Raoult D. Q Fever. Vet Microbiol. 2010;140 297-309.
24. Fraile Fariñas MT, Muñoz Collado C. Infección por *Coxiella burnetii*. Enferm Infect Microbiol Clin. 2010;28(Supl 1):29-32.
25. Marrie TJ, Raoult D. Q fever- a review and issues for the next century. J. Antimicrob Agents. 1997;8:146-61.

26. Wentworth BB. Historical review of the literature on Q fever. *Bacteriol Rev.* 1955; 19: 129-49.
27. McDade JE. Historical aspects of Q fever. En: Marrie TJ, ed. *Q fever, the disease.* Boca Raton: CRC Press, 1990: 6-21.
28. Byrne W. Q fever. In Zajtchuk R, ed. *Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.* Washington, DC: US Department of the Army, Surgeon General, and the Borden Institute 1997: 523-37.
29. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5455-60.
30. Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol* 1999 ;7:149-54.
31. Omsland A, Hackstadt T, Heinzen RA. Bringing culture to the uncultured: *Coxiella burnetii* and lessons for obligate intracellular bacterial pathogens. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003540.
32. Willems H, Jäger C, Baljer G. Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* 1998 ;180:3816-22.
33. Minnick MF, Raghavan R. Genetics of *Coxiella burnetii*: on the path of specialization. *Future Microbiol.* 2011;6:1297-314.
34. Samuel JE, Frazier ME, Kahn ML, Thomashow LS, Mallavia LP. Isolation and characterization of a plasmid from phase I *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 1983;41:488-93.
35. Samuel JE, Frazier ME, Mallavia LP. Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 1985;49:775-9.
36. Mallavia, L.P. and Samuel, J.E. Genetic diversity of *Coxiella burnetii* strains. In: *Intracellular Parasitism*, (Moulder, J. Ed.), CRC Press, Boston. 1989; 117-126.
37. Valková D, Kazár J. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. *FEMS Microbiol Lett.* 1995;125:275-80.
38. Jäger C, Lautenschläger S, Willems H, Baljer G. *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Vet Microbiol.* 2002;89:161-6.

39. Voth DE, Beare PA, Howe D, Sharma UM, Samoilis G, Cockrell DC et al. The *Coxiella burnetii* cryptic plasmid is enriched in genes encoding type IV secretion system substrates. *J Bacteriol.* 2011;193:1493-503.
40. Jäger C, Willems H, Thiele D, Baljer G. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol Infect.* 1998;120:157-64.
41. Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP. Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J Gen Microbiol.* 1991;137:269-76.
42. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1211-7.
43. Arricau-Bouvery N1, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, et al. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.* 2006; 6:38.
44. Svraka S, Toman R, Skultety L, Slaba K, Homan WL. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;254:268-74.
45. Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA. Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol.* 2006;188:2309-24.
46. Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, Diatta G, Bassene H, Molez JF, et al. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e654.
47. Zhang G , To H, Russell KE, Hendrix LR, Yamaguchi T, Fukushi H, et al. Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect Immun.* 2005;73:1561-7.
48. Frangoulidis D , Splettstoesser WD, Landt O, Dehnhardt J, Henning K, Hilbert A, et al. Microevolution of the chromosomal region of acute disease antigen A (adaA) in the query (Q) fever agent *Coxiella burnetii*. *PLoS One.* 2013;8:e53440.
49. Fernández Guerrero ML. Fiebre Q en España : “una historia inconclusa”. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2014;32:211-2.

50. Komiya T, Sadamasu K, Toriniwa H, Kato K, Arashima Y, Fukushi H, et al. Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *J Infect Chemother.* 2003;9:151-5.
51. Marrie TJ, Campbell N, McNeil SA, Webster D, Hatchette TF. Q fever update, Maritime Canada. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:67-9.
52. Raoult D, Stein A. Q fever during pregnancy—a risk for women, fetuses and obstetricians. *N Eng J Med* 1994; 330: 371.
53. Tissot-Dupont H, Torres S, Nezri M, Raoult D. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am J Epidemiol* 1999; 150: 67-74.
54. Hawker JI, Ayres JG, Blair I, Evans MR, Smith DL, Burge PS et al. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Commun Dis Public Health* 1998; 1: 180-87.
55. Raoult D. Q fever, free amoeba, and air conditioning. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 869-70.
56. García-Pérez AL, Astobiza I, Barandika JF, Atxaerandio R, Hurtado A, Juste RA. Short communication: investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *J Dairy Sci.* 2009; 92: 1581-4.
57. Hatchette T, Hudson R, Schlech W, Campbell N, Hatchette J, Ratnam S, Donovan C, Marrie T. Caprine-associated Q fever in Newfoundland. *Can Commun Dis Rep* 2000; 26: 17-9.
58. Kanfer E, Farrag N, Price C, MacDonald D, Coleman J, Barrett A. Q fever following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1988; 3: 165-6.
59. Milazzo A, Hall R, Storm PA, Harris RJ, Winslow W, Marmion BP. Sexually transmitted Q fever. *Clin Infect Dis.* 2001;33:399-402.
60. Miceli MH, Veryser AK, Anderson AD, Hofinger D, Lee SA, Tancik C. A case of person-to-person transmission of Q fever from an active duty serviceman to his spouse. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010;10:539-41.
61. Rolain JM , Gouriet F, Brouqui P, Larrey D, Janbon F, Vene S, et al. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:82-8.
62. Pappas G, Blanco JR, Oteo JA. Q fever in Logroño: an attack scenario. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2007;25:199-203.

63. Palosno T, Leinikki P, Pettersson T et al. Hazards of expanding tourism: report of six cases of Q fever in Finland. *Scand J. Infect Dis.* 1974; 6: 173-176.
64. Potasman I, Rzotkiewicz S, Pick N, Keysary A. Outbreak of Q fever following a safari trip. *Clin Infect Dis.* 2000 ;30:214-5.
65. Brouqui P, Rolain JM, Foucault C, Raoult D. Short report: Q fever and *Plasmodium falciparum* malaria co-infection in a patient returning from the Comoros archipelago. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;73:1028-30.
66. Somasundaram R, Loddenkemper C, Zeitz M, Schneider T. A souvenir from the Canary Islands. *Lancet* 2006; 367: 1116.
67. Cohen NJ, Papernik M, Singleton J, Segreto J, Eremeeva ME. Q fever in an American tourist returned from Australia. *Travel Med Infect Dis.* 2007;5:194-5.
68. Ta TH, Jiménez B, Navarro M, Meije Y, González FJ, Lopez-Velez R. Q Fever in returned febrile travelers. *J Travel Med.* 2008 15:126-9.
69. Kobbe R, Kramme S, Gocht A, Werner M, Lippert U, May J, Burchard G. Travel-associated *Coxiella burnetii* infections: three cases of Q fever with different clinical manifestation. *Travel Med Infect Dis.* 2007;5:374-9.
70. Jensenius M, Davis X, von Sonnenburg F, Schwartz E, Keystone JS, Leder K, et al. Multicenter GeoSentinel analysis of rickettsial diseases in international travelers, 1996-2008. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1791-8.
71. Delord M, Socolovschi C, Parola P. Rickettsioses and Q fever in travelers (2004-2013). *Travel Med Infect Dis.* 2014;12:443-58.
72. Raoult D. Clinical presentation of acute australian Q fever. *Am J Med* 1994; 96: 397-398.
73. Sobradillo V, Ansola P, Baranda F. Neumonia por fiebre Q en España. *Arch Bronconeumol* 1986;22:227-32.
74. Prada J, LLorente A. Primer caso de fiebre Q humana en España. *Rev Iberica de Parasitologia* 1950; 10:275-9.
75. Pérez-Gallardo F, Clavero G, Hernández-Fernández S. Investigaciones sobre la epidemiología de la fiebre Q en España. Os conejos de monte y los lirones como reservorio de *Coxiella burnetii*. *Rev San Hig Pub.* 1952;26:81-7.

76. Sobradillo Peña V, Aguirre Errasti C, Villate Navarro JL, Antoñana Larrieta JM, Montejo Baranda M, Cisterna Cancer R. Fiebre Q: Brote epidémico en el País Vasco. Descripción de diez casos. *Med Clin (Barc)*. 1983;80:3-6.
77. Montejo Baranda M, Senosiain Gascue JM, Alvarez Blanco A, Hernández Almaraz JL, Aguirre Errasti C. Fiebre Q aguda. Estudio de 11 casos esporádicos en un área endémica. *Rev Clin Esp*. 1983;171:141-4.
78. Aguirre Errasti C, Montejo Baranda M, Hernandez Almaraz JL, de la Hoz Torres C, Martinez Gutierrez E, Villate Navarro JL, et al. An outbreak of Q fever in the Basque country. *Can Med Assoc J*. 1984;131:48-9.
79. Martínez-Luengas F, Borobio MV, Gálvez J, León de Lope M, Corral JL, Mañas R, et al. Fiebre Q en Sevilla. Comparación con otras entidades. Descripción de 34 casos y revisión. *Rev Clin Esp*. 1985;176:400-5.
80. Fernández Roblas R, Wilhelmi I, Díaz Curiel M, Gómez P, Aguado JM, Fernández Guerrero ML, et al. Fiebre Q aguda y crónica: clínica. epidemiología, aislamiento del agente y datos serológicos. *Rev Clin Esp*. 1985 ;177:62-9.
81. Montejo Baranda M, Corral Carranceja J, Aguirre Errasti C. Q fever in the Basque Country: 1981-1984. *Rev Infect Dis*. 1985;7:700-1.
82. Rubiés-Prat J, Martí J, Cuxart A, Clotet B. Forma hepática y febril autolimitada de la fiebre Q. *Med Clin (Barc)*. 1986 ; 86:261.
83. Fernández-Guerrero ML, Muelas JM, Aguado JM, Renedo G, Fraile J, Soriano F, et al. 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*. 1988;108:209-13.
84. Sobradillo V, Ansola P, Baranda F, Corral C. Q fever pneumonia: a review of 164 community-acquired cases in the Basque country. *Eur Respir J*. 1989;2:263-6.
85. Millán Mon A, Argany Fajardo A, Febles Bethencourt J, González Caloca C, Vento Remedios TE, Fernández Cabrera M. Fiebre Q en la isla de La Palma. Una revisión de 35 pacientes. *An Med Interna*. 1989;6:527-30.
86. Rotaecho del Campo R, Anta Unanue JL. Fiebre Q. Brote familiar de 5 casos. *Aten Primaria*. 1990;7:211-2, 214-5.

87. Antón Aranda E, Altuna Basurto E, García Martín C, Martí Cabane J, Bustillo Gutiérrez JM. Incidencia y características de la fiebre Q en un hábitat comarcal. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 1990;8:350-3.
88. Murie Carrillo de Albornoz M, Pérez de Heredia JH, Sánchez Alvarez J, Tiberio López G, Hernández Palacios R, Rivero Puente A. Epidemiología de las neumonías adquiridas en la comunidad del Área de Salud I de Navarra. *Med Clin (Barc).* 1991;97:50-2.
89. Martínez Eizaguirre JM, Pérez Rizo M, Olivella Pedregal A, García Ventura S, Cancio Fanlo M, Basabe Zapirain M. Fiebre Q. Brote epidémico de la forma febril pura. *Aten Primaria.* 1992 ;9:425-8.
90. Bella F, Espejo E, Mauri M, Alegre MD. Clinical presentation of acute australian Q fever. *Am J Med.* 1994;96:397-8.
91. Pascual Velasco F, Borobio Enciso MV, González Lama Z, Carrascosa Porras M. Clinical presentation of acute Q fever in Lanzarote (Canary Islands): a 2-year prospective study. *Scand J Infect Dis.* 1996;28:533-4.
92. Merino FJ, Nebreda T, Campos A. Most common clinical presentation of Q fever in a province in the north of Spain. *Eur J Epidemiol.* 1998;14:729-30.
93. Abad A, Pardo C, Imaz M. Fiebre Q: estudio retrospectivo de los últimos 10 años en el área del Hospital de Basurto (Bilbao). *Rev Clin Esp.* 1999;199:618-9.
94. Domingo P, Muñoz C, Franquet T, Gurguí M, Sancho F, Vazquez G. Acute Q fever in adult patients: report on 63 sporadic cases in an urban area. *Clin Infect Dis.* 1999; 29:874-9.
95. Nebreda T, Contreras E, Merino FJ, Dodero E, Campos A. [Outbreak of Q fever and seroprevalence in a rural population from Soria Province]. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2001;19:57-60.
96. Nuño Mateo FJ, Noval Menéndez J, Campoamor Serrano MT, del Valle Prieto A. Fiebre Q aguda en Asturias. *Rev Clin Esp* 2002;202:569-73
97. Alarcón A, Villanueva JL, Viciana P, López-Cortés L, Torronteras R, Bernabeu M, et al. Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. *J Infect.* 2003;47:110-6.

98. Bolaños M, Santana OE, Pérez-Arellano JL, Angel-Moreno A, Moreno G, Burgazzoli JL, et al. Fiebre Q en Gran Canaria: 40 nuevos casos. Enferm Infect Microbiol Clin. 2003; 21:20-3.
99. Sampere M , Font B, Font J, Sanfeliu I, Segura F. Q fever in adults: review of 66 clinical cases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003;22:108-10
100. Romero-Jiménez MJ, Suárez-Lozano I, Fajardo JM, Benavente A, Menchero A, de la Iglesia A. Hepatitis aislada como forma de presentación de la fiebre Q: características clínicas y epidemiológicas en 109 pacientes Enferm Infect Microbiol Clin. 2003;21:193-5.
101. Miguélez M, Laynez P, Linares M, Hayek M, Abella L, Marañez I. Tifus murino en Tenerife. Estudio clinicoepidemiológico y características clínicas diferenciales con la fiebre Q. Med Clin (Barc). 2003 ;121:613-5.
102. Bartolomé J, Marín A, Lorente S, Heredero E, Crespo MD. Fiebre Q aguda: 35 casos en Castilla-La Mancha. Enferm Infect Microbiol Clin 2004;22:292-4
103. Ramos JM, Masía M, Rodríguez JC, Gutiérrez F. Fiebre Q aguda en la Comunidad Valenciana. Estudio de 30 casos. Enferm Infect Microbiol Clin. 2005;23:512-3.
104. de los Ríos-Martín R, Sanz-Moreno JC, Martín-Martínez F, Tébar-Betegón MA, Cortés-García M, Escudero-Nieto R. Brote de fiebre Q en un área urbana asociado a la visita a una granja-escuela. Med Clin (Barc). 2006;126:573-5.
105. García-Clemente M, Seco-García AJ, Gutiérrez-Rodríguez M, Romero-Alvarez P, Fernández-Bustamante J, Rodríguez-Pérez M. Brote epidémico de neumonía por *Coxiella burnetii*. Enferm Infect Microbiol Clin. 2007;25:184-6.
106. Muñoz-Sanz A, Vera A, Rodríguez Vidigal FF. Fiebre Q en Extremadura: una infección emergente. Enferm Infect Microbiol Clin. 2007;25:230-4.
107. Ruiz Seco MP, López Rodríguez M, Estébanez Muñoz M, Pagán B, Gómez Cerezo JF, et al . Fiebre Q: 54 nuevos casos de un hospital terciario de Madrid Rev Clin Esp. 2011; 211: 240-4
108. Mogollón MV, Anguita MP, Aguado JM, Tornos P, Miró JM,Gálvez-Acebal J, et al. Q fever endocarditis in Spain. Clinical characteristics and outcome. Enferm Infect Microbiol Clin. 2011;29(2):109–116

109. Raya Cruz M, Gállego Lezaún C, García Gasalla M, Cifuentes Luna C, Forteza Forteza T, Fernández-Baca V et al. Fiebre Q aguda sintomática: 87 casos en un área de Mallorca. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 2014;32:213-8
110. Espejo E, Gil-Díaz A, Oteo JA, Castillo-Rueda R, García-Alvarez L, Santana-Báez S, et al. Clinical presentation of acute Q fever in Spain: seasonal and geographical differences. *Int J Infect Dis.* 2014;26:162-4.
111. Oteo JA, Pérez-Cortés S, Santibáñez P, Gutiérrez E, Portillo A, Blanco JR, et al. Q fever endocarditis associated with a cardiovascular implantable electronic device. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:E482-4.
112. Montes M , Cilla G, Vicente D, Nieto V, Ercibengoa M, Perez-Trallero E. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): a hyperendemic area of Q fever. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1078:129-32.
113. Lepe JA, Guerrero FJ, Ruiz-Calderón A, del Castillo E, Gómez-Salgado S, Jiménez-Alonso MA, et al. Epidemiología de la fiebre Q en la zona norte de Huelva *Enferm Infect Microbiol Clin.* 1999;17:65-8.
114. Daza Pérez RM, Castillo Ribera R, García-Carbajosa S, Ojeda Fernández E, Dámaso López D, Moreno López M. Estudio de la tasa de anticuerpos a *Coxiella burnetii* en la población sana. *Med Clin (Barc).* 1980 ;74 :52-4.
115. Tellez A, Martin A, Anda P, De la Fuente L, Benitez P, Garcia C, Leon P. Study of *C. burnetii* human and animal seroprevalence in a rural population in Madrid community. *Eur J Epidemiol.* 1989 ;5:444-6.
116. Cour Boveda MI, González Sinde MC, González Cuadrado S, Palau Beato ML, González Gómez C, Ferro Dalda A. *Coxiella burnetii*: estudio serológico en diferentes poblaciones. *An Med Interna (Madrid).* 1990;7:513-6.
117. Ruiz-Beltrán R, Herrero-Herrero JI, Martín-Sánchez AM, Martín-González JA. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii*, and *Rickettsia typhi* in Salamanca Province (Spain). Serosurvey in the human population. *Eur J Epidemiol.* 1990;6:293-9.
118. Pascual Velasco F, Rodríguez Pérez JC, Otero Ferrio I, Borobio Enciso MV. Seroprevalence of Q fever among the adult population of Lanzarote (Canary Islands). *An Med Interna.* 1992 ;9:428-32.

119. Saz JV, Bacellar F, Merino FJ, Filipe A. [Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and Rickettsia conorii infection in the province of Soria]. Enferm Infect Microbiol Clin. 1993; 11: 469-73.
120. Sanzo JM, Garcia-Calabuig MA, Audicana A, Dehesa V. Q fever: prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in the Basque country. Int J Epidemiol. 1993;22:1183-8.
121. Pérez-Trallero E, Cilla G, Montes M, Saénz-Dominguez JR, Alcorta M. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection among slaughterhouse workers in northern Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995;14:71-3.
122. Suárez-Estrada J, Rodríguez-Barbosa JI, Gutiérrez-Martín CB, Castañeda-López MR, Fernández-Marcos JM, González-Llamazares OR, et al. Seroepidemiological survey of Q fever in León province, Spain. Eur J Epidemiol. 1996;12:245-50.
123. Pascual-Velasco F, Montes M, Marimón JM, Cilla G. High seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in Eastern Cantabria (Spain). Int J Epidemiol. 1998;27:142-5.
124. Valencia MC, Rodriguez CO, Puñet OG, de Blas Giral I. Q fever seroprevalence and associated risk factors among students from the Veterinary School of Zaragoza, Spain. Eur J Epidemiol. 2000;16:469-76.
125. Cardeñosa N, Sanfeliu I, Font B, Muñoz T, Nogueras MM, Segura F. Short report: seroprevalence of human infection by *Coxiella burnetii* in Barcelona (northeast of Spain). Am J Trop Med Hyg. 2006;75:33-5.
126. Bartolomé J, Riquelme E, Hernández-Pérez N, García-Ruiz S, Luján R, Lorente S, et al. Seroepidemiología de la infección por *Coxiella burnetii* en donantes de sangre en Albacete. Enferm Infect Microbiol Clin. 2007;25:382-6.
127. González-Quijada S, Mora-Simón MJ, Martin-Ezquerro A. Association between serological evidence of past *Coxiella burnetii* infection and atherosclerotic cardiovascular disease in elderly patients. Clin Microbiol Infect. 2014 ;20:873-8.
128. Palau Beato L, Lopez Bartolome O, Cour Boveda MI, Gonzalez Sinde MC, Cuevas Beltran L, Garcia Lerin MC. *Coxiella burnetii*: Un estudio serológico de bóvidos en la Comunidad de Madrid. Rev Sanid Hig Publica (Madr). 1989;63:43-6.

129. Barandika JF, Hurtado A, García-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, et al. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73:6166-71.
130. Ruiz-Fons F, Rodríguez O, Torina A, Naranjo V, Gortázar C, de la Fuente J. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet Microbiol.* 2008;126:282-6.
131. Navarro JA, Ortega N, Buendia AJ, Gallego MC, Martínez CM, Caro MR, et al Diagnosis of placental pathogens in small ruminants by immunohistochemistry and PCR on paraffin-embedded samples. *Vet Rec.* 2009;165:175-8.
132. Ruiz-Fons F, Astobiza I, Barandika JF, Hurtado A, Atxaerandio R, Juste RA, et al Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. *BMC Vet Res.* 2010;6:3.
133. Astobiza I, Barral M, Ruiz-Fons F, Barandika JF, Gerrikagoitia X, Hurtado A, et al. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet Microbiol.* 2011;147:190-4.
134. Alvarez J, Perez A, Mardones FO, Pérez-Sancho M, García-Seco T, Pagés E, et al Epidemiological factors associated with the exposure of cattle to *Coxiella burnetii* in the Madrid region of Spain. *Vet J.* 2012;194:102-7.
135. Mentaberre G, Gutiérrez C, Rodríguez NF, Joseph S, González-Barrio D, Cabezón O, et al. A transversal study on antibodies against selected pathogens in dromedary camels in the Canary Islands, Spain. *Vet Microbiol.* 2013;167:468-73.
136. Barandika JF, Hurtado A, García-Sanmartín J, Juste RA, Anda P, García-Pérez AL. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008 ;8:829-35
137. Toledo A, Jado I, Olmeda AS, Casado-Nistal MA, Gil H, Escudero R, et al Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009;9:465-8.
138. Georgiev M, Afonso A, Neubauer H, Needham H, Thiery R, Rodolakis A, et al. Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill.* 2013;18. pii: 20407.
139. Frankel D, Richet H, Renvoisé A, Raoult D. Q fever in France, 1985-2009. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:350-6.

140. Bellini C, Magouras I, Chapuis-Taillard C, Clerc O, Masserey E, Peduto G, et al. Q fever outbreak in the terraced vineyards of Lavaux, Switzerland. *New Microbes New Infect.* 2014;2:93-9.
141. Speelman P. The largest Q fever outbreak ever reported. *Neth J Med.* 2010; 68: 380-1.
142. Roest HI, Tilburg JJ, van der Hoek W, Vellema P, van Zijderveld FG, Klaassen CH, et al. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol Infect.* 2011;139:1-12.
143. Dijkstra F, van der Hoek W, Wijers N, Schimmer B, Rietveld A, Wijkmans CJ, et al. The 2007–2010 Q fever epidemic in The Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;64:3-12.
144. Schneeberger PM, Wintenberger C, van der Hoek W, Stahl JP. Q fever in the Netherlands - 2007-2010: what we learned from the largest outbreak ever. *Med Mal Infect.* 2014;44:339-53.
145. Wattiau P, Boldisova E, Toman R, Van Esbroeck M, Quoilin S, Hammadi S, et al. Q fever in Woolsorters, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:2368-9.
146. Hellenbrand W, Breuer T, Petersen L. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:789-96.
147. Wallensten A, Moore P, Webster H, Johnson C, van der Burgt G, Pritchard G, et al Q fever outbreak in Cheltenham, United Kingdom, in 2007 and the use of dispersion modelling to investigate the possibility of airborne spread. *Euro Surveill.* 2010;15. pii: 19521.
148. Wilson LE, Couper S, Prempeh H, Young D, Pollock KG, Stewart WC, et al. Investigation of a Q fever outbreak in a Scottish co-located slaughterhouse and cutting plant. *Zoonoses Public Health.* 2010;57:493-8.
149. Hussain-Yusuf H, Islam A, Healy B, Lockhart M, Nguyen C, Sukocheva O, et al An analysis of Q fever patients 6 years after an outbreak in Newport, Wales, UK. *QJM.* 2012;105:1067-73.
150. McCaughey C, McKenna J, McKenna C, Coyle PV, O'Neill HJ, Wyatt DE, et al. Human seroprevalence to *Coxiella burnetii* (Q fever) in Northern Ireland. *Zoonoses Public Health.* 2008; 55:189-94.

151. Dupont HT , Brouqui P, Faugere B, Raoult D. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, and *Rickettsia typhi* in seven African countries. Clin Infect Dis. 1995;21:1126-33.
152. Letaief AO, Yacoub S, Dupont HT, Le Cam C, Ghachem L, Jemni L, et al . Seroepidemiological survey of rickettsial infections among blood donors in central Tunisia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89:266-8.
153. Niang M, Parola P, Tissot-Dupont H, Baidi L, Brouqui P, Raoult D. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi* and *Coxiella burnetii* in Mauritania. Eur J Epidemiol. 1998;14:817-8.
154. Okabayashi T, Hasebe F, Samui KL, Mweene AS, Pandey SG, Yanase T, et al Short report: prevalence of antibodies against spotted fever, murine typhus, and Q fever rickettsiae in humans living in Zambia. Am J Trop Med Hyg. 1999 ;61:70-2.
155. Steinmann P, Bonfoh B, Péter O, Schelling E, Traoré M, Zinsstag J. Seroprevalence of Q-fever in febrile individuals in Mali. Trop Med Int Health. 2005; 10:612-7.
156. Kobbe R, Kramme S, Kreuels B, Adjei S, Kreuzberg C, Panning M, et al Q Fever in Young Children, Ghana. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 344-346.
157. El Sayed Zaki M, Goda T. Clinico-pathological study of atypical pathogens in community-acquired pneumonia: a prospective study. J Infect Dev Ctries. 2009;3:199-205.
158. Lacheheb A, Raoult D. Seroprevalence of Q-fever in Algeria. Clin Microbiol Infect. 2009; 15 Suppl 2:167-8.
159. Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, Diatta G, Bassene H, Molez JF, Sokhna C, Trape JF, Raoult D. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. PLoS Negl Trop Dis. 2010 6;4:e654
160. Vanderburg S, Rubach MP, Halliday JE, Cleaveland S, Reddy EA, Crump JA. Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a OneHealth systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2787
161. Angelakis E, Mediannikov O, Socolovschi C, Mouffok N, Bassene H, Tall A, et al. Coxiella burnetii-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. Int J Infect Dis. 2014;28:107-10.

162. Koch A, Svendsen CB, Christensen JJ, Bundgaard H, Vindfeld L, Christiansen CB, Q fever in Greenland. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:511-3.
163. Snedeker KG, Sikora C. Q fever in Alberta, Canada: 1998-2011. *Zoonoses Public Health.* 2014;61:124-30.
164. Dahlgren FS , McQuiston JH , Massung RF , Anderson AD . Q fever in the United States: summary of case reports from two national surveillance systems, 2000-2012. *Am J Trop Med Hyg.* 2015 ;92:247-55.
165. Mc Quiston JH, Childs JE. Q fever in humans and animals in the United States. *Vector borne Zoonotic Dis* 2002;2:179-91.
166. Araujo-Meléndez J, Sifuentes-Osornio J, Bobadilla-del-Valle JM, Aguilar-Cruz A, Torres-Angeles O, Ramírez-González JL, et al What do we know about Q fever in Mexico? *Rev Invest Clin.* 2012;64:541-5.
167. Kourany M, Johnson KM. A survey of Q fever antibodies in a high risk population in Panama. *Am J Trop Med Hyg.* 1980 ;29:1007-11.
168. Wood H, Drebot MA, Dewailly E, Dillon L, Dimitrova K, Forde M et al. Seroprevalence of seven zoonotic pathogens in pregnant women from the Caribbean. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91:642-4.
169. Epelboin L, Chesnais C, Bouillé C, Drogoul AS, Raoult D, Djossou F, et al. Q fever pneumonia in French Guiana: prevalence, risk factors, and prognostic score. *Clin Infect Dis.* 2012 ;55:67-74
170. Eldin C, Mahamat A, Demar M, Abboud P, Djossou F, Raoult D. Q fever in French Guiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91:771-6.
171. Manock SR, Jacobsen KH, de Bravo NB, Russell KL, Negrete M, Olson JG, et al. Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon basin of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 ;81:146-51.
172. Lemos ER, Rozental T, Mares-Guia MA, Almeida DN, Moreira N, Silva RG, et al. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011;11:85-7.
173. Rozental T, Mascarenhas LF, Rozenbaum R, Gomes R, Mattos GS, Magno CC, et al. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the

Bibliografía

- repetitive element *IS1111* associated with the transposase gene. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:695-7.
174. Somma-Moreira RE, Caffarena RM, Somma S, Pérez G, Monteiro M. Analysis of Q fever in Uruguay. Rev Infect Dis. 1987;9:386-7.
175. Oren I, Kraoz Z, Hadani Y, Kassis I, Zaltzman-Bershadsky N, Finkelstein R. An outbreak of Q fever in an urban area in Israel. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24:338-41.
176. Ergas D, Keysari A, Edelstein V, Sthoeger ZM. Acute Q fever in Israel: clinical and laboratory study of 100 hospitalized patients. Isr Med Assoc J. 2006;8:337-41.
177. Amitai Z, Bromberg M, Bernstein M, Raveh D, Keysary A, David D, et al. A large Q fever outbreak in an urban school in central Israel. Clin Infect Dis. 2010;50:1433-8.
178. Gozalan A, Esen B, Rolain JM, Akin L, Raoult D. Is Q fever an emerging infection in Turkey?, East Mediterr Health J. 2005;11:384-91.
179. Almogren A, Shakoor Z, Hasanato R, Adam MH. Q fever: a neglected zoonosis in Saudi Arabia. Ann Saudi Med. 2013;33:464-8.
180. Scrimgeour EM, Al-Ismaily SI, Rolain JM, Al-Dhahry SH, El-Khatim HS, Raoult D. Q Fever in human and livestock populations in Oman. Ann N Y Acad Sci. 2003; 990:221-5.
181. El-Mahallawy HS, Lu G, Kelly P, Xu D, Li Y, Fan W, et al Q fever in China: a systematic review, 1989-2013. Epidemiol Infect. 2015;143:673-81
182. Chan JF, Tse H, To KK, Li IW, Tang BS, Cheng VC, Yuen KY. Q fever: underdiagnosed in Hong Kong? Hong Kong Med J. 2010;16:56-8.
183. Lai CH, Chen YH, Lin JN, Chang LL, Chen WF, Lin HH. Acute Q fever and scrub typhus, southern Taiwan. Emerg Infect Dis. 2009 ;15:1659-61.
184. Lai CH, Huang CK, Weng HC, Chung HC, Liang SH, Lin JN, et al. The difference in clinical characteristics between acute Q fever and scrub typhus in southern Taiwan. Int J Infect Dis. 2009;13:387-93.
185. Hung MN, Chou YF, Chen MJ, Hou MY, Lin PS, Lin CC, Lin LJ. Q fever outbreak in a small village, Taiwan. Taiwan Jpn J Infect Dis. 2010 ;63:212-3.

186. Porter SR, Czaplicki G, Mainil J, Horii Y, Misawa N, Saegerman C. Q fever in Japan: an update review. *Vet Microbiol.* 2011;149:298-306
187. Khalili M, Shahabi-Nejad N, Golchin M. Q fever serology in febrile patients in southeast Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010 ;104:623-4.
188. Metanat M, Sepehri Rad N, Alavi-Naini R, Shahreki S, Sharifi-Mood B, Akhavan A, et al. Acute Q fever among febrile patients in Zahedan, southeastern Iran. *Turk J Med Sci.* 2014;44:99-103.
189. Balakrishnan N, Menon T, Fournier PE, Raoult D. *Bartonella quintana* and *Coxiella burnetii* as causes of endocarditis, India. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1168-9.
190. Suputtamongkol Y, Rolain JM, Losuwanaruk K, Niwatayakul K, Suttinont C, Chierakul W, et al . Q fever in Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1186-7.
191. Angelakis E, Munasinghe A, Yaddehige I, Liyanapathirana V, Thevanesam V, Bregliano A, et al. Detection of rickettsioses and Q fever in Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 ; 86:711-2 .
192. Leone M, Honstettre A, Lepidi H, Capo C, Bayard F, Raoult D, et al. Effect of sex on *Coxiella burnetii* infection: protective role of 17beta-estradiol. *J Infect Dis.* 2004;189:339-45.
193. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:219-26.
194. Norlander L. Q fever epidemiology and pathogenesis. *Microbes Infect.* 2000;2:417-24.
195. Shannon JG, Heinzen RA. Adaptive immunity to the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*. *Immunol Res.* 2009;43:138-48.
196. Ghigo E , Pretat L, Desnues B, Capo C, Raoult D, Mege JL. Intracellular life of *Coxiella burnetii* in macrophages. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1166:55-66.
197. Omsland A , Heinzen RA. Life on the outside: the rescue of *Coxiella burnetii* from its host cell. *Annu Rev Microbiol.* 2011; 65: 111-28 .
198. van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11:561-73.

199. Graham JG, MacDonald LJ, Hussain SK, Sharma UM, Kurten RC, Voth DE. Virulent *Coxiella burnetii* pathotypes productively infect primary human alveolar macrophages. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:172
200. Meghari S, Honstettre A, Lepidi H, Ryffel B, Raoult D, Mege JL. TLR2 is necessary to inflammatory response in *Coxiella burnetii* infection. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1063:161-6.
201. Ochoa-Repáraz J, Sentissi J, Trunkle T, Riccardi C, Pascual DW. Attenuated *Coxiella burnetii* phase II causes a febrile response in gamma interferon knockout and Toll-like receptor 2 knockout mice and protects against reinfection. *Infect Immun.* 2007;75:5845-58.
202. Read AJ, Erickson S, Harmsen AG. Role of CD4+ and CD8+ T cells in clearance of primary pulmonary infection with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 2010 ;78:3019-26
203. Bewley KR. Animal models of Q fever (*Coxiella burnetii*). *Comp Med.* 2013;63:469-76.
204. Urso FP. The pathologic findings in rickettsial pneumonia. *Am J Clin Pathol.* 1975;64:335-42.
205. Janigan DT, Marrie TJ. An inflammatory pseudotumor of the lung in Q fever pneumonia. *N Engl J Med.* 1983 ;308:86-8.
206. Silver SS, McLeish WA. "Doughnut" granulomas in Q fever. *Can Med Assoc J.* 1984; 130: 102-4.
207. Argov O, Weintraub M, Charach G. "Doughnut" granulomas from erythema nodosum in acute Q fever. *Isr Med Assoc J.* 2008;10:241-2.
208. Herndon G, Rogers HJ. Multiple "doughnut" granulomas in *Coxiella burnetii* infection (Q fever). *Blood.* 2013 ;122:3099.
209. Lepidi H, Houpikian P, LiangZ, Raoult D. Cardiac valves in Patients with Q Fever Endocarditis: Microbiological, Molecular, and Histologic Studies. *J Infect Dis* 2003;187:1097-106.
210. Tyczka J, Maass W, Jäger C, Menge C, Baljer G. Differences in cytokine mRNA profiles between naïve and in vivo-primed ovine PBMC after exposure to heat-inactivated *Coxiella burnetii*. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 ;990:460-7.

211. Ghigo E, Imbert G, Capo C, Raoult D, Mege JL. Interleukin-4 induces *Coxiella burnetii* replication in human monocytes but not in macrophages. Ann N Y Acad Sci. 2003; 990: 450-9.
212. Honstettre A, Imbert G, Ghigo E, Gouriet F, Capo C, Raoult D, Mege JL. Dysregulation of cytokines in acute Q fever: role of interleukin-10 and tumor necrosis factor in chronic evolution of Q fever. J Infect Dis. 2003 ;187:956-62.
213. Zamboni DS , Campos MA, Torrecilhas AC, Kiss K, Samuel JE, Golenbock DT, et al. 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. 2004; 279: 54405-15.
214. Benoit M, Barbarat B, Bernard A, Olive D, Mege JL. *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages. Eur J Immunol. 2008 ;38:1065-70.
215. Benoit M, Ghigo E, Capo C, Raoult D, Mege JL. The uptake of apoptotic cells drives *Coxiella burnetii* replication and macrophage polarization: a model for Q fever endocarditis. PLoS Pathog. 2008;4:e1000066.
216. Vázquez CL, Colombo MI. *Coxiella burnetii* modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. Cell Death Differ. 2010; 17:421-38.
217. Faugaret D, Ben Amara A, Alingrin J, Daumas A, Delaby A, Lépolard C, et al . Granulo-matous response to *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever: the lessons from gene expression analysis. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4:172.
218. Conti F, Boucherit N, Baldassarre V, Trouplin V, Toman R, Mottola G, et al *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide blocks p38 α -MAPK activation through the disruption of TLR-2 and TLR-4 association. Front Cell Infect Microbiol. 2015;4:182.
219. Ammerdorffer A, Stappers MH, Oosting M, Schoffelen T, Hagenaars JC, Bleeker-Rovers CP, et al. Genetic variation in TLR10 is not associated with chronic Q fever, despite the inhibitory effect of TLR10 on *Coxiella burnetii*-induced cytokines in vitro. Cytokine. 2015 . pii: S1043-4666(15)30058-2. [Epub ahead of print]
220. Ammerdorffer A , Schoffelen T , Gresnigt MS , Oosting M , den Brok MH , Abdollahi-Roodsaz S, et al Recognition of *Coxiella burnetii* by toll-like receptors and

Bibliografía

- nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. *J Infect Dis.* 2015;211:978-87.
221. Schoffelen T, Ammerdorffer A, Hagenaars JC, Bleeker-Rovers CP, Wegdam-Blans MC, Wever PC, et al. Genetic Variation in Pattern Recognition Receptors and Adaptor Proteins Associated With Development of Chronic Q Fever. *J Infect Dis.* 2015; 212:818-29.
222. Lai CH, Lin JN, Chang LL, Chen YH, Lin HH. Circulating cytokines and procalcitonin in acute Q fever granulomatous hepatitis with poor response to antibiotic and short-course steroid therapy: a case report. *BMC Infect Dis.* 2010;10:193.
223. Everett B, Cameron B, Li H, Vollmer-Conna U, Davenport T, Hickie I, et al Polymorphisms in *Toll*-like receptors-2 and -4 are not associated with disease manifestations in acute Q fever. *Genes Immun.* 2007;8:699-702.
224. Layez C, Brunet C, Lépolard C, Ghigo E, Capo C, Raoult D, Mege JL. Foxp3(+) CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are increased in patients with *Coxiella burnetii* endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012;64:137-9.
225. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:518-53.
226. Marrie TJ, Durant H, Yates L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5- year prospective study. *Rev Infect Dis.* 1989; 11:586-99.
227. Lieberman D, Schlaeffer F, Boldur I, Lieberman D, Horowitz S, Friedman MG et al. Multiple pathogens in adults patients admitted with community-acquired pneumonia: a ne year prospective study of 346 consecutive pacientes. *Thorax.*1996;51:179-84.
228. Gikas A, Kokkinis S, Tsiotis C. Q fever: Clnical manifestations and treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther.*2010 ;8:529-39.
229. Raoult D. Chronic Q fever:Expert opinion versus literature analysis and consensus. *J Infect* 2012;65:102-8.
230. Million M, Roblot F, Carles D, D'Amato F, Protopopescu C, Carrieri MP, Raoult D. Reevaluation of the risk of fetal death and malformation after Q fever. *Clin Infect Dis.* 2014; 59:256-60.

231. Willems H, Thiele D, Frölich-Ritter R, Krauss H. Detección de *Coxiella burnetii* en leche de vaca usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). J Med . 1994;41:580-4.
232. Fournier P, Raoult D. Comparison of PCR and Serology Assays for Early Diagnosis of acute Q fever. J Clin Microbiol. 2003;41:5094-8.
233. Schneeberger PM. Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. Clinical and vaccine Immunology 2010 ;2:286-290.
234. Jatton K, Peter O, RaoultD. Development of high throughput PCR to detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. New Microbe New Infect 2013; 1:6-12.
235. Ughetto E, Gouriet F, Raoult D, Rolain JM. Three years experience of real-time PCR for the diagnosis of Q fever. Clin Microbiol Infect . 2009. 15 (Suppl. 2) 200-1.
236. Raele DA, Garofolo G, Galante D, Cafiero MA. Molecular detection of *Coxiella burnetii* using an alternative loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) Vet Ital 2015;71:73-8.
237. CDC. Diagnosis and management of Q fever- United States,2013. Recomendations from CDC and the Q fever Working Group. MMWR. Morbidity and mortality weekly report 2013;62 (RR03): 1-23.
238. Marrie TJ. Q fever endocarditis. Lancet Infect Dis. 2010;10:507-9.
239. O'Neill TJ, Sargeant JM, Poljak Z. A systematic review and meta-analysis of phase I inactivated vaccines to reduce shedding of *Coxiella burnetii* from sheep and goats from routes of public health importance. Zoonoses Public Health 2014;61: 519-33-4.
240. Astobiza I, Barandika JF, Ruiz-Fons F, Hurtado A, Povedano, I, Juste RA et al. Four year evaluation of the effect of vaccination against *Coxiella burnetii* on reduction of animal infection and environmental contamination in a naturally infected dairy sheep flock. Appl Environ Microbiol 2011; 77:7405-7.
241. Astobiza I, Barandika JF, Juste RA, Hurtado A, García-Pérez AL. Evaluation of the efficacy of oxytetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock. Vet J. 2013; 196:81-5.
242. Million M, Raoult D. Recent advances in the study of Q fever epidemiology, diagnosis and management. J Infect 2015;71 Suppl 1:S2-9 .

243. Merhej V, El Kaekouri K, Raoult D. Whole genome-based phylogenetic analysis of Rickettsiae. *Clin Microbiol Infect* 2009; Suppl2:336-7.
244. Mooser H, Ruiz-Castañeda M, Zinsser H. The transmission of the virus of mexican typhus from rats to rat by polyplax spinulosus. *J Exp Med* 1931;1564-75.
245. Azad AF. Epidemiology of murine typhus. *Annu Rev Entomol* 1990; 35:553-69.
246. U.S. Army Medical Department. Disponible en:
<http://history.amedd.army.mil/booksdocs/itsfirst50yrs/section1.1.htm>
247. Science Nevos Online. Disponible en
http://www.sciencenews.org/20010224_timeline.asp
248. Ortiz Leiva C, Murillo Cabezas F, Muñoz Sánchez A, Maravi Petri J. Una entidad poco frecuente en cuidados intensivos: Rickettsiosis. *Med Intens* 1979 ; 3:90-92
249. García Curiel A, Martín Martín A, Torronteras R, Vargas Romero, López Cortés LF. Rickettsiosis: presentación de 13 casos. *Rev Clín Esp* 1982; 164: 119-122
250. López Cortés LF, Pachón Díaz J, Viciana Fernández P, Cuello Contreras JA, Palomino Nicas J, Carneado de la Fuente J, et al. R. Tifus murino: revisión clínica y serológica de 42 casos. *Med Clin (Barc)* 1983; 835-838
251. Moreno Castillo JL, Sanchez Roman J, Pamies Andreu E, Morales Sandino M, Vazquez Garcia F, Torronteras Santiago R. Pleuropericarditis causada por Rickettsia mooseri. Una manifestación inhabitual del tifus murino *Rev Clin Esp* 1984;173:125-7
252. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:657-702.
253. Merhej V, Angelakis E, Socolovschi C, Raoult D. Genotyping, evolution and epidemiological finding of Rickettsia species. *Infect Genet Evol*; 204:26:122-37.
254. McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlandar SK, Fox GE, et al. Complete genoma sequence of Rickettsia typhi and comparison with sequences of other Rickettsiae. *J of Bacteriol* 2004;186:5842-55.
255. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:694-19.

256. Azad AF, Radulovic S, Higgins JA, Noden BH, Troyer JM. Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations. *Emerg Infect Dis* 1997;3:319-27
257. Higgins JA, Radulovic S, Schriefer ME, Azad AF. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. *J Clin Microbiol* 1996;34:671-674
258. Raoult D, Scola BL, Enea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F et al. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis* 2001;7:73-81
259. Boostrom A, Beier MS, Macaluso JA, Macaluso KR, Sprenger D, Hayes J et al. Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:549-554
260. Márquez FJ, Muniaín MA, Pérez JM, Pachón J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:89-91
261. Lledó L, Gegúndez MI, Saz JV, Beltran M. Prevalence of antibodies to *Rickettsia typhi* in an area of the center of Spain. *Eur J Epidemiol* 2001;17:927-8
262. Santibáñez S, Astasia A, Villa-Real R, Cámara JA, Oteo JA, Márquez FJ. Serologic study of *Rickettsia typhi* infection among the human population of southern Spain. *Clinical Microbiol Infect* 2009;15: 247-8.
263. Nogueras MM, Cardeñosa N, Sanfeliu I, Muñoz T, Font B, Segura F. Evidence of infection in humans with *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in Catalonia in the Northeast of Spain. *AnnN.Y.Acad. Sci.* 2006;1078:159-161.
264. Daniel SA, Manika K, Arvanmdou M, Antoniadis A. Prevalence of *Rickettsia conorii* and *Rickettsia typhi* infections in the population of northern Greece. *Am J Trop Med Hyg.* 2002 ;66:76-9.
265. Punda-Polic V, Leko-Grbic J, Radulovic S. Prevalence of antibodies to rickettsiae in the north-western part of Bosnia and Herzegovina. *Eur J Epidemiol.* 1995;11:697-9353.
266. Badiaga S, Benkouiten S, HajjiH, Raoult D, Brouqui P. Murine typhus in homeless. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis.* 2012; 35:39-43.
267. Comer JA, Diaz T, Vlahov D, Monterroso E, Childs JE. Evidence of rodent-associated *Bartonella* and *Rickettsia* infections among intravenous drug users from Central and East Harlem, New York City. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:855-60
268. Smith HM, Reporter R, Rood MP, Linscott,AJ, Mascola LM, Hogrefe W, Purcell RH. Prevalence study of antibody to ratborne pathogens and other agents

among patients using a free clinic in downtown Los Angeles. J Infect Dis 2002;186:1673-6

269. Marshall GM. *Rickettsia typhi* seroprevalence among children in the Southeast United States Ped Infect Dis J 2000; 19:1103-1104
e Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2012.35:39-43.

270. Purcell K, FergienJ, Richman K, Rocha L. Murine typhus in children, South Texas. Emerging Infectious Diseases 2007; 13:926-7.

271. Acuna-Soto R, Calderon-Romero L, Romero-Lopez D, Bravo-Lindoro A. Murine typhus in Mexico City. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94:45.

272. Meskini M, Beati L, Benslimane A, Raoult D. Seroepidemiology of rickettsial infections in Morocco. Eur J Epidemiol. 1995 ;11:655-60.

273. Anstey NM, Tissot Dupont H, Hahn CG, Mwaikambo ED, McDonald MI, Raoult D, Sexton DJ. Seroepidemiology of *Rickettsia typhi*, spotted fever group rickettsiae, and *Coxiella burnetti* infection in pregnant women from urban Tanzania. Am J Trop Med Hyg 1997;57:187-9

274. Dill T, Dobler G, Saathoff E, Clowes P, Kroidl I, Ntinginya E, Machibya H, Maboko L, Löscher T, Hoelscher M, Heinrich N. High Seroprevalence for Typhus Group Rickettsiae, Southwestern Tanzania. Emerging Infectious Diseases 2013; 19:317-20.

275. Richards AL, Soeatmadji DW, Widodo MA, Sardjono TW, Yanuwiadi B, et al. Seroepidemiologic evidence for murine and scrub typhus in Malang, Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 1997;57:91-5.

276. Strickman D, Tanskul P, Eamsila C, Kelly DJ. Prevalence of antibodies to rickettsiae in the human population of suburban Bangkok. Am J Trop Med Hyg. 1994;51:149-53.

277. Maude RR, Maude RJ, Ghose A, Amin MR, Islam MB, Ali M, et al. Serosurveillance of *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia typhi* in Bangladesh. Am J Trop Med Hyg 2014; 580-3.

278. Dumler JS, Taylor JP, Walker DH. Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987. JAMA 1991; 266:1365-70.

279. Silpapojakul K, Chayakul P, Krisanapan S. Murine typhus in Thailand: Clinical features, diagnosis and treatment . Q J Med 1993; 86:43 -47.

280. Fergie JE, Purcell K, Wanat D. Murine typhus in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19:535-8.
281. Whiteford SF, Taylor JP, Dumler JS. Clinical, laboratory, and epidemiologic features of murine typhus in 97 Texas children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:396-400
282. Gikas A, Doukakis S, Pediaditis J, Kastanakis S, Psaroulaki A, Tselentis Y. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical and therapeutic data from 83 cases. *Trans Roy Soc Trop Med Hygiene* 2002. 96:250-253
283. Hernández-Cabrera M , Angel-Moreno A, Santana E, Bolaños M , Francès A, Martín-Sánchez AM et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:740-3.
284. Gray E, Atatoa-Carr P, Bell A, Roberts S, Mudallal DA, Mills G. Murine typhus : a new recognised problema in the Waikato régión of New Zealand. *The New Zealand Medical Journal* 2007;120:1259-61. URL: <http://www.nzma.org.nz/journal/120-1259/2661/>
285. Koliou M, Psaroulaki A, Georgiou C, Ioannou I, Tselentis Y, Gikas A. Murine typhus in Cyprus:21 paediatric cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.2007; 26:491-3.
286. Gikas A, Kokkiki S, Tsiotis C, Athenessopoulos D, Balomenaki E, Blasak S, Matheou C, Tselentis Y, Psaroulaki A. Murine Typhus in children: clinical and laboratory features from 41 cases in Crete. *Clin Microbiol Infec*. 2009;15 (supp):211-2.
287. Adjemian J, Parks s, McElroy K, Campbell J, Eremeeva ME, Nicholson WL, McQuiston J, Taylor J. Murine typhus in Austin, Texas, USA ,2008. *Emerging Infect Dis*. 2010;16:412-7.
288. Zimmerman MD, Murdoch DR, Rozmajzl PJ, Basnyat B, Woods CW, Richards AL, Belbase RH, Hammer DA, Anderson TP, Reller LB. Murine typhus and febrile illness, Nepal. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:16569.
289. Chang K, Chen YH, Lee NY, Lee HC, Lin CY, Tsai JJ, Lu PL, Chen TC, Hsieh HC, Lin WR, Lai PC, Chang CM, Wu CJ, Lai CH, Ko WC. Murine typhus in southern Taiwan during 1992-2009. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 84:141-7.

290. Walker G, Botelho-Nevers E, Socolovski C, Raoult D, Parola P. Murine Typhus in returned travelers: a report of 32 cases. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86:1049-53.
291. Chaliotis G, Kritsotakis EI, Psaroulaki A, Tsellentis Y, Gikas A. Murine typhus in central Greece: epidemiological, clinical, laboratory, and therapeutic-response features of 90 cases. *Intern J of Infect Dis.* 2012;16:591-6.
292. Znazen A, Hammami B, Mustapha AB, Chaari S, Lahiani D, Maaloul I, Jemaa MB, Hammami A. Murine typhus in Tunisia: A neglected cause of fever as a single symptom. *Medicine et maladies infectieuses* 2013. 43: 226-9.
293. Aouam A, Toumi A, Brahim HB, Loussaief C, Jelliti B, Romdhane FB, Yahia SB, Khairallah M, Chakroun M. Epidemiological, clinical and laboratory features of murine typhus in central Tunisia. *Médecine et maladies infectieuses* 2015;45:124-7.
294. Balleydier E, Camuset G, Socolovschi C, Moiton MP, Kuli B, Foucher A et al. Murine typhus, Reunion, France, 2011-2013. *Emerging Infect Dis.* 2015;22:316-9.
295. Hamaguchi S, Cuong NC, Tra DT, Doan YH, Simizu K, et al. Clinical and epidemiological characteristics of scrub typhus, and murine typhus among hospitalized patients with acute undifferentiated fever in northern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 2015;92:972-8.
296. Tsioritis C, Chaliotis G, Kokkini S, Doukakis S, Tsellentis Y, Psaroulaki A, Gikas A. *Scand J Infect Dis* 2014;46:779-82.
297. Radulovic S, Price PW, Beier MS, Gaywee J, Macaluso JA, Azad A. Rickettsia-macrophage interactions: host cell responses to *Rickettsia akari* and *Rickettsia typhi*. *Infect and Immun.* 2002;70:2576-82.
298. Shaked Y, Shpilberg O, Samra Y. Involvement of the kidneys in Mediterranean spotted fever and murine typhus. *Q J Med* 1994; 87:103-107.
299. Rosenthal T, Michaeli D. Murine typhus and spotted fever in Israel in the seventies. *Infection.* 1977;5:82-84
300. Whelton A, Douglas JV, Elisberg BI. Acute renal failure complicating rickettsial infection in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. *Ann Intern Med.* 1968;69:323-8

301. Silpapojakul K, Mitarnun W, Ovartlarnporn B, Chamroonkul N, Khow-Ean U. Liver involvement in murine typhus. *QJM* . 1996;89:623-9
302. Pascual Velasco F, Borobio Enciso MV. [Acute suppurative arthritis: an unusual manifestation of murine typhus (endemic)]. *Med Clin (Barc)*.1991 ;97:142-3
303. Potasman I, Bassan HM. Pulmonary embolism complicating murine thypus. *J R Soc Med* 1986; 79: 367-368
304. Buchs AE, Zimlichman R, Sikuler E, Goldfarb B. Murine typhus endocarditis. *South Med J* 1992 ; 85:751-3
305. Austin SM, Smith SM, Co B, Coppel IG, Johnson JE. Serologic evidence of acute murine typhus infection in a patient with culture-negative endocarditis. *Am J Med Sci* 1987;293:320-3
306. Pether JV, Jones W, Lloyd G, Rutter DA, Barry M. Fatal murine thypus from Spain. *Lancet* 1994; 344:897-8
307. Bernabeu-Wittel M, Villanueva-Marcos JL, de Alarcón-González A, Pachón J. Septic shock and multiorganic failure in murine thypus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:131-132
308. Hudson HL, Thach AB, Lopez PF. Retinal manifestations of acute murine typhus. *Int Ophthalmol* 1997;21:121-6
309. Lu TM, Kuo BI, Chung YM, Liu CY . Murine typhus presenting with multiple white dots in the retina. *Scand J Infect Dis* 1997;29:632-3
310. Manor E, Politi F, Marmor A, Cohn DF. Papilledema in endemic typhus. *Am J Ophthalmol* 1977;84:559-62
311. Masalha R, Merkin-Zaborsky H, Matar M, Zirkin HJ, Wirguin I, Herishanu YO. Murine typhus presenting as subacute meningoencephalitis. *J Neurol* 1998;245:665-8
312. Massung RF, Davis LE, Slater K, McKechnie DB, Puerzer M. Epidemic typhus meningitis in the southwestern United States. *Clin Infect Dis* 2001;32:979-82
313. Lozano de León F, Lucio-Villegas ME, López LF, Gómez-Mateos J, García-Bragado F. Afectación parotídea en el tifus murino *Enf Infect Microbiol Clin* 1991;9:585

314. Rabau MY, Wolfstein I. Murine typhus-an unusual cause for intestinal pseudo-obstruction. *Dig Dis Sci* 1980; 25:314-5
315. McKelvey SD, Braidly PC, Stansby GP, Weir WR. Spontaneous splenic rupture associated with murine typhus. *J Infect* 1991; 22:296-297.
316. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 2715-2727
317. Hersey DF, Colvin MC, Shepard CC. Studies on the serologic diagnosis of murine typhus and Rocky Mountain spotted fever. *J. Immunol.* 1957; 79:409-415.
318. Fiset P, Ormsbee RA, Silberman R, Peacock M, Spielman MH. A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. *Acta Virol*. 1969; 13:60-6.
319. Chang RS, Murria ES, Zinder JC. Erythrocyte-sensitizing substances from rickettsiae of the Rocky Mountain spotted fever group. *J Immunol*. 1954; 73:8-15.
320. Hechemy KE, Anacker RL, Philip RN, Kleeman KT, MacCormack JN, Sasowski SJ, Michaelson EE. Detection of Rocky Mountain spotted fever antibodies by a latex agglutination test. *J Clin Microbiol* 1980; 12:144-150.
321. Philip RN, Casper EA., Ormsbee RA, Peacock MG, Burgdorfer W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. *J Clin Microbiol* 1976; 3: 51-61.
322. Halle S, Dasch GA, Weiss E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against typhus rickettsiae, *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi*. *J Clin Microbiol*. 1977; 6:101-110.
323. Kelly DJ, Wong PW, Gan E, Lewis GE Comparative evaluation of the indirect immunoperoxidase test for the serodiagnosis of rickettsial disease. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 38:400-406
324. Kelly DJ, Chan CT, Paxton K, Thompson K, Howard R, Dasch GA. Comparative Evaluation of a Commercial Enzyme Immunoassay for the Detection of Human Antibody to *Rickettsia typhi*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 356-360
325. Sompolinsky D, Boldur I, Goldwasser RA, Kahana H, Kazak R, Keysary A, Pik A. Serological cross-reactions between *Rickettsia typhi*, *Proteus vulgaris*

OX19, and *Legionella bozemanii* in a series of febrile patients. *Isr J Med Sci* 1986;22:745-52

326. Vestris G, Rolain JM, Fournier PE, Birg ML, Enea M, Patrice JY, et al. Seven years' experience of isolation of *Rickettsia* sp. from clinical specimens using the shell vial cell culture assay. *Ann NY Acad Sci* 2003; 990: 371-374

327. Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64:126-9.

328. Giulieri S, Jaton K, Cometta A, Trellu LT, Greub G. Development of duplex real-time PCR for the detection of *Rickettsia* spp. and typhus group rickettsia in clinical samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64:92-97.

329. Rolain JM, Stuhl L, Maurin M, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46:2747-2751

330. Rolain JM, Maurin M, Vestris G, Raoult D. In vitro susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:1537-1541

331. Laferl H, Fournier PE, Seiberl G, Pichler H, Raoult D. Murine typhus poorly responsive to ciprofloxacin: a case report. *J Travel Med*. 2002 ;9:103-4.

332. Rolain JM, Maurin M, Bryskier A, Raoult D. In vitro activities of telithromycin (HMR 3647) against *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella bacilliformis*, and *Ehrlichia chaffeensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 : 1391-3.

333. Botelho-Nevers E, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Treatment of *Rickettsia* spp. infections: a review. *Expert Rev. Anti Infect Ther*. 2012.10,1425-37.

OBJETIVOS

La **revisión previa** concreta un número importante de aspectos relevantes acerca de la fiebre de duración intermedia y de dos de sus agentes causales principales: *Coxiella burnetii* y *R. typhi*. Sin embargo, también se detectan varios aspectos poco aclarados acerca de los agentes causales de este síndrome, que constituyen el **objetivo general** de este proyecto doctoral.

Los **objetivos específicos (OE)** han sido:

OE1. La búsqueda de **agentes causales diferentes** a los mencionados como causa de fiebre de duración intermedia.

OE2. La identificación de **genotipos específicos de Coxiella burnetii** en Gran Canaria.

OE3. El estudio de la seroprevalencia de infección por **Coxiella burnetii** y **Rickettsia typhi** en el archipiélago canario.

OE4. El estudio del **ciclo doméstico y silvestre** de las infecciones por ambos micro-organismos en Gran Canaria.

OE5. La utilidad de las **técnicas moleculares** en el diagnóstico precoz de la infección por *Coxiella burnetii* y *Rickettsia typhi* en casos de fiebre de duración intermedia.

Todos los datos ya han sido publicados o remitidos para su publicación siendo las referencias bibliográficas las siguientes:

• **OE1**

OE1.1. Pérez-Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A, Bolaños M, Hernández M, Santana E, Hemmersbach-Miller M, Martín AM, Raoult D. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:1961-4.
IF: 6,75 Cuartil: Q1 (3/78 Infectious Diseases)

OE1.2. Bolaños M, Santana E, Carranza C, Anda P, Jado I, Hernández-Cabrera M, Martín-Sánchez AM, Pérez-Arellano JL. *Anaplasma phagocytophilum* is not an aetiological agent of fever of intermediate duration in Gran Canaria (Spain). *Clin Microbiol Infect*. 2009;15 Suppl 2:6-7. **IF: 5,76 Cuartil: Q1 (5/78 Infectious**

Diseases)

- **OE1.3.** Fernández de Mera IG, Zivkovic Z, Bolaños M, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Gutiérrez C, de la Fuente J. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1869-70. **IF:** 6,75 **Cuartil:** Q1 (3/78 Infectious Diseases)

• **OE2**

OE2.1. Jado I, Carranza-Rodríguez C, Barandika JF, Toledo Á, García-Amil C, Serrano B, Bolaños M, Gil H, Escudero R, García-Pérez AL, Olmeda AS, Astobiza I, Lobo B, Rodríguez-Vargas M, Pérez-Arellano JL, López-Gatius F, Pascual-Velasco F, Cilla G, Rodríguez NF, Anda P. Molecular method for the characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. *BMC Microbiol.* 2012;12:91. **IF:** 2,72 **Cuartil:** Q2 (51/119 Microbiology)

• **OE3.**

OE3.1. Bolaños M, Santana OE, Angel-Moreno A, Pérez-Arellano JL, Limiñana JM, Serra-Majem L, Martín-Sánchez AM. Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). *Eur J Epidemiol.* 2003;18:259-62. **IF:** 5,33 **Cuartil:** Q1 (8/151 Public, Environmental & Occupational Health)

OE3.2. Bolaños-Rivero M, Santana-Rodriguez E, Angel-Moreno A, Hernández-Cabrera M, Limiñana-Canal JM, Carranza-Rodríguez C, Martín-Sánchez AM, Pérez-Arellano JL. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infections in the Canary Islands (Spain). *Int J Infect Dis.* 2011;15:e481-5. **IF:** 1,85 **Cuartil:** (Q3 56/78 Infectious Diseases)

• **OE4**

OE4.1. Rodríguez NF, Carranza C, Bolaños M, Pérez-Arellano JL, Gutiérrez C. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Gran Canaria Island, Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2010;57:66-7. **IF:** 2,94 **Cuartil:** Q1 (1/133)

Veterinary Sciences)

OE4.2. Bolaños-Rivero M, Carranza-Rodriguez C, Gutierrez C, Rodriguez NF, Pérez Arellano JL. Detection of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp DNA in wildlife animals and ticks on Gran Canaria island (Spain). (En revisión editorial por *Vet Microbiol*)

• **OE5**

OE5.1. Bolaños M, Santana OE, Pérez-Arellano JL, Angel-Moreno A, Moreno G, Burgazzoli JL, Martín-Sánchez AM. Fiebre Q en Gran Canaria. 40 nuevos casos. Enferm Infect Microbiol Clin. 2003 ;21:20-3 **IF:** 2,17 **Cuartil:** Q3 (53/78 Infectious Diseases)

OE5.2. Hernández Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E, Bolaños M, Francès A, Martín-Sánchez MS, Pérez-Arellano JL. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. Emerg Infect Dis. 2004;10:740-3. **IF:** 6,75 **Cuartil:** Q1 (3/78 Infectious Diseases)

OE5.3. Bolaños-Rivero M, Carranza-Rodríguez C, Hernández-Cabrera M, Pisos Álamo E, Jaén Sánchez N, Pérez Arellano JL. Utilidad del diagnóstico molecular precoz de la fiebre de duración intermedia (En revisión editorial por *Enf Infec Microbiol Clin*)

Otras publicaciones relacionadas con el proyecto doctoral (incluidas en forma de ANEXO) han sido:

A.1. Angel-Moreno A, Bolaños M, Santana E, Pérez-Arellano JL. Tifus murino importado de Senegal en un inmigrante viajero. Enferm Infect Microbiol Clin. 2006; 24: 406-7. **IF:** 2,17 **Cuartil:** Q3 (53/78 Infectious Diseases)

A.2. Bolaños M, Angel-Moreno A, Pérez-Arellano JL. Tifus murino. Una enfermedad en la que pensar aquí y ahora. Med Clin (Barc). 2004;122:383-9. **IF:**

1,41 **Cuartil:** Q2 (69/154 Infectious Diseases)

De acuerdo con el REGLAMENTO DE ESTUDIOS DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA Aprobado por el Consejo de Gobierno el 17 de diciembre de 2012 Publicado en el BOULPGC de 9 de enero de 2013, y excluyendo lógicamente los trabajos sometidos a revisión editorial,

- La doctoranda figura como autora/coautora en ***todas*** las publicaciones.
- La doctoranda figura como primera autora o autora principal en ***más de tres de las publicaciones.***
- El ***índice de impacto medio*** de las publicaciones es de ***4,05 ± 2,19***
- 6 publicaciones se encuentran el ***primer cuartil***, 2 en el ***segundo cuartil*** y 3 en el ***tercer cuartil***.

Por ello, se cumplen todas las condiciones necesarias para la presentación de este proyecto doctoral en forma de compendio de publicaciones.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

OE 1.1 Infección por *Rickettsia felis* en las Islas Canarias.

Rickettsia felis ocasiona un cuadro clínico de fiebre de duración intermedia y aunque clínicamente es similar al tifus murino, esta especie se incluye en el grupo de las rickettsiosis de las fiebres exantemáticas. En su ciclo biológico el principal vector es la pulga del gato (*Ctenocephalides felis*), aunque probablemente estén implicados otros vectores y otros reservorios.

La importancia de este artículo estriba en que por primera vez en España se describe la infección por *Rickettsia felis* en humanos. Las muestras de suero de 44 pacientes cuyo cuadro clínico no se correspondía con el de tifus murino se enviaron al Centro de Referencia de Rickettsias en Marsella. Asimismo se envió una pulga aportada por uno de los pacientes. Se realizaron estudios serológicos utilizando pruebas de inmunofluorescencia, Western blot y adsorción cruzada. Los resultados pusieron de manifiesto la presencia de rickettsiosis en 31 de los 44 pacientes: 5 con diagnóstico final de infección por *R. felis*, 13 por *R. typhi* y otros 13 con infección por otras especies de *Rickettsia*.

Las características clínicas diferenciales de ambas infecciones fueron:

- El intervalo entre el comienzo de las síntomas y la evaluación del paciente fue más prolongado en los casos de infección por *R. felis* (de 9-14 días vs. 8,5 a 10,2 en *R. typhi*).
- La presencia de odinofagia y tos seca fue más frecuente en los casos de infección por *R. typhi*.
- La elevación de las transaminasas (AST y ALT) fue superior en los casos de infección por *R. typhi*.

Human *Rickettsia felis* Infection, Canary Islands, Spain

Jose-Luis Pérez-Arellano,^{*†‡}

Florence Fenollar,^{‡†} Alfonso Angel-Moreno,^{*†}

Margarita Bolaños,^{*†} Michele Hernández,^{*†}

Evora Santana,^{*†} Marion Hemmersbach-Miller,^{*†}

Antonio-M Martín,^{*†} and Didier Raoult[‡]

We report the first cases of human infection by *Rickettsia felis* in the Canary Islands. Antibodies against *R. felis* were found in 5 adsorbed serum samples from 44 patients with clinically suspected rickettsiosis by Western blot serology. Fleas from 1 patient's dog were positive for *R. felis* by polymerase chain reaction.

Rickettsia felis is an intracellular bacterium (genus *Rickettsia*, spotted fever group [SFG]) (1,2). Its biological cycle involves the cat flea (*Ctenocephalides felis*) as the main vector (3). *R. felis* has been found in *C. felis* and *C. canis* in the Americas, Europe, Africa, Asia, and Oceania (1,3–6). Human disease caused by *R. felis* was unknown until 1994 (4). Since then, *R. felis* infection has been reported in Mexico (3 patients) (7), Germany (1 patient) (8), Brazil (2 patients) (1), and France (2 patients) (1). The clinical manifestations of the disease include high fever, rash, and elevation of liver enzymes (1,4,7). Exposure to fleas or to flea-prone animals is sometimes recorded (7,8).

On the Canary Islands (Atlantic islands of Spain), autochthonous cases of murine typhus have been reported (9). Although we suspected that some patients with a clinical picture of murine typhus actually had *R. felis* infection, we were not able to confirm this hypothesis. Therefore, 44 serum samples from 44 patients from the Canary Islands with suspected murine typhus were sent to the Unité des Rickettsies in Marseille, France, for specific serologic tests. Here, we describe the first 5 human infections caused by *R. felis* on the Canary Islands.

The Study

Forty-four patients were recruited for a prospective study of fever of intermediate duration (i.e., fever without

focal symptoms lasting 7–28 days). Demographic, clinical, and laboratory data were collected for all patients. Chest radiographs and blood and urine cultures were taken. Antibodies against *R. typhi* were tested by direct immunofluorescence test (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) in the Canary Islands. Among the 44 patients, 24 showed a positive serologic result. Antibodies against other agents (*Coxiella burnetii*, *R. conorii*, *Leptospira* spp., Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, HIV, and hepatitis B virus) were also tested; all were negative.

To search for evidence of infection with *R. felis*, all serologic results were confirmed by microimmunofluorescence (MIF) in France, as previously described (10). Systematic testing of SFG rickettsia antigens present in Europe and Africa was performed in parallel. The MIF procedure was followed by the use of Western blot and cross-adsorption studies. An immunofluorescence assay was considered positive if immunoglobulin G (IgG) titers were $>1:64$ or if IgM titers were $>1:32$. When cross-reactions were noted between the rickettsial antigens, the analysis comprised 3 steps. First, a rickettsial antigen was considered to represent the agent of infection when IgG or IgM antibody titers against this antigen were ≥ 2 serial dilutions higher than titers of IgG or IgM antibody against other rickettsial antigens (11). Second, when the difference in titers between *R. felis* and other antigens was <2 dilutions, Western blot assays were performed. A rickettsial antigen was considered the agent of infection when sera reacted only against the specific protein of this antigen. Expected molecular masses of the specific proteins were ≈ 125 kDa for *R. typhi* and 31 kDa for *R. felis*. Finally, when Western blot assays were not diagnostic, cross-adsorption studies were performed, as previously described (12). Specific diagnosis criteria after cross-adsorptions studies included a Western blot assay that showed exclusive reactivity with specific proteins of a sole agent. If reactivity with the 2 tested agents was still observed, diagnosis of an indeterminate rickettsial disease was made. With this strategy, patients were classified by 3 types: *R. felis* infection, *R. typhi* infection, and indeterminate rickettsial disease.

Five fleas from the dog of 1 *R. felis*-infected patient were tested by polymerase chain reaction (PCR) (3). DNA was extracted and amplified with primers that targeted the citrate synthase sequence, as previously described (3). For negative controls, we used sterile water and infection-free fleas previously tested in our laboratory; both negative controls were tested after every 7 samples. Amplicons were separated by electrophoresis on 1% agarose gels and then purified by using a QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), as described by the manufac-

*Hospital Universitario Insular de Las Palmas, Canary Islands, Spain; †Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain; and ‡Université de la Méditerranée, Marseille, France

¹These authors contributed equally to this article.

turer. PCR products were sequenced by using the d-rhodamine terminator-cycle sequencing kit (PE Applied BioSystems, Courtabeuf, France), as described by the manufacturer. The sequences obtained were compared with those available in the GenBank DNA database by using the program Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, version 2.0, National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

A rickettsial infection was diagnosed by using MIF for 31 of the 44 patients: 5 patients with the final diagnosis of *R. felis* infection, 13 with the diagnosis of *R. typhi* infection, and 13 with the diagnosis of indeterminate rickettsioses (Table). The diagnosis of *R. felis* infection was based on Western blot results on adsorbed sera for all

patients. All the antibodies of these patients were removed when the *R. felis*-adsorbed sera were analyzed with *R. typhi* and *R. felis* antigens, whereas antibodies to *R. felis* remained when the *R. typhi*-adsorbed sera were analyzed.

Western blots performed with unadsorbed and adsorbed sera are represented in the Figure. Features of patients are indicated in the online appendix (http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no12/05-0711_app.htm). Some differences were found between groups. The interval between the beginning of clinical signs and symptoms and evaluation was significantly more prolonged in the *R. felis* group than others. In the *R. typhi* group, odynophagia, cough, and rash were more frequent. When we compared biologic data, no difference was observed between *R. typhi* and

Table. Clinical, epidemiologic, and biological data between *Rickettsia felis* group, *R. typhi* group, and indeterminate rickettsiosis group

Characteristic	<i>R. felis</i>	<i>R. typhi</i>	Indeterminate	p value
No.	5	13	13	—
Mean age, y*	45 (16)	29 (14)	40 (17)	NS†
Sex (M/F)	5/0	10/3	12/1	NS‡
Contact with dogs or cats§	4/5	11/13	11/13	NS‡
Interval between clinical picture and evaluation, d¶	12 (9.5–14)	9 (8.5–10.2)	9 (7.9–13.4)	<0.05#
Fever§	5/5	13/13	13/13	NS‡
Maximal temperature (°C)*	39.3 (0.8)	39.6 (0.5)	39.4 (0.5)	NS†
Headache§	4/5	12/13	13/13	NS‡
Conjunctivitis§	1/5	3/13	2/13	NS‡
Arthralgia/myalgia§	4/5	6/13	5/13	NS‡
Odynophagia§	0/5	6/13	0/13	0.01‡
Dry cough§	3/5	8/13	2/13	0.04‡
Nausea/vomiting§	0/5	2/13	1/13	NS‡
Abdominal pain§	1/5	1/13	0/13	NS‡
Rash§	0/5	9/13	6/13	0.03‡
Past or actual tick bite§	1/5	2/13	1/13	NS‡
Hepatomegaly§	1/5	6/13	5/13	NS‡
Splenomegaly§	0/5	3/13	2/13	NS‡
Anemia (hemoglobin <13 mg/dL)	0/5	3/13	1/13	NS
Normal blood leukocyte counts (4,000–10,000/µL)	5/5	10/13**	11/13††	NS‡
Normal platelet counts (150,000–400,000/µL)	4/5	11/12‡‡	11/13‡‡	NS‡
Normal ratio prothrombin time (0.8–1.2)	4/4	10/13	11/13	NS‡
Normal ESR (<10 mm/h)	1/4	11/12	3/11	NS‡
Normal creatinine blood level (62–106 µmol/L)	5/5	11/13	10/13	NS‡
Normal sodium blood level (136–144 mmol/L)	2/4	10/13	10/12	NS‡
Elevated AST (>35 IU/L)	4/5	8/13	5/12	NS‡
Mean AST (U/L)	123	254	72	0.01§§
Elevated ALT (>45 IU/L)	5/5	8/13	6/12	NS†
Mean ALT (U/L)¶¶¶	185 (71–374)	354 (55–1,368)	86 (34–292)	<0.01§§
Elevated GGT (>55 IU/L)	2/5	3/13	4/12	NS‡
Elevated total serum protein concentration (>80 g/L)	0/5	0/12	1/12	NS‡
Elevated gamma globulin concentration (>13 g/L)	2/5	5/12	8/10	NS‡

*Data are expressed as mean (SD). Samples are distributed normally and have similar SD. NS, nonsignificant; ANOVA, analysis of variance test; ESR, erythrocyte sedimentation rate; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase.

†ANOVA.

‡χ² test.

§No. patients with these epidemiologic or clinical data/no. patients evaluated.

¶Data are expressed as median and 95% confidence intervals; ≥1 samples have a non-gaussian distribution.

#Significant differences between *R. felis* and *R. typhi* groups ($p<0.05$) with Dunn test.

**Leukopenia in 1 patient (3,700/µL), leukocytosis in 2 patients (11,500/µL and 16,000/µL).

††Leukopenia in 2 patients.

¶¶All patients with an abnormal platelet count presented with thrombocytopenia in all cases.

§§ANOVA; all cases.

¶¶¶Data are expressed as mean (range values). Samples are distributed normally and have similar SD.

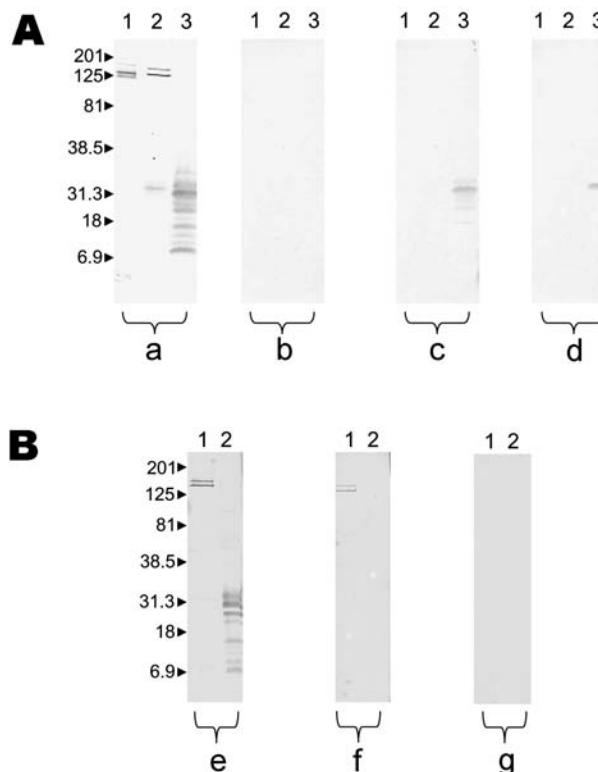


Figure. Results of Western blot performed with serum samples from patient 5 with *Rickettsia felis* infection and patient 10 with *R. typhi* infection. Molecular masses (in kilodaltons) are given to the left of panels. A) Patient with *R. felis* infection; a, untreated serum analyzed by using *R. conorii* (lane 1), *R. typhi* (lane 2), and *R. felis* (lane 3); b, *R. felis*-adsorbed serum analyzed by using *R. conorii* (lane 1), *R. typhi* (lane 2), *R. felis* (lane 3); all antibodies were removed; c, *R. typhi*-adsorbed serum analyzed by using *R. typhi* (lane 1) and *R. felis* (lane 2); antibodies to *R. felis* remained; d, *R. conorii*-adsorbed serum analyzed by using *R. conorii* (lane 1), *R. typhi* (lane 2), *R. felis* (lane 3); antibodies to *R. felis* remained. B) Patient with murine typhus; e, untreated serum analyzed by using *R. typhi* (lane 1) and *R. felis* (lane 2); f, *R. felis*-adsorbed serum analyzed by using *R. typhi* (lane 1) and *R. felis* (lane 2); antibodies to *R. typhi* remained; g, *R. typhi*-adsorbed serum analyzed by using *R. typhi* (lane 1) and *R. felis* (lane 2); all antibodies were removed.

R. felis groups, except for milder hypertransaminasemia in the latter group. Finally, 2 PCR products were obtained and sequenced from 2 fleas. Both sequences were 100% similar to *R. felis* citrate synthase gene in GenBank accession no. AF210692. No fleas were positive for *R. typhi*. Amplification was unsuccessful in all negative controls.

Conclusions

In the past 10 years, application of molecular tools has resulted in discovery of several new species of pathogenic rickettsiae, including *R. felis*. Since then, this bacterium was cultivated, and its genome was sequenced (1,13). Its

pathogenic role was recently demonstrated in patients with serologic evidence of infection in Brazil, France, and Germany (1). *R. felis* DNA has also been detected in sera in Texas, Mexico, Brazil, and Germany (1,4,8,14). Autochthonous human rickettsioses that occur in the Canary Islands include murine typhus; SFG infections have never been reported (9). We diagnosed 5 cases of acute *R. felis* infection (15). The clinical picture is globally similar to murine typhus (4). However, the *R. felis* infection in our study seemed to be milder, and no skin rash was observed. The incidence of *R. felis* infection in the Canary Islands is probably underestimated; therefore, serologic tests for *R. felis* should be performed in patients with prolonged fever or suspected rickettsioses.

Cross-reactions in serologic testing for *R. felis* are unpredictable (3). In our study, patients with *R. felis* infection more frequently had high antibody titers (IgM >1:32 and IgG >1:64) to *R. conorii* and *R. typhi* (2 of 5 patients) than did patients with *R. typhi* infection (0 of 13). On the basis of *R. felis* data, we conclude that patients with *R. felis* infection may have no cross-reactivity with other rickettsiae, cross-reactivity with SFG rickettsiae, or cross-reactivity with both SFG rickettsiae and *R. typhi*. Genetic support for cross-reactivity with *R. conorii* is plausible because most membrane proteins of SFG and *R. felis* are extremely close (surface cell antigen [Sca] family). Genome analysis showed that several genes were present in *R. felis* and *R. typhi* and absent for other SFG, which could explain the cross-reactivity between *R. felis* and *R. typhi* (13). Finally, if <2-fold differences in IgG/IgM titers between *R. felis* and other SFG and typhus group rickettsiae are observed, only Western blot and cross-adsorptions will allow a specific diagnosis once reactivity has disappeared after adsorption with *R. felis* antigen. By contrast, a band of ≈31 kDa for the *R. felis* antigen persists after adsorption with *R. conorii* and *R. typhi*.

Acknowledgments

We thank Kelly Johnston and Silpak Biswas for reviewing the manuscript.

This research was supported in part by a grant from the Canary Foundation of Investigation and Health.

Dr Pérez-Arellano is chief of the Infectious Diseases and Tropical Medicine Service and professor in the Department of Medical and Surgical Sciences, Health Sciences Faculty, University of Las Palmas de Gran Canaria. His main research interests are imported and emerging infectious diseases.

References

- Raoult D, La Scola B, Enea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, et al. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis*. 2001;7:73–81.

2. La Scola B, Meconi S, Fenollar F, Rolain JM, Roux V, Raoult D. Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer et al. 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:2035–41.
3. Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. claridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipiensis* in cat fleas, France. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:338–42.
4. Schriefer ME, Sacci JB Jr, Dumler JS, Bullen MG, Azad AF. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J Clin Microbiol.* 1994;32:949–54.
5. Parola P, Sanogo OY, Lerdthusnee K, Zeaiter Z, Chauvancy G, Gonzalez JP, et al. Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in from the Thai-Myanmar border. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;990:173–81.
6. Kelly PJ, Meads N, Theobald A, Fournier PE, Raoult D. *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. claridgeiae*, New Zealand. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:967–8.
7. Zavala-Velazquez J, Ruiz-Sosa J, Sanchez-Elias R, Becerra-Carmona G, Walker D. *Rickettsia felis* in Yucatan. *Lancet.* 2000;9235:1079–80.
8. Richter J, Fournier P, Petridou J, Häussinger D, Raoult D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:207–8.
9. Hernandez CM, Angel-Moreno A, Santana E, Bolanos M, Frances A, Martin-Sanchez MS, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:740–3.
10. Teyssiere N, Raoult D. Comparison of Western blot immunoblotting and microimmunofluorescence for diagnosis of Mediterranean spotted fever. *J Clin Microbiol.* 1992;30:455–60.
11. Raoult D, Fournier P, Fenollar F, Jensenius M, Prioe T, De Pina J, et al. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to Sub-Saharan Africa. *N Engl J Med.* 2001;344:1504–10.
12. La Scola B, Rydkina L, Ndihokubwayo JB, Raoult D. Serological differentiation of murine typhus and epidemic typhus using cross-adsorption and western blotting. *Clin Diag Lab Immunol.* 2000;7:612–6.
13. Ogata H, Renesto P, Audic S, Robert C, Blanc G, Fournier PE, et al. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in an obligate intracellular parasite. *PLoS Biology.* 2005;3:248.
14. Zavala-Velazquez JE, Zavala-Castro JE, Vado-Solis I, Ruiz-Sosa JA, Moron CG, Bouyer DH, et al. Identification of *Ctenocephalides felis* fleas as a host of *Rickettsia felis*, the agent of a spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002;2:69–75.
15. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2715–27.

Address for correspondence: D. Raoult, Unité des Rickettsies, CNRS UMR 6020, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France; fax: 33-4-91-38-77-72; email: Didier.Raoult@medecine.univ-mrs.fr

All material published in Emerging Infectious Diseases is in the public domain and may be used and reprinted without special permission; proper citation, however, is required.



Search
past issues
EID
Online
www.cdc.gov/eid

OE 1.2. *Anaplasma phagocytophilum* no es un agente causal de la fiebre de duración intermedia en Gran Canaria.

Siguiendo el protocolo de estudio de las fiebres de duración intermedia, en aquellos pacientes en los que no se llegó a demostrar su causa y se disponía de muestras de suero en fase aguda y de convalecencia (suero a las 2-3 semanas), se estudio la presencia de anticuerpos de tipo IgG e IgM frente a *Anaplasma phagocytophilum* mediante una técnica de inmunofluorescencia Indirecta (Focus Diagnostics, San Diego, California). Los pocillos de los portaobjetos tienen fijados la línea celular HL60 infectada con la cepa HGE-1. Para la realización de la técnica se siguieron las instrucciones del fabricante y empezamos a una dilución de 1/20 y en los casos que eran positivos se seguían titulando a diluciones dobles seriadas.

Se estudiaron 73 pacientes, con una edad media de 36,4 años y el 64,4 % eran varones. Aunque se detectaron cuatro pacientes con títulos positivos, ninguno de ellos cumplió los criterios de infección por *Anaplasma phagocytophilum*.

Por todo ello concluimos que *Anaplasma phagocytophilum* no es causa significativa de fiebre de duración intermedia en Gran Canaria.

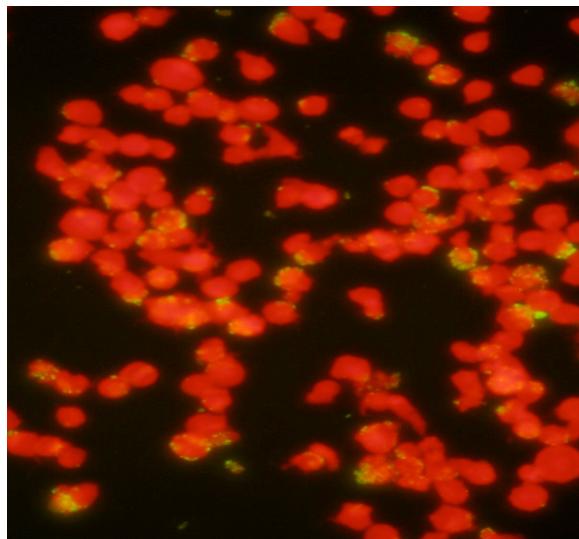


Imagen de la IFI frente a *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum is not an aetiological agent of fever of intermediate duration in Gran Canaria (Spain)

M. Bolaños¹, E. Santana^{1,2}, C. Carranza^{3,4}, P. Anda⁵, I. Jado⁵, M. Hernández-Cabrera^{3,4}, A. M. Martín-Sánchez^{1,2} and J. L. Pérez-Arellano^{3,4}

¹Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Insular, Las Palmas de Gran Canaria, Spain,

²Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Spain, ³Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical, Hospital Universitario Insular, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, ⁴Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain and ⁵Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales, Centro Nacional de Microbiología-ISCIII, Madrid, Spain

INTRODUCTION

Fever of intermediate duration (FID) is defined as non-localised fever occurring in the community, lasting from 1 to 4 weeks, and having no diagnostic orientation after basic clinical, analytical and radiological evaluations are completed. [1]. In Spain, the most frequent causes of FID (70%) are systemic infectious diseases (mainly rickettsioses, brucellosis, bartonellosis, anaplasmosis and agents of infectious mononucleosis), localised infections (i.e. intraabdominal abscesses or prostatitis), vasculitis and neoplasms, and other aetiological agents.

In Gran Canaria (Spain), the most frequent causes of FDI are *Coxiella burnetii* [2], *Rickettsia typhi* [3] and *Rickettsia felis* [4]. However, many patients with FDI, without data suggestive of occult bacterial infections, vasculitis or neoplasms, have a clinical response to the use of doxycycline but no microbiological diagnosis. So, the aim of this work was to evaluate the aetiological role of *Anaplasma phagocytophilum* in patients with FDI in Gran Canaria.

PATIENTS, MATERIAL AND METHODS

All autochthonous adult outpatients with FID evaluated in the Infectious Diseases Unit from 1 October 2004 to 31 December 2006 were investi-

Corresponding author and reprint requests: M. Bolaños, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Insular, Las Palmas de Gran Canaria, Spain
E-mail: mbolriv@gobiernodecanarias.org

No conflicts of interest declared.

gated for their aetiological diagnosis. Demographic, clinical and laboratory data were collected for all patients. Chest X-ray, three sets of blood cultures and urine culture were systematically performed. Antibodies against *Coxiella burnetii* (immunofluorescence (IFA); IgG and IgM (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)), *Rickettsia typhi* (IFA; IgG and IgM (bioMérieux)), *Rickettsia conorii* (IFA; IgG and IgM (bioMérieux)), *Leptospira* spp. (MAT, bioRad, Marnes la Coquette, France), Epstein-Barr virus (EBV) (enzymeimmunoassay (EIA); IgG-VCA (Trinity Biotech, Bray Co. Wicklow, Ireland), IFA; IgM (Palex Medical, Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, USA)), Cytomegalovirus (CMV) (EIA; IgG and IgM (Abbott Laboratories, Delkenheim, Germany)), *Toxoplasma gondii* (EIA; IgG and IgM (Abbott Laboratories), IgA (diaSorin, Milano, Italy)), human immunodeficiency virus (HIV)(EIA, Abbott Laboratories), with positive results confirmed by immunoblot test (INNOLIA, Innogenetics, Gent, Belgium), hepatitis A (EIA, Abbott Laboratories), hepatitis B (EIA; surface antigen—BsAg-antibodies for core -antiHBc- (Abbott Laboratories)) and hepatitis C (EIA, Abbott Laboratories) virus were tested for in all patients. Serological evaluation of *Brucella* spp. was not included because this infection is absent in Gran Canaria. A definite diagnosis of these diseases was the presence of a compatible clinical picture and conventional serological criteria. FDI patients with epidemiological characteristics suggestive of imported diseases, and/or with only a serum sample, were excluded.

Anaplasma phagocytophilum antibodies (IgG and IgM) were evaluated in patients without a definite diagnosis when two serum samples were available (acute and convalescent phase). A commercial

Table 1. Positive serological results for *Anaplasma phagocytophilum* antibodies

Patient No.	Acute phase		Convalescent phase	
	Ig G	IgM	IgG	IgM
1	<1:64	<1:20	<1:64	1:80
2	1:128	<1:20	1:256	<1:20
3	<1:64	1:80	<1:64	1:160
4	<1:64	1:40	<1:64	<1:20

immunofluorescence assay (IFA) (Focus Diagnostics, Cypress, CA, USA) based on HL60 cells infected with a human isolate of HGE-1 strain, was used. The test was performed according to the manufacturer's protocol. Positive and negative controls were used as supplied by the manufacturer. IFA was considered as positive for IgG titres $\geq 1/64$ and/or IgM titres $\geq 1/20$. All positive sera were titrated. Confirmed human anaplasmosis is the demonstration of a four-fold change in the antibody titre in paired serum samples.

RESULTS

A total of 229 patients fulfilled the criteria for FID. Of them, 156 have a definite diagnosis (49 murine typhus, 44 Q fever, 32 acute EBV infections, 30 acute CMV infections (one patient with co-infection by CMV and EBV), one acute HIV and one acute *Toxoplasma gondii* infection). The mean age of the murine typhus patients was 33.5 years old (range 18–79), and 67.4% were men. Q fever patients had a mean age of 39.4 years old (range 18–70), and 84.1% were men. Acute EBV infection patients had a mean age of 36 years old (range 18–60), and 53.1% were men. Finally, the mean age of acute CMV infection patients was 33.6 years old (range 18–80), and 53.3% were men.

Anaplasma phagocytophilum antibodies were measured in 73 patients (mean age 36.4 years old, males 64.4%). Only four patients had a positive serological result (Table 1b).

A total of 229 patients fulfilled the criteria for FID. Of them, 156 had a definite diagnosis (49 murine typhus, 44 Q fever, 32 acute EBV infections, 30 acute CMV infections (one patient co-infection CMV and EBV), one acute HIV and one acute *Toxoplasma gondii* infection) but did not have diagnostic criteria for acute infection by *A. phagocytophilum*.

DISCUSSION

Serological data in this series suggest that *Anaplasma phagocytophilum* is not a relevant cause of FID in Gran Canaria. Otherwise, direct data (epidemiological studies of tick species) and indirect data (no detection of other infectious diseases transmitted by the main vector related to anaplasmosis [5]) suggest that anaplasmosis should not be included in the differential diagnosis of FID in our geographical area. So, the evaluation of other different microorganisms killed by tetracyclines is mandatory in our geographical area.

ACKNOWLEDGEMENTS

C. Carranza is supported by FUNCIS (Grant 34/04) and INIA (Grant FAU2006-00002-C04-03).

REFERENCES

1. Rivero A, Zambrana JL, Pachón J. Fiebre de duración intermedia. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2003; **21**: 145–150.
2. Bolaños M, Santana OE, Pérez Arellano JL et al. Fiebre Q en Gran Canaria. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2003; **21**: 20–23.
3. Hernández-Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 2004; **10**: 740–743.
4. Pérez Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A et al. Human Rickettsia felis infection. Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 1961–1964.
5. Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin Microbiol Rev* 2006; **19**: 708–727.

OE 1.3 *Rickettsia massiliae* en las Islas Canarias.

Rickettsia massiliae ha sido reconocida como causa de enfermedad dentro del grupo de las fiebres exantemáticas. En esta publicación describimos el hallazgo de genoma de *Rickettsia massiliae* en dos garrapatas del género *Rhipicephalus pusillus*. Las garrapatas recogidas se clasificaron taxonómicamente en el laboratorio mediante una lupa y el uso de claves (Gil - Collado y cols, 1979, Manila 1998). Una vez identificadas se almacenaron a -80 °C hasta el momento de ser procesadas.

Se enviaron al Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC de Ciudad Real (Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Universidad de Castilla-La Mancha), 82 ejemplares de *Hyalomma lusitanicum* (46 hembras) y 8 ejemplares (5 hembras) de *Rhipicephalus pusillus*.

Se procedió a la extracción del ADN de las garrapatas y se realizaron técnicas de secuenciación utilizando PCR que amplifican los fragmentos del gen 16S ARNr y de los genes *ompB*, *dnaK*, *dnaA*, *recA* y *atpA*. Las secuencias obtenidas se compararon usando la base de datos BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Los fragmentos del gen 16S ARNr tienen un 99% de similitud con la cepa Mtu5 de *R. massiliae*, aislada de *Rhipicephalus sanguineus* en el Sur de Francia. Así mismo, los fragmentos de los genes *ompB*, *atpA*, *dnaA* y *recA* eran 100% idénticos a la cepa de *Rickettsia massiliae* Bar 29, aislada previamente en Cataluña en *Rhipicephalus sanguineus*.

Por otra parte , se analizaron 150 muestras de hígado y sangre de conejos salvajes, tanto de muestras procedentes de Gran Canaria como de Andalucía, para la detección de genoma de *Rickettsia* spp, siendo todas negativas. En definitiva, aunque clínicamente no hayamos detectado rickettsiosis del grupo de las fiebres exantemáticas, este estudio demuestra que *R. massiliae* existe en nuestro medio.

**Dorothea Stephany,
Pierre Buffet, Jean-Marc Rolain,
Didier Raoult,
and Paul H. Consigny**

Author affiliations: Institut Pasteur, Paris, France (D. Stephany, P. Buffet, P.H. Consigny); and Université de la Méditerranée, Marseille, France (J.M. Rolain, D. Raoult).

DOI: 10.3201/eid1511.090521

References

1. Kelly PJ, Beati L, Matthewman LA, Mason PR, Dasch GA, Raoult D. A new pathogenic spotted fever group rickettsia from Africa. *J Trop Med Hyg*. 1994;97:129–37.
2. Raoult D, Fournier PE, Fenollar F, Jensenius M, Prioe T, de Pina JJ, et al. *Rickettsia africae*, a tick-borne pathogen in travelers to sub-Saharan Africa. *N Engl J Med*. 2001;344:1504–10. DOI: 10.1056/NEJM200105173442003
3. Ndip LM, Bouyer DH, Travassos Da Rosa AP, Titanji VP, Tesh RB, Walker DH. Acute spotted fever rickettsiosis among febrile patients, Cameroon. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:432–7.
4. Freedman DO, Weld LH, Kozarsky PE, Fisk T, Robins R, von Sonnenburg F, et al. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. *N Engl J Med*. 2006;354:119–30. DOI: 10.1056/NEJMoa051331
5. Burgdorfer W, Ormsbee RA, Schmidt ML, Hoogstraal H. A search for the epidemic typhus agent in Ethiopian ticks. *Bull World Health Organ*. 1973;48:563–9.
6. Walker DH, Liu QH, Yu XJ, Li H, Taylor C, Fenq HM. Antigenic diversity of *Rickettsia conorii*. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;47:78–86.
7. Kelly PJ, Matthewman LA, Beati L, Raoult D, Mason P, Dreary M, et al. African tick bite fever: a new spotted fever group under an old name. *Lancet*. 1992;340:982–3. Medline DOI: 10.1016/0140-6736(92)92878-J
8. Mura A, Socolovschi C, Ginesta J, Lafrance B, Magnan S, Rolain JM, et al. Molecular detection of spotted fever group rickettsiae in ticks from Ethiopia and Chad. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:945–9. DOI: 10.1016/j.trstmh.2008.03.015
9. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis*. 2001;32:897–928. DOI: 10.1086/319347
10. Parola P, Barre N. *Rickettsia africae*, agent de la fièvre à tique africaine: un pathogène émergent dans les Antilles et l'île de la Réunion. *Bull Soc Pathol Exot*. 2004;97:193–8.

Address for correspondence: Paul H. Consigny, Centre Médical, Institut Pasteur, 28, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France; email: consigny@pasteur.fr

isolated from *R. sanguineus* ticks in southern France (3), and fragments of *ompB*, *atpA*, *dnaA*, *dnaK*, and *recA* genes were 100% identical to the *R. massiliae* strain Bar29 (AF123710, AY124739, DQ821798, DQ821828, and AY124750, respectively), previously isolated from *R. sanguineus* ticks in Catalonia, Spain (4) (Table).

R. massiliae was first isolated in 1992 from *R. sanguineus* ticks collected near Marseille, France (5). Since then, the pathogen has been identified in different *Rhipicephalus* species in France, Greece, Portugal, Switzerland, Spain, North and Central Africa, Argentina, and the United States (6,7). *R. massiliae* has been identified in southern Spain (8) but not in the Canary Islands. *R. pusillus* ticks are commonly found in southern Europe (Portugal, Spain, and France) and northern Africa (Tunisia and Morocco). All stages of these ticks inhabit burrows of wild rabbits and feed on them (www.kolonin.org/16_4.html).

Wild rabbits were introduced into the Canary Islands at the end of 14th century during colonization by the kingdom of Castilla. Colonists were asked to bring rabbit couples with them to provide food in the islands (2), a practice continued by new colonists because of their interest in hunting this rabbit species. Introduction of wild rabbits by colonists led to establishment of parasites, such as helminths, coccidia, and viruses in the Canary Islands (9). *R. pusillus*, a common ectoparasite (tick) that feeds on wild rabbits on the Iberian Peninsula, was also introduced this way. *R. massiliae* could have been introduced in the islands by infected *R. pusillus* ticks or by infected wild rabbits if this species serves as a natural reservoir host for the pathogen.

To find evidence for this hypothesis, we tested blood and liver samples of 150 wild rabbits from both Canary Islands and Andalucía (southern Spain) by using *Rickettsia*-specific PCR primers (Table). No *R. massiliae* DNA was detected in the rabbit samples tested,

***Rickettsia massiliae* in the Canary Islands**

To the Editor: *Rickettsia massiliae* was recently recognized as a human tick-borne spotted fever group rickettsia (1). We report the finding of *R. massiliae* in *Rhipicephalus pusillus* ticks from Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Introduction of this pathogen into the Canary Islands is thought to have resulted from translocation of the European wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus), a preferred host of *R. pusillus* ticks (www.kolonin.org/16_4.html), from the Iberian Peninsula 600 years ago (2).

We collected questing adult ticks in 2008 in Gran Canaria and identified 2 tick species, *Hyalomma lusitanicum* (n = 82 [46 females]) and *R. pusillus* (n = 8 [5 females]). Whole ticks were preserved in 70% ethanol and used for DNA extraction by using TriReagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. We identified rickettsial sequences by using PCR primers that amplify fragments of 16S rRNA, *ompB*, *atpA*, *dnaA*, *dnaK*, and *recA* genes (Table). Amplicons were cloned into pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA), and 3 independent clones were sequenced from both ends for each gene marker. Sequence similarity search was performed by using BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov). Rickettsial DNA was detected in 2 *R. pusillus* males only; sequences were identical in both ticks. Fragments of 16S rRNA were 99% identical to the *R. massiliae* strain Mtu5 (CP000683)

Table. *Rickettsia massiliae* PCR conditions and amplicon size, Canary Islands, 2008*

Gene	Description (GenBank accession no.)	Primer sequence (5' → 3')	Amplicon size, bp	PCR annealing conditions
16S rRNA	16S ribosomal RNA (GQ144453)	F: AGAGTTTGATCCCTGGCTCAG R: AACGTCAATTATCTTCCTTGC	416	50°C/30 s
ompB	Outer membrane protein (GQ144450)	F: GGGTGCTGCTACACAGCAGAA R: CCGTCACCGATATAATTGCCC	618	53°C/30 s
dnaK	Heat-shock protein 70 (GQ144451)	F: AGCGTCAAGCAACGAAAGAT R: CAAACGTTGAAGTGCTAAAGG	323	50°C/30 s
dnaA	Chromosomal replication initiation protein (GQ144449)	F: CCTACTAACCTTGTAGAGATT R: TGATGATTCTGCAACCGCTC	241	56°C/30 s
recA	RecA recombination protein (GQ144452)	F: TGCTTTATTGATGCCGAGC R: CTTTAATGGAGCCGATTCTTC	428	52°C/30 s
atpA	ATP synthase F1 alpha subunit (GQ144448)	F: ACATATCGAGATGAAGGCTCC R: CCGAAATACCGACATTAACG	731	48°C/30 s

*GenBank accession numbers correspond to *R. massiliae* sequences identified in this study. PCRs were completed by employing the Access RT-PCR system (Promega, Madison, WI, USA) with 1 ng DNA, the oligonucleotide primers, and annealing conditions and with extension for 1 min at 68°C. F, forward; R, reverse.

suggesting that the pathogen probably was introduced in the Canary Islands with infected *R. pusillus* ticks feeding on rabbits. Alternatively, *R. massiliae* infection levels in wild rabbits may be below the PCR detection limit and were not detected.

The Canary Islands are a popular tourist destination. The presence of *R. massiliae* in the islands constitutes a risk for human infection and should be considered in hospital diagnostic and wildlife management strategies. As with other *Rhipicephalus* spp., *R. pusillus* ticks could feed on humans under certain circumstances (10). Our results emphasize the risks associated with unsupervised animal translocations, a factor that probably plays a role in the introduction of ticks and tick-borne pathogens in different parts of the world.

This research was supported by Fundación Canaria de Investigación y Salud (project 34/04) and the Consejería de Educación y Ciencia de Castilla-La Mancha (project POII09-0141-8176).

**Isabel G. Fernández de Mera,
Zorica Zivkovic,
Margarita Bolaños,
Cristina Carranza,
José Luis Pérez-Arellano,
Carlos Gutiérrez,
and José de la Fuente**

Author affiliations: Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas—Universidad de Castilla-La Mancha—Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha), Ciudad Real, Spain (I.G. Fernández de Mera, J. de la Fuente); Utrecht University, the Netherlands (Z. Zivkovic); Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Canary Islands, Spain (M. Bolaños, C. Carranza, J.L. Pérez-Arellano); Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands (J.L. Pérez-Arellano, Carlos Gutiérrez); and Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma, USA (J. de la Fuente).

DOI: 10.3201/eid1511.090681

References

- Vitale G, Mansuelo S, Rolain JM, Raoult D. *Rickettsia massiliae* human isolation. Emerg Infect Dis. 2006;12:174–5.
- Nowak RM. Walker's mammals of the world. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1991.
- Beati L, Finidori JP, Gilot B, Raoult D. Comparison of serologic typing, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of rickettsiae: characterization of two new rickettsial strains. J Clin Microbiol. 1992;30:1922–30.
- Cardenosa N, Segura F, Raoult D. Serosurvey among Mediterranean spotted fever patients of a new spotted fever group rickettsial strain (Bar29). Eur J Epidemiol. 2003;18:351–6. DOI: 10.1023/A:1023654400796
- Beati L, Raoult L. *Rickettsiae massiliae* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia. Int J Syst Bacteriol. 1993;43:839–40. PMID: 8240964
- Eremeeva ME, Bosselman EA, Demma LJ, Zambrano ML, Blau DM, Dasch GA. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. Appl Environ Microbiol. 2006;72:5569–77. DOI: 10.1128/AEM.00122-06
- Parola P, Labruna MB, Raoult D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. Curr Infect Dis Rep. 2009;11:40–50. DOI: 10.1007/s11908-009-0007-5
- Marquez FJ. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. Exp Appl Acarol. 2008;45:185–94. DOI: 10.1007/s10493-008-9181-7
- Foronda PR, Figueruelo EO, Ortego AR, Abreu NA, Casanova JC. Parasites (viruses, coccidia and helminths) of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) introduced to Canary Islands from Iberian Peninsula. Acta Parasitologica 2005;50:80–4.
- Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bittam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2:e338. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000338

Address for correspondence: José de la Fuente, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM-JCCM), 13005 Ciudad Real, Spain; email: jose_de_la_fuente@yahoo.com

All material published in Emerging Infectious Diseases is in the public domain and may be used and reprinted without special permission; proper citation, however, is required.

OE 2. Métodos moleculares para la caracterización de *Coxiella burnetii* de muestras clínicas y ambientales en España.

La fiebre Q está producida por *Coxiella burnetii*. Este microorganismo sólo se puede cultivar *in vitro* en líneas celulares y además requiere condiciones de alta seguridad para su procesamiento (nivel 3 de seguridad biológica). Por todo ello el cultivo de este microorganismo sólo se realiza en centros especializados, y existen pocas cepas disponibles en todo el mundo para su estudio. Recientemente se han diseñado diversos métodos moleculares que han logrado clasificar a los aislados de *C. burnetii* en 8 grupos genómicos y 36 genotipos. Pero continuamos sin saber si las manifestaciones clínicas dependen de la cepa causante, del hospedador o de ambas causas.

En este estudio se procesaron, mediante técnicas de PCR e hibridación, 90 muestras procedentes de distintas regiones de España, de las cuales 24 eran de origen humano (11 de pacientes con fiebre Q aguda - 8 de las cuales eran de Gran Canaria - y 13 de pacientes con fiebre Q crónica), 33 muestras eran de garrapatas, 15 de ovejas, 7 de cabras, 7 de vacas, 3 de ratas y 1 de un ciervo salvaje.

Los resultados a destacar fueron:

- Existe una gran variabilidad de cepas de *Coxiella burnetii* en España, identificándose 7 grupos genómicos y 10 genotipos.
- No se dispuso de cepas de *Coxiella burnetii* productoras de neumonía. Sólo se pudo estudiar una cepa que resultó ser *adaA* positiva.
- Aún con el número escaso de muestras, se observa que puede existir asociación entre las cepas productoras de fiebre de duración intermedia y hepatitis procedentes de Andalucía y Canarias. Ambas cepas fueron *adaA* negativas.
- De los 10 genotipos descritos, sólo se detectaron 5, siendo el IV el más frecuentemente encontrado tanto en casos de fiebre Q aguda como crónica. Este genotipo también se ha encontrado en mamíferos.
- La ventaja que tiene esta técnica es que no se necesita tener crecida la cepa, que se puede realizar con el amplificado del DNA de la muestra.

RESEARCH

Open Access

Molecular method for the characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain

Isabel Jado^{1*}, Cristina Carranza-Rodríguez², Jesús Félix Barandika³, Álvaro Toledo^{4,9}, Cristina García-Amil¹, Beatriz Serrano⁵, Margarita Bolaños², Horacio Gil¹, Raquel Escudero¹, Ana L García-Pérez³, A Sonia Olmeda⁴, Iñaki Astobiza³, Bruno Lobo¹, Manuela Rodríguez-Vargas¹, José Luis Pérez-Arellano², Fernando López-Gatius⁵, Francisco Pascual-Velasco⁶, Gustavo Cilla⁷, Noé F Rodríguez⁸ and Pedro Anda¹

Abstract

Background: *Coxiella burnetii* is a highly clonal microorganism which is difficult to culture, requiring BSL3 conditions for its propagation. This leads to a scarce availability of isolates worldwide. On the other hand, published methods of characterization have delineated up to 8 different genomic groups and 36 genotypes. However, all these methodologies, with the exception of one that exhibited limited discriminatory power (3 genotypes), rely on performing between 10 and 20 PCR amplifications or sequencing long fragments of DNA, which make their direct application to clinical samples impracticable and leads to a scarce accessibility of data on the circulation of *C. burnetii* genotypes.

Results: To assess the variability of this organism in Spain, we have developed a novel method that consists of a multiplex (8 targets) PCR and hybridization with specific probes that reproduce the previous classification of this organism into 8 genomic groups, and up to 16 genotypes. It allows for a direct characterization from clinical and environmental samples in a single run, which will help in the study of the different genotypes circulating in wild and domestic cycles as well as from sporadic human cases and outbreaks. The method has been validated with reference isolates. A high variability of *C. burnetii* has been found in Spain among 90 samples tested, detecting 10 different genotypes, being those *adaA* negative associated with acute Q fever cases presenting as fever of intermediate duration with liver involvement and with chronic cases. Genotypes infecting humans are also found in sheep, goats, rats, wild boar and ticks, and the only genotype found in cattle has never been found among our clinical samples.

Conclusions: This newly developed methodology has permitted to demonstrate that *C. burnetii* is highly variable in Spain. With the data presented here, cattle seem not to participate in the transmission of *C. burnetii* to humans in the samples studied, while sheep, goats, wild boar, rats and ticks share genotypes with the human population.

Background

Coxiella burnetii is an obligate intracellular Gram negative bacterium which causes Q fever, an illness with multiple clinical manifestations in its acute presentation, including a flu-like respiratory process that could result in atypical pneumonia, or fever of intermediate duration (FID) with liver involvement. In a low percentage of cases a chronic form of the disease is diagnosed, characterized by

an infection that persists for more than 6 months, more frequently endocarditis, which can be fatal without an appropriate treatment [1]. Its high infectivity, resistance in adverse environmental conditions and aerosol route of transmission make this agent a candidate for intentional release [2], being listed as a category B bioterrorism agent by the USA Centers for Disease Control and Prevention.

Initial studies tried to correlate specific genotypes (GT) with the chronic and acute forms of the disease. Thus, certain plasmid patterns were claimed to be associated with the disease outcome [3,4], which was controversial [5]; also, some *isocitrate dehydrogenase* types were associated with chronic disease and a role for this gene in the

* Correspondence: ijado@isciii.es

¹Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales, Department of Bacteriology, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. de Pozuelo km 2,6, Majadahonda, Madrid 28220, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

adaptation of the organism to the intracellular environment was proposed [6], although this association was also challenged by other authors [7].

More recently, different attempts have been made to classify isolates of *C. burnetii* in different genomic groups (GG). Based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the entire genome, Hendrix et al. [8] resolved 36 isolates of different origin in 6 GG; Jager et al. [9] performed pulsed field gel electrophoresis (PFGE) in 80 isolates that were classified into 4 GG; a Multispacer Sequence Typing method [10], based on the sequencing of 10 intergenic spacers classified 173 isolates, mainly from chronic disease, into 3 monophyletic groups and 30 GT; later, a reduced MST method was published by Mediannikov et al. [11], targeting 3 spacers in a single PCR, detecting 3 MST GTs; Svraka et al. [12] amplified different variable number tandem repeats (VNTR) in 7 PCR protocols, describing 5 clusters and validating previous GG ascriptions; Arricau-Bouvery [13] applied infrequent restriction site-PCR and multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) for the typing in a scheme of 17 PCR protocols leading to a classification into 6 clusters and 36 GT; later, Roest et al. [14], used the same method but reducing the 17 described targets to 10, to study an outbreak in the Netherlands and describing 13 MLVA types; Beare et al. [15] added two more GG, totalling up to 8, in a microarray-based whole genome comparison; Denison et al. [16] performed 20 PCRs for the characterization of the region within and near the transposase *IS1111*, describing 5 GG among 21 reference strains and 9 animal samples; Huijsmans et al. [17] developed a method for a single-nucleotide-polymorphisms (SNP)-based typing, applying 10 real time PCR protocols that resolved 28 reference strains and 40 samples from an outbreak into 9 SNP genotypes, while a previous study on the same 28 reference strains [13] had disclosed 14 MLVA types; finally, Hornstra et al. [18] performed 14 SNP-based real time PCR assays that classified 63 isolates into 6 GG and 35 MST genotypes.

Recently, an outer membrane protein-coding gene named *acute disease antigen A* (*adaA*) was described as associated with acute Q fever-causing strains, whereas *adaA* negative strains were linked to chronic cases [19]. Therefore, the hypothesis of its association with a specific clinical presentation of the disease together with its immunodominant nature lead the authors to suggest that *adaA* may be a virulence factor for the pathogenesis of Q fever. Consequently, *adaA* may be a relevant genetic marker for differentiation among isolates.

In general, there has been a good correlation between typing methods although with different discriminatory capabilities. However, although 2 previous descriptions have been applied directly to clinical samples [16,17], both rely on the amplification of several targets performing

between 10 and 20 PCR protocols, which make it not always feasible for their use in a clinical setting due to the frequent scarcity of testable sample-size, which hampers the acquisition of global data; the method of Mediannikov et al. [11], consisting of a multiplex PCR targeting 3 intergenic spacers, exhibited however a limited discriminatory power (3 MST types) in the samples studied. In this study, based on the previous descriptions of Beare et al. [15] and Zhang et al. [19], a fast, reproducible and sensitive multiplex PCR that amplifies 8 targets in the same run for a rapid GT determination, has been developed to be applied to both isolates and PCR-positive samples. With this method, *C. burnetii* could be classified into 8 GG and up to 16 GT. Based on this methodology, a comprehensive study on the variability of *C. burnetii* in Spain have been made with samples from patients with acute and chronic Q fever, domestic and wild mammals and ticks, demonstrating a high variability of this organism and an association between genotypes and human disease.

Methods

Samples

Fifteen *C. burnetii* reference isolates were used to validate the typing method (Additional file 1: Table S1). Also, human and animal samples (livestock, wild animals and ticks) sent to the National Reference Laboratory at the Instituto de Salud Carlos III and to the clinical and veterinarian collaborating laboratories for diagnosis of Q fever were included in the study, including defibrinated blood, plasma, biopsy material, ruminant placentas, mostly from abortions with the exception of 3 cattle placentas from normal parturitions (Additional file 1: Table S1), and other tissues from domestic and wild animals, and questing ticks, that were collected from different areas in Central Spain: 4 areas in Madrid (Cercedilla, Aranjuez, Perales and Valdeolmos) and 1 in Toledo (Oropesa). In all the areas the presence of livestock was documented (cattle in all areas and sheep and swine only in Oropesa). There were remarkable high densities of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in all the areas except Cercedilla. The study protocol was approved by the Bioethics and Animal Welfare Committee of the Instituto de Salud Carlos III, Spain (ref. CBBA/4 2006), where the study was conducted, respecting individual privacy according to relevant data protection legislation and animal welfare. Also, human clinical samples used in the study were made available to us in an anonymized manner.

Culture

Standard shell-vial methodology was used as previously described [20] to grow *C. burnetii* in Vero E6 cells (European Collection of Cell Cultures; provided by Sigma-Aldrich Química S.A., Tres Cantos, Madrid, Spain). All the propagative methods and those related to

the manipulation of domestic ruminant placentas were performed under Biosafety level 3 (BSL3) conditions.

Molecular detection of *C. burnetii*

DNA was extracted from samples and isolates with the Qiagen Tissue kit (IZASA S.A. Barcelona, Spain). For arthropods, specimens were first crushed in 1.5 ml eppendorf tubes with the help of a pestle (Sigma-Aldrich Química S.A., Barcelona, Spain), as described [21], and extracted as before. DNA was quantified in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc. Wilmington, Delaware USA), and about 200 ng were used for each PCR. Previous to the genotyping, a screening assay (*IS1111*-based PCR coupled with hybridization with a specific probe by reverse line blotting -RLB) was used for the detection of *C. burnetii* [22-24].

C. burnetii genotyping

An analysis based on a previous report [15] was performed to identify which genes/ORFs defined the ascription of each isolate to a specific GG, and seven of them were selected (CBU0007, CBU0071, CBU0168, CBU0598, CBU0881, CBU1805 and CBU2026), whose combination of presence/absence seems to determine the GG (Table 1). Also, the detection of *adaA* (CBU0952) [19] was included in the method. Primers and probes were designed for their molecular detection by PCR and subsequent RLB hybridization (Additional file 2: Table S2) by using Oligo6 software (Molecular Biology Insights, Inc. Cascade, CO, USA). Incompatibility among primers was avoided by *in silico* analysis of the formation of secondary structures, and oligonucleotides forming dimers with energy values lower than -6 kcal/mol and hairpins with Tm higher than 40°C were discarded. The specificity of the oligonucleotides was first assessed by blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides>). The reaction mix included 80 µg/tube of bovine serum albumin (Roche España, Madrid, Spain), 3.75 mM MgCl₂ (Applied Biosystems), 200 µM dNTPs (Applied Biosystems) and 4 U of AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Amersham Pharmacia Biotech, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain). Primer

concentrations ranged from 0.6 to 1 µM (Additional file 2: Table S2). The amplification cycles included an initial cycle of 94°C for 9 min, followed by 40 cycles of 94°C 30 s, 60°C 1 min, and 72°C 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. The amplifications were performed in an MJ Research PTC-200 (Bio-Rad Laboratories, S.A., Alcobendas, Madrid, Spain) in volumes of 50 µl. Hybridization by RLB was performed as described [25] using 48°C for the hybridization and 40°C for the conjugate and the washing steps. Concentration of probes ranged from 0.8 to 6.4 pmols/µl (Additional file 2: Table S2). Two overlapping films (SuperRX, Fujifilm España S.A., Barcelona, Spain), were used in each assay to obtain a less and more exposed image for each membrane.

The sensitivity of the technique was checked with serial 10-fold dilutions of a purified DNA stock of the isolate Nine Mile phase II (NMII) and the specificity was studied by subjecting to the method 10⁴ genome equivalents of a selection of other bacterial species causing zoonoses or related illness (*Orientia tsutsugamushi*, *Rickettsia conorii*, *R. typhi*, *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Bartonella henselae*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae*).

To assess the reproducibility of the methodology, DNA extracted from 2 different passages (n and n+10) of 5 reference isolates (NMI, CS-27, Priscilla, SQ217, F2) and a local isolate from cattle (273) (Additional file 1: Table S1) were analyzed.

The results of the GT study were further analyzed by using InfoQuest™ FP 4.50 (BioRad, Hercules, CA, USA). Clustering analyses used the binary coefficient (Jaccard) and UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) to infer the phylogenetic relationships.

Results

Samples included in the study

A total of 90 autochthonous samples were included: 24 from human patients (11 from acute and 13 from chronic cases) and 66 from animals and ticks (15 from sheep, 7 from goats, 7 from cattle, 3 from rats, 1 from a wild boar and 33 from ticks); also, 15 reference strains were used to validate the method (Additional file 1: Table S1).

Sensitivity, specificity and reproducibility of the method

The detection limit of the method using purified NMII DNA was 10 genome equivalents. No reactivity was detected when testing 10⁴ genome equivalents from 8 other bacterial species causing zoonoses or related illness (data not shown). To check for reproducibility, passages "n" (Figure 1, lanes 1–6) and "n+10" (Figure 1, lanes 7–12) from 5 reference isolates and a local isolate from cattle were checked without any loss of sensitivity during *in vitro*

Table 1 Scheme of the presence/absence of the *Coxiella burnetii* ORFs selected for the determination of genomic groups

Target	GGI	GGII	GGIII	GGIV	GGV	GGVI	GGVII	GGVIII
CBU0007	+	+	+	-	+	+	+	+
CBU 0071	+	+	+	+	-	+	+	-
CBU 0168	+	+	+	-	+	+	-	+
CBU 0598	+	+	-	+	+	+	+	+
CBU 0881	+	+	+	+	+	-	-	-
CBU 1805	+	+	+	+	-	+	+	+
CBU 2026	+	-	+	+	+	+	+	+

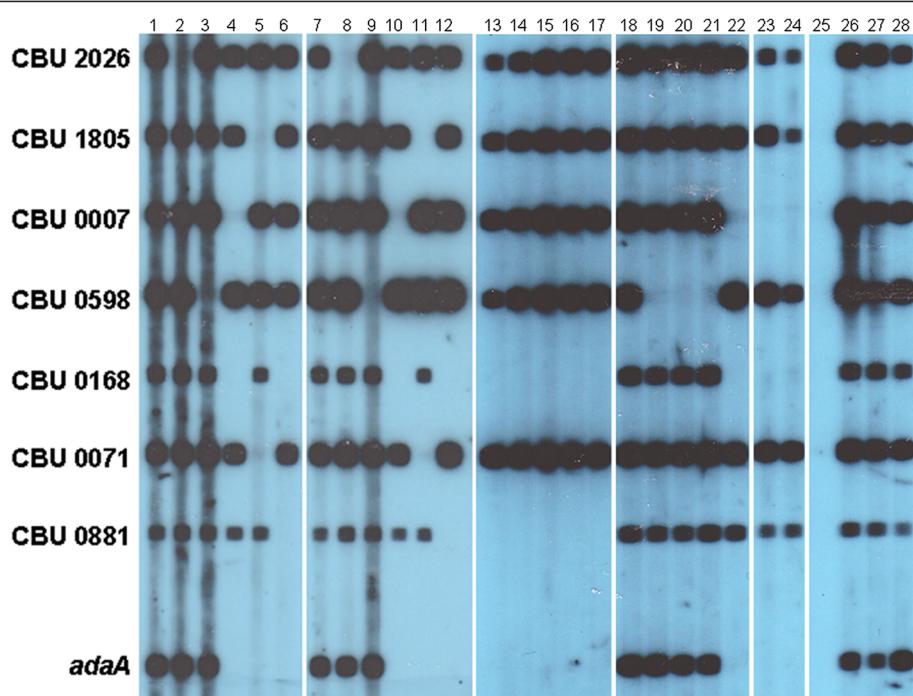


Figure 1 Sensitivity and reproducibility of the method of characterization of *Coxiella burnetii*. Reproducibility. Lanes 1–6: Isolates NMI, CS-27, local cattle isolate 273, Priscilla, SQ217 and F2, passage “n”; lanes 7–12: same isolates, passage “n+10”. Results using clinical, veterinary and arthropod samples. Lane 13: specimen of *R. sanguineus* (M28CE4GA7C); lanes 14–16: specimens of *H. lusitanicum* (M28P1GA8A, M28PE14GV5C and M28PE14GV5F); lane 17: specimen of *D. marginatus* (M28P2GA45C); lane 18: human serum (2172); lane 19: sheep placenta (70924); lane 20: goat lung (67025); lane 21: cattle endocervical exudate (70814); lane 22: human clot (BZO18); lane 23: human plasma (0904); lane 24: rat liver (78); lane 25: negative control. Sensitivity. Lanes 26–28: 10³, 10² and 10 genome equivalents of isolate NMII. Left panel: position of the probes for each ORF.

passages in any of the targets assayed. Also, it is to note that NMI (phase I) and NMII (phase II) isolates presented the same results in this characterization; consequently, only one of them (NMI) was used throughout the study.

Genotyping of reference isolates and samples

From the 15 reference isolates that were tested with the method described here for GG adscription (Table 1), and from which data from previous studies were available, all of them fell in the same GG as previously described, the topology of the tree being consistent with previous data. None of the reference isolates tested was found to belong to GG III, VI and VIII (Additional file 1: Table S1, Figure 2).

Local human samples were found to belong to GG I, IV, VII and VIII, as follows: 13 samples from chronic cases (7 endocarditis, 3 vascular infections, 1 infected aneurism, 1 osteomyelitis and 1 chronic hepatitis) from 8 different regions were all infected with GG IV, except for one vascular infection (GG VIII); acute cases (10 samples of FID with liver involvement and 1 sample of pneumonia; 4 regions) showed GG I, IV, VII and VIII (Additional file 1: Table S1, Table 2, Figures 2 and 3).

Among livestock samples, those from sheep (15 samples from 8 provinces) were found belonging to GG I, II, III, IV and VII; goats (7 samples from 4 provinces) were infected with GG III, IV and VIII; cattle (7 samples from 4 provinces) were all infected by GG III; rats (3 samples from 1 province) and a wild boar showed GG IV; finally, 33 ticks of 3 species, from 4 areas of 2 adjacent regions, carried always GG VII, except for one that carried GG VI. In summary, samples from GG I, II, III, IV, VI, VII and VIII were identified (Additional file 1: Table S1; Table 2, Figures 2 and 3).

adaA detection

Samples from GG I, II and III were always adaA positive; all GG IV were adaA negative, except for a sheep placenta that was adaA positive; GG VII samples were adaA negative, except for a tick specimen; GG VIII samples were positive, except for a human sample of acute hepatitis; finally, the only sample available from GG VI (one *H. lusitanicum* tick) was adaA negative (Additional file 1: Table S1, Table 2, Figure 2). All the samples from cases of acute FID with liver involvement (10 samples from 3 distant regions; Figure 3) were adaA negative and the only sample available from a patient with pneumonia was adaA positive.

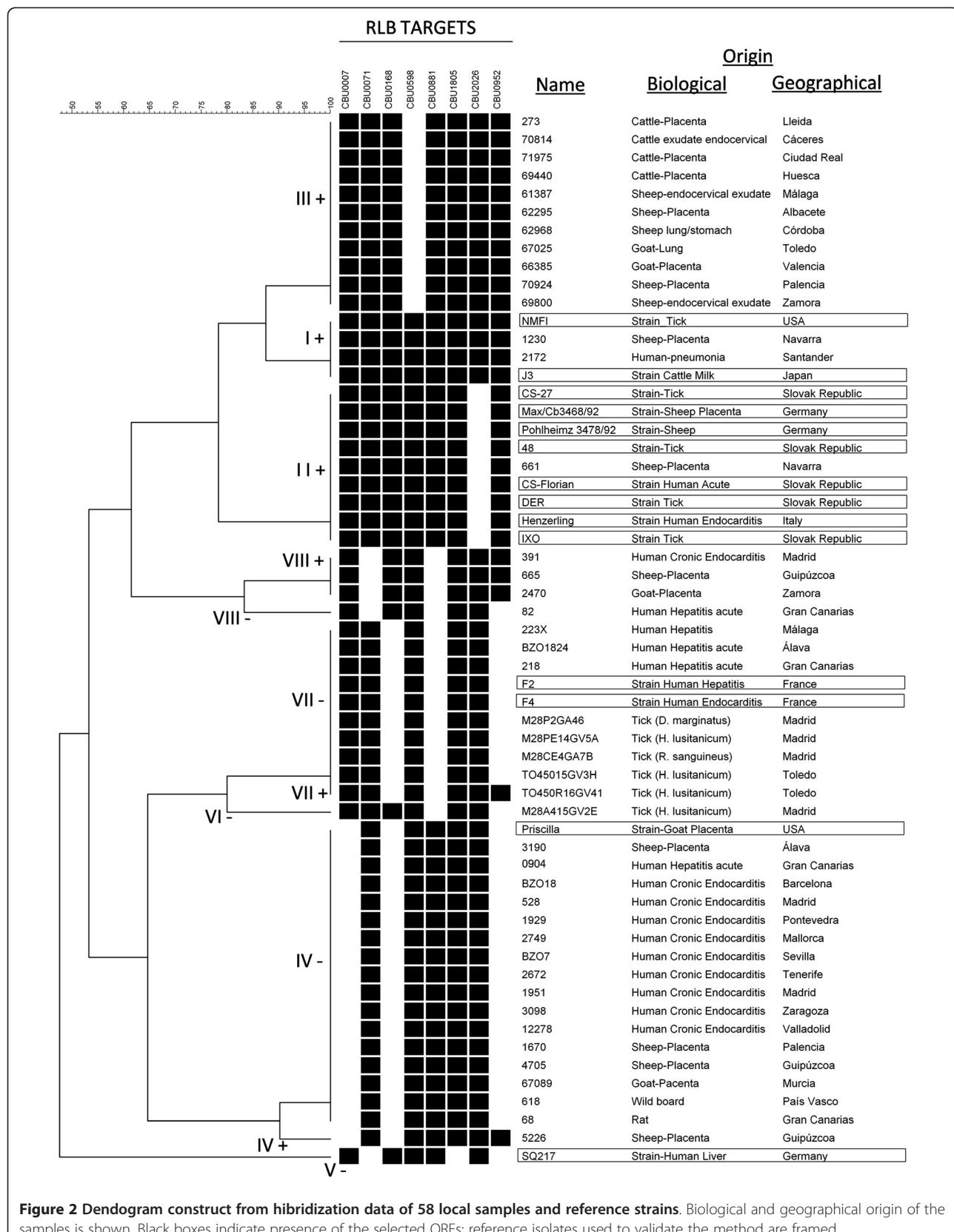


Figure 2 Dendrogram construct from hybridization data of 58 local samples and reference strains. Biological and geographical origin of the samples is shown. Black boxes indicate presence of the selected ORFs; reference isolates used to validate the method are framed.

Table 2 Summary of the results of the characterization

GT	Human samples			Livestock			Wild animals	Ticks	Total
	Acute hepatitis	Acute pneumonia	Chronic	Sheep	Goat	Cattle			
I+*		1		1					2
II+				1					1
III+				5	3	7			15
IV+				1					1
IV-	6		12	5	1		4		28
VI-							1	1	1
VII+							1	1	1
VII-	3						31	34	
VIII+		1		1	2	3			6
VIII-	1								1
Total	10	1	13	15	7	7	4	33	90

*: plus and minus signs refer to *adaA* presence/absence, respectively.

In summary, from the theoretically possible 16 GT (8 GG positive or negative for *adaA*), 10 were identified in the samples studied (Table 2).

Discussion

A multiplex PCR coupled with hybridization by RLB for the characterization of *C. burnetii* was designed, allowing for its classification into the previously known 8 GG [15] and into up to 16 genotypes, depending on *adaA* presence/absence. For validation, 15 reference strains characterized in previous studies were used (Additional file 1: Table S1). All of them

fell in the same GGs as previously described, when data was available, or grouped in the same clade as described [8-10,12,13]. Consequently, an excellent correlation with some previously published schemes and, specifically, with the microarray-based whole genome typing of Beare et al. [15] was observed: the 4 isolates studied by Beare et al. that were also analyzed in this study (NMI, GG I; Henzerling, GG II; Priscilla, GG IV; and Scurry Q217, GG V) were classified with this method into the same GG as described. Also, the analysis of the results by InfoQuest disclosed a tree whose topology was similar to that of Beare et al. [15], with the

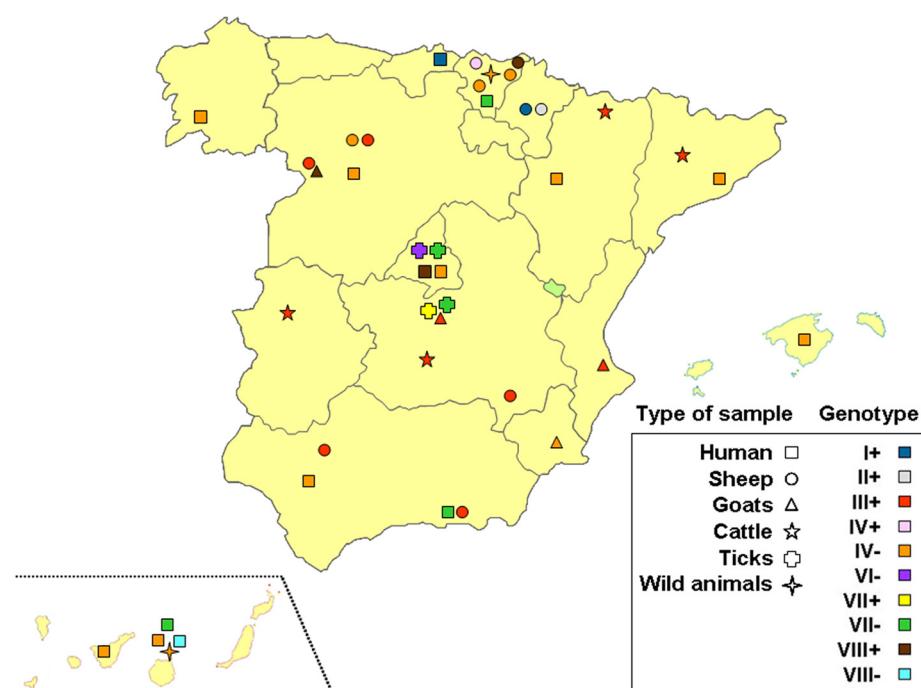


Figure 3 Map of Spain showing sampling sites, type of samples and results.

only exception of GG VIII, which in this study grouped together with GGs I, II and III, instead of with GGs IV, V, VI and VII as in the Beare study.

With this methodology, a preliminary characterization of *C. burnetii* variants circulating in Spain has been performed showing a high variability of this organism in clinical and environmental settings, identifying 7 GG, with the exception of GG V, and 10 different GTs.

In Spain, while a respiratory disease is observed in about 80% of cases reported from the Northern region of the Basque Country [26,27], the Southern regions of Andalusia and the Canary Islands report a clear predominance (about 90% of cases) of FID with liver involvement [28-34]. This last has also been described in Australia, France, Greece, or Taiwan [35-38], among others. Even taking into account the limited size of this study and the constraint of an extrapolation, a strain-associated factor that might explain the different clinical presentations of acute Q fever is hypothesized for our country. The pattern observed in cases of acute Q fever indicates an association between absence of *adaA* and FID with liver involvement, produced in this study by *adaA* negative strains in both regions (the Southern regions of Andalusia and the Canary Islands), although is not statistically significant in this study ($p = 0.09$) due to low number of samples. Also, another sample of a case of hepatitis from the north (Basque Country) yielded an *adaA* negative result as well. The same applies for the 2 reference isolates from hepatitis cases analyzed in this study: F2, a French isolate and SQ217, recovered in the USA from a case of chronic hepatitis, are both *adaA* negative as well. In contrast, pneumonia predominates over liver involvement in Northern Spain, being the only case of this clinical form available for the study produced by an *adaA* positive strain. No other marker used in this study correlated with the clinical presentation of acute Q fever. Availability of samples from cases of acute Q fever for genotyping is much less frequent than from cases of chronic Q fever, even though acute Q fever is much more prevalent. In this study, 11 samples from acute cases were analyzed, although only one was from a case with respiratory symptoms, reflecting the limited availability of such samples, which may be due to a poor clinical awareness.

From the 10 GTs found in the country, only 5 have been detected in humans and, among them, GT IV- is the most frequently found in acute and chronic cases (75% of cases). This GT has also been found in many mammal species (sheep, goat, wild boar and rats). Whether this could be interpreted as a higher tendency of this GT to cause illness in humans can not be inferred by this study, mainly considering that most of the acute cases (8/11) came from the same area (Gran Canaria Island). In any case, GT IV- is highly prevalent also in our chronic cases that came from 8 distant areas of the country, showing a more intensive circulation of this GT in humans.

The association previously proposed between *adaA*-negative strains and chronic disease [19] has been reproduced here for all chronic cases studied (13 cases), except for a sample from a vascular infection that was *adaA* positive. Beare et al. [15] hypothesized that the association between GG IV and chronic cases (as in 12 out of 13 chronic cases studied here) could be related to the slow growth of isolates from this genotype and, therefore, the induction of a decrease in the immune response. On the other hand, Zhang et al. hypothesized that *adaA* positive strains were related to acute cases [19], as it is the case of the only sample from a patient with acute pneumonia available. However, in our study, acute cases of FID with liver involvement were all produced by *adaA* negative strains.

GTs found in humans were also found in sheep, goats, rats, wild boar and ticks. This distribution of GTs suggests that sheep and goats are responsible for the transmission of *C. burnetii* to humans in Spain, as in other areas [39], and exhibit a high variability of GT. However, although in general domestic ruminants are important reservoirs for *C. burnetii* and play a relevant role in its transmission to humans, 4 of 24 human samples were found carrying GTs not found in ruminants in this work. A recent Spanish study [40] has also detected *C. burnetii* in roe deer, wild boar, carrion birds and hares. Although there is no data available on the genotyping of these specimens, more studies are needed to characterize the enzootic cycle of *C. burnetii* and its GT distribution in wildlife, as well as to ascertain whether other sources could be responsible for the transmission of *C. burnetii* to humans. GG VII was only found in ticks (*H. lusitanicum*, *Dermacentor marginatus* and *Rhipicephalus sanguineus*) and in 3 cases out of 10 of FID with liver involvement. It is to note that, while reference isolates from ticks belonged mostly to GG II, this GG has not been found in ticks in our study. Although the analyzed tick specimens came from 5 different areas, they were all from Central Spain, which could be biasing this data. Transmission of Q fever by tick bite still remains controversial [41,42], and cases of simultaneous or consecutive infections with *C. burnetii* and other tick-borne agents have been described [43]. Whether *C. burnetii* can be transmitted by tick bite or not, the detection in ticks of GT VII-, found only in human patients revives this debate. More studies are needed to definitely clarify this question. On the other hand, given that GG VII isolates have not been found in cattle, sheep and goats in this study, we could think of other unknown reservoirs that could be involved as a source of infection of this GG for both ticks and humans. Traditional mammal species on which the tick species analyzed in this study feed on include rabbits (frequent all over Spain) for the immature stages of *H. lusitanicum*, which seems to be very important for the maintenance of populations of this tick species, small mammals

for those of *D. marginatus*, and canids for all stages of *R. sanguineus*. Adult *H. lusitanicum* and *D. marginatus* normally feed on large ungulates. Animals present in the tick study areas included, apart from cattle, high densities of rabbits and other wildlife. It is to note that 40 liver samples from rabbits hunted in Gran Canaria analyzed by PCR were all negative (data not shown), although more studies are needed. Whether some of the above mentioned animals may act as reservoirs for GG VII *C. burnetii* remains to be studied.

Interestingly, in 7 cattle samples from 4 distant regions, only GG III was detected. In the study of Arricau-Bouvery [13] most of the cattle isolates (12/14) analyzed by MLVA also grouped together in a clade that is close but different to the one that include GG I isolates, as in this study. In Beare's study GG III is also phylogenetically close to GG I and both clades appear together in the tree. This GG having never been found in humans in Spain so far lead us to hypothesize that cattle could represent a low risk for Q fever transmission to humans in our country.

One of the added values of the method described here is that it could be applied to any PCR-positive sample carrying at least 10 genome equivalents of the target organism, thus avoiding the need for culturing the organism to obtain data on the global circulation of *C. burnetii*. The frequent lack of human isolates from outbreaks, which are needed to apply the yet described methods, hamper a correct outbreak study that are necessary to identify the source of infection. This methodology allows the characterization directly from clinical samples avoiding the culture step of this fastidious bacterium, and proves to be valuable identifying so far 10 different GTs circulating in Spain. This method can be performed in any laboratory with basic equipment. It can easily determine relationships among *C. burnetii* from different origins by using PCR-positive samples, thus helping in the identification of the source of an outbreak in a rapid analysis.

Conclusions

The method described here is rapid, reproducible and sensitive. It can be applied directly to clinical and environmental samples, and is able to identify up to 16 GT. This will facilitate the acquisition of global data on the circulation of GT of this organism.

We have found a high variability of *C. burnetii* in Spain, with 10 GTs found in different settings, 5 of them in human samples. Interestingly, all the samples from acute cases of FID with liver involvement were produced by *adaA* negative microorganisms, while the only case of pneumonia available for the study was caused by a *adaA* positive strain. Moreover, the majority (12 cases) of the 13 chronic cases studied were produced by organisms of GG IV-, except for a case of vascular infection (GG VIII +).

Regarding livestock, human cases share GTs with sheep and goats, but the only GT found in cattle has never been found in humans.

The most frequent GT found in ticks (GT VII-; 31 out of 33 specimens studied) was also found in human samples of cases of FID with liver involvement. Although the hypothesis of transmission of Q fever by tick bite still remains controversial, to further study this point is of interest.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Samples and reference isolates used in the study.

Additional file 2: Table S2. Oligonucleotides used in the study.

Acknowledgements

We thank Dr. Marco Quevedo, from the Institute of Virology, Bratislava, Slovakia, and Dra. Fatima Bacelar from the Centro de Estudios de Vectores y Doenças Infectiosas, Aguas de Moura, Portugal, for their help in setting up the culture method for *C. burnetii*, and Aleida Villa, from EXOPOL, Zaragoza, Spain, for providing local strains from livestock.

We are grateful to COST action B28 C05.0103 "Array technologies for BSL3 and BSL4 pathogens" for providing a platform of cooperation and for the exchanging of bacterial strains with other European laboratories, specifically with the Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany (Dr. Dimitrios Frangoulidis) and the Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia (Dr. Rudolf Toman).

Grant support for this work was from FIS PI10/00165, FUNCIS 26/03 from the Gobierno de Canarias "Diagnóstico directo de rickettsiosis prevalentes en nuestro medio (fiebre Q y tifus murino)", from the "Departamento de Agricultura y Pesca, Gobierno Vasco" "Ensaya de control de la fiebre Q en la cabaña ovina lechera de la CAPV", INIA FAU2006-00002-C04-01 to -04 "Ecología y control de la fiebre Q: Epidemiología molecular de *Coxiella burnetii*", and AGL2010-21273-C03-01-GAN from CICYT "Interacciones-inmuno endocrinas materno-fetal y con *Coxiella burnetii* en vacas lecheras de alta producción".

Author details

¹Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales, Department of Bacteriology, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. de Pozuelo km 2.6, Majadahonda, Madrid 28220, Spain. ²Microbiology Service and Infectious and Tropical Diseases Unit, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Av Marítima del Sur, s/n, 35016 Las Palmas, Spain.

³Department of Production and Animal Health, NEIKER - Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Berreaga Kalea, 1, Derio, Bizkaia 48160, Spain. ⁴Department of Animal Health, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta de Hierro, s/n, Madrid 28040, Spain.

⁵Department of Animal Production, Universidad de Lleida, Pl. de Víctor Siurana, 1, Lleida 25003, Spain. ⁶Internal Medicine Service, Hospital Comarcal de Laredo, Avda. de los Derechos Humanos, s/n, Laredo, Cantabria 39770, Spain. ⁷Hospital Universitario Donostia y CIBERES, Pº Doctor José Beguiristain s/n, Donostia-San Sebastián, Guipúzcoa 20014, Spain.

⁸Department of Animal Medicine and Surgery, Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Campus Universitario de Arucas s/n, Arucas, Las Palmas 35413, Spain. ⁹Present address: Department of Molecular Genetics and Microbiology, Center for Infectious Diseases, Stony Brook University, Stony Brook, NY 11794-5120, USA.

Authors' contributions

IJ, HG, RE and PA participated in the design of the study. CCR, MB, JLPA and NFR studied clinical and environmental samples from Canary Islands suspected of *C. burnetii* infection and provided the positives to the Centro Nacional de Microbiología-Instituto de Salud Carlos III (CNM-ISCIII) for molecular analysis. JFB, IA and ALGP studied livestock and tick samples from the Basque Country and provided the positives to the CNM-ISCIII for characterization. AT and ASO studied environmental samples from Madrid

and provided the positives to the CNM-ISCIII for characterization. BS and FLG studied livestock samples from Catalonia and provided the positives to the CNM-ISCIII for molecular analysis. FPV and GC studied samples from Q fever patients and provided the positives to the CNM-ISCIII for molecular analysis. IJ, CGA and MRV participated in the culture and manipulation of the isolates in the BSL3 laboratory. IJ and PA designed the method of characterization. IJ, RE, CGA, BL and MRV evaluated and carried out the genotyping method. HG and PA performed the phylogenetic analysis. IJ, HG, RE and PA participated in the interpretation of data and drafted the manuscript. All authors have critically read and approved the final version of the manuscript and also concur with further revisions of it.

Received: 31 October 2011 Accepted: 1 June 2012

Published: 1 June 2012

References

1. Raoult D, Marrie TJ, Mege JL: Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis* 2005, **5**:219–226.
2. Rotz LD, Khan AS, Lillibridge SR, Ostroff SM, Hughes JM: Public health assessment of potential biological terrorism agent. *Emerg Infect Dis* 2002, **8**:225–230.
3. Minnick MF, Heinzen RA, Reschke DK, Frazier ME, Mallavia LP: A plasmid-encoded surface protein found in chronic-disease isolates of *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 1991, **59**:4735–4739.
4. Samuels JE, Frazier ME, Mallavia LP: Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infect Immun* 1985, **49**:775–779.
5. Stein A, Raoult D: Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. *Microb Pathog* 1993, **15**:177–185.
6. Nguyen SV, Hirai K: Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of *isocitrate dehydrogenase* gene. *FEMS Microbiol Lett* 1999, **180**:249–254.
7. Andoh M, Nagaoka H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. *Microbiol Immunol* 2004, **2004**(48):971–975.
8. Hendrix LR, Samuel JE, Mallavia LP: Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *J Gen Microbiol* 1991, **137**:269–276.
9. Jager C, Willems H, Thiele D, Baljer G: Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol Infect* 1998, **120**:157–164.
10. Glazunova O, Roux V, Freylikman O, Sekeyova Z, Fournous G, Tyczka J, Tokarevich N, Kovacava E, Marrie TJ, Raoult D: *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis* 2005, **11**:1211–1217.
11. Mediannikov O, Fenollar F, Socolovschi C, Diatta G, Bassene H, Molez JF, Sokhna C, Trape JF, Raoult D: *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS Negl Trop Dis* 2010, **4**:e654.
12. Srivatsa S, Toman R, Skulert L, Slaba K, Homan WL: Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett* 2006, **254**:268–274.
13. Arricau-Bouvery N, Hauck Y, Bejaoui A, Frangoulidis D, Bodier CC, Souriau A, Meyer H, Neubauer H, Rodolakis A, Vergnaud G: Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol* 2006, **6**:38.
14. Roest HI, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, van den Brink R, Derckx D, Wouda W, Spijlenburg MA, van der Spek AN, Buijs R, de Boer AG, Willemsen PT, van Zijderveld FG: Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2011, **17**:668–675.
15. Beare PA, Samuel JE, Howe D, Virtaneva K, Porcella SF, Heinzen RA: Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. *J Bacteriol* 2006, **188**:2309–2324.
16. Denison AM, Thompson HA, Massung RF: IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. *BMC Microbiol* 2007, **7**:91.
17. Huijsmans CJ, Schellekens JJ, Wever PC, Toman R, Savelkoul PH, Janse I, Hermans MH: Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:2051–2057.
18. Hornstra HM, Priestley RA, Georgia SM, Kachur S, Birdsall DN, Hilsabeck R, Gates LT, Samuel JE, Heinzen RA, Kersh GJ, Keim P, Massung RF, Pearson T: Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS One* 2011, **6**:e26201.
19. Zhang G, To H, Russell KE, Hendrix LR, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, Samuel JE: Identification and characterization of an immunodominant 28-kilodalton *Coxiella burnetii* outer membrane protein specific to isolates associated with acute disease. *Infect Immun* 2005, **73**:1561–1567.
20. Musso D, Raoult D: *Coxiella burnetii* blood cultures from acute and chronic Q-fever patients. *J Clin Microbiol* 1995, **33**:3129–3132.
21. Toledo A, Olmeda AS, Escudero R, Jado I, Valcárcel F, Casado-Nistal MA, Rodríguez-Vargas M, Gil H, Anda P: Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am J Trop Med Hyg* 2009, **81**:67–74.
22. Willems H, Thiele D, Frolich-Ritter R, Krauss H: Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Zentralbl Vet B* 1994, **41**:580–587.
23. Berri M, Laroucau K, Rodolakis A: 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* 2000, **72**:285–293.
24. Barandika JF, Hurtado A, García-Estebe C, Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, Juste RA, Anda P, García-Pérez AL: Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**:6166–6171.
25. Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez-Alonso MI, Sousa R, García-Pérez AL, Rodríguez-Vargas M, Lobo B, Anda P: Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol* 2006, **44**:4572–4576.
26. Montejío-Baranda M, Corral-Carranceja J, Aguirre-Errasti C: Q fever in the Basque Country: 1981–1984. *Rev Infect Dis* 1985, **7**:700–701.
27. Montes M, Cilla G, Vicente D, Nieto V, Ercibengoa M, Perez-Trallero E: Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984–2004): a hyperendemic area of Q fever. *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1078**:129–132.
28. Alarcón A, Villanueva JL, Viciana P, López-Cortés L, Torronteras R, Bernabeu M, Cordero E, Pachón J: Q fever: epidemiology, clinical features and prognosis. A study from 1983 to 1999 in the South of Spain. *J Infect* 2003, **47**:110–116.
29. Bolaños M, Santana OE, Pérez-Arellano JL, Ángel-Moreno A, Moreno G, Burgazoli JL, Martín-Sánchez AM: Fiebre Q en Gran Canaria: 40 nuevos casos. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2003, **21**:20–23.
30. Lepe JA, Guerrero FJ, Ruiz-Calderón A, del Castillo E, Gómez-Salvago S, Jiménez-Alonso MA, Palomo S, Pérez R: Epidemiología de la fiebre Q en la zona norte de Huelva. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1999, **17**:65–68.
31. Pascual-Velasco F, Borobio MV, González Z, Carrascosa M: Clinical presentation of acute Q fever in Lanzarote (Canary Islands): a 2-year prospective study. *Scand J Infect Dis* 1996, **28**:533–534.
32. Rivero A, Zambrana JL, Pachón J: Fiebre de duración intermedia. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2003, **21**:147–152.
33. Romero-Jiménez MJ, Suárez-Lozano I, Fajardo JM, Benavente A, Menchero A, de la Iglesia A: Hepatitis como manifestación única de la fiebre Q: características clínicas y epidemiológicas en 109 pacientes. *Enferm Infect Microbiol Clin* 2003, **21**:193–195.
34. Millán Mon A, Argany Fajardo A, Febles Bethencourt J, González Caloca C, Vento Remedios TE, Fernández Cabrera M: Fiebre Q en la isla de La Palma. Revisión de 35 pacientes. *An Med Interna* 1989, **6**:527–530.
35. Derrick E: The course of infection with *Coxiella burnetii*. *Med J Aust* 1973, **1**:1051–1057.
36. Tissot Dupont H, Raoult D, Brouqui P, Janbon F, Peyramond D, Weiller PJ, Chicheportiche C, Nezri M, Poirier R: Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med* 1992, **93**:427–434.
37. Gikas A, Kofteridis DP, Manios A, Pediaditis J, Tselenitis Y: Newer macrolides as empiric treatment for acute Q fever infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**:3644–3646.
38. Chang K, Yan JJ, Lee HC, Liu KH, Lee NY, Ko WC: Acute hepatitis with or without jaundice: a predominant presentation of acute Q fever in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2004, **37**:103–108.
39. Tissot-Dupont H, Amadei MA, Nezri M, Raoult D: Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis* 2004, **10**:1264–1269.
40. Astobiza I, Barral M, Ruiz-Fons F, Barandika JF, Gerrikagoitia X, Hurtado A, García-Pérez AL: Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet Microbiol* 2011, **147**:190–194.
41. Cinco M, Luzzati R, Mascioli M, Floris R, Brouqui P: Serological evidence of *Rickettsia* infections in forestry rangers in north-eastern Italy. *Clin Microbiol Infect* 2006, **12**:493–495.

42. Pascual-Velasco F, Carrascosa-Porras M, Martínez-Bernal MA, Jado-García I: *Fiebre Q tras picadura de garrapata.* *Enferm Infect Microbiol Clin* 2007, 25:360.
43. Rolain JM, Gouriet F, Brouqui P, Larrey D, Janbon F, Vene S, Jarnestrom V, Raoult D: Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clin Infect Dis* 2005, 40:82–88.

doi:10.1186/1471-2180-12-91

Cite this article as: Jado et al.: Molecular method for the characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. *BMC Microbiology* 2012 12:91.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



OE 3.1. Seroprevalencia de la infección por *Coxiella burnetii* en las Islas Canarias.

Los objetivos de este estudio fueron:

- Conocer la seroprevalencia de la infección por *Coxiella burnetii* en las Islas Canarias.
- Evaluar las características epidemiológicas asociadas.
- Comparar la influencia de los distintos puntos de corte en el diagnóstico de infección pasada.

Para ello, se analizó una muestra representativa de la población canaria, compuesta por 662 individuos. Para la detección de anticuerpos de clase IgG frente a *Coxiella burnetii* fase II se empleó una inmunofluorescencia indirecta, comenzando a una dilución 1/20. En los casos en los que la IgG fue $\geq 1/80$ se realizó la IgM frente a *Coxiella burnetii* en fase II.

La seroprevalencia global observada fue del 21,5%, oscilando entre el 13,2% en la isla de Fuerteventura al 32,5 % en la isla de Lanzarote. La seroprevalencia en Tenerife fue del 17,7% y en Gran Canaria fue del 23,5%.

En todos los grupos de edad se detectaron individuos con anticuerpos frente a *Coxiella burnetii*, siendo del 13 % en menores de 16 años (la muestra recoge a individuos mayores de 6 años). Asimismo se detectaron anticuerpos tanto en los individuos del medio rural, semiurbano y urbano.

En este estudio se hizo una comparación de las variables epidemiológicas utilizando distintos puntos de corte (1/20 y 1/80). Y salvo en los individuos dedicados a la agricultura y ganadería, en los que la prevalencia fue mayor del 40%, en todos los demás parámetros estudiados había diferencias estadísticamente significativas al comparar los distintos puntos de corte.

Concluimos que la infección por *Coxiella burnetii* es endémica en todas las Islas Canarias, que afecta a individuos de todas las edades aunque con más frecuencia a los varones mayores de 30 años y que se debería sospechar esta infección en todos los individuos con un cuadro febril sin localización.

INFECTIOUS DISEASES

Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain)

M. Bolaños¹, O.-E. Santana¹, A. Angel-Moreno², J.L. Pérez-Arellano², J.M. Limiñana³, L. Serra-Majem⁴ & A.M. Martín-Sánchez¹

¹Servicio de Microbiología; ²Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical; ³Unidad de Investigación, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria; ⁴Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Accepted in revised form 9 September 2002

Abstract. *Objectives:* The aims of our study were: (i) to know the seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in the Canary Islands, (ii) to evaluate its epidemiologic features and (iii) to compare the rates of seroprevalence using two different cut-offs (1:20 and 1:80) for the diagnosis of past infection. *Methods:* We analysed a representative sample of the canarian population. 662 sera were tested. For the detection of IgG and IgM antibodies against *C. burnetii* phase II antigens an immunoassay was used. The serologic screening for IgG detection begun with a 1:20 dilution. A titer of IgG $\geq 1:80$ along with a negative IgM were used as criteria for previous infection. *Results:* At an IgG antibody titer against *C.*

burnetii of 1:80 as diagnostic for past infection, the observed global seroprevalence was 21.5%. If the cut-off used was 1:20, the observed prevalence increased up to 35.8% ($p = 0.001$). Significantly different seroprevalence rates were obtained at these different cut-offs when results were analysed for groups of age and socioeconomic status, but not for either the island of origin or for farmers. *Conclusion:* Our results strongly suggest that *Coxiella burnetii* infection is endemic in all the Canary Islands. Although it is more frequent in males above 30 years old, it do affect people of all ages, and thus it should be borne in mind in the face of any acute febrile syndrome.

Key words: Canary Islands, *Coxiella burnetii*, Q fever, Seroprevalence

Introduction

Q fever is a worldwide zoonosis caused by *Coxiella burnetii*. This microorganism can divide only intracellularly, but is able to survive and spread in free-cell media.

The Canary Islands form an archipelago of seven islands situated in the Atlantic Ocean between 27° and 29° north (Figure 1). At the beginning of the seventies Q fever was first described in tourists who had been spending their holidays in the islands [1]. Soon in the eighties, the Centro National de Microbiología, Virología e Immunología Sanitarias at Majadahonda, Madrid, first recorded the existence of sera with significant titers of antibodies against *Coxiella burnetii* received from Tenerife [2]. The first native case from Lanzarote was reported in 1987 [3] and the first series of 35 patients registered between 1986 and 1989 from La Palma was published shortly after [4]. In the following years, four series from Lanzarote [5], the northern area of Gran Canaria island [6], Tenerife [7] and the southern area of Gran Canaria [8] were published. A total of 170 cases of Q fever have been reported in our community, most commonly presenting as a febrile illness with liver

involvement. Only a few cases presented as pneumonia or endocarditis.

The first seroepidemiologic study on human Q fever in the Canary Islands was conducted in Lanzarote in 1986 [9]. In this study, a 3% of the population had IgG antibodies against *C. burnetii*, measured by complement fixation technique (CF). In 1989, a similar study was conducted in the same island, showing an antibody rate close to 6% in the adult population [10]. In 1991, a third study [5] involving the whole population of Lanzarote through a representative sample of 1.016 sera yielded a 10.9% rate by CF and of 18.7% by an indirect immunofluorescence assay (IFA). In Tenerife, on a sample of 308 human sera, a 11.6% rate of IgG antibodies has been reported by IFA [11]. However, a systematic study on the seroprevalence of *C. burnetii* in the Canary Islands as a whole has not been conducted till now.

The aims of our study were: (a) to know the seroprevalence of *C. burnetii* antibodies in the Canary Islands, (b) to evaluate the epidemiology of the infection in this area, and (c) to compare the rates of seroprevalence by using two different cut-offs (IgG titers $\geq 1:20$ and $\geq 1:80$ respectively) for the diagnosis of past infection.

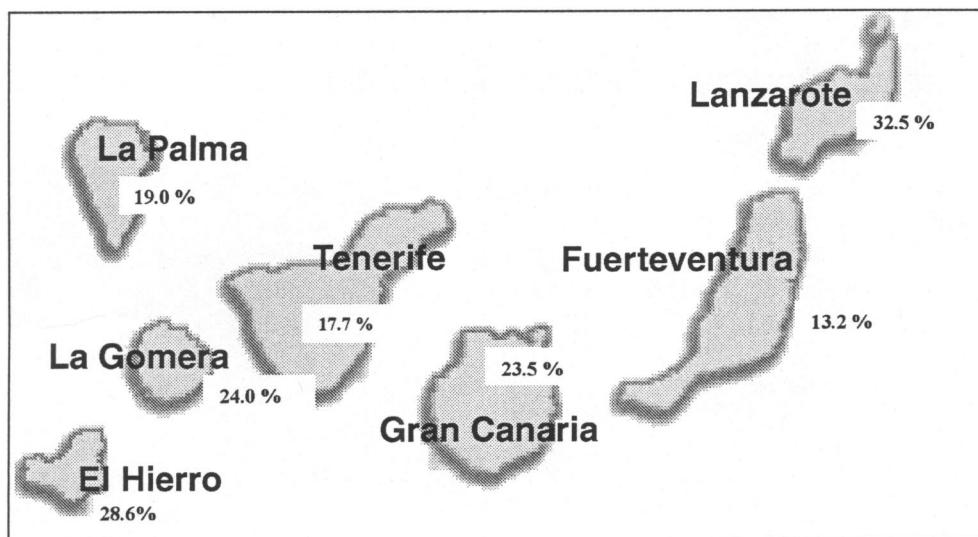


Figure 1. Prevalence of IgG antibodies against *Coxiella burnetii* in the Canary Islands (cut-off 1:80).

Material and methods

Characteristics of the geographic area

The area in this study included all the seven Canary Islands. The estimated population in 1996 was 1,606,549 people (50.4% women, 49.6% men) giving a population density of 219 people by km². The distribution by age is as follows: (i) 20.6% below 16 years, (ii) 27.7% between 16 and 30 years, (iii) 22.5% between 31 and 45 years, (iv) 18.7% between 46 and 65 years, and (v) older than 65 years 10.5%. The two main islands (Gran Canaria and Tenerife) account for 85.5% of the population.

Study method

We analysed a representative sample of the population obtaining sera in coincidence with the 1998 National Survey on Nutrition [12], and preserving them at -70 °C until testing. The study universe was constituted by all the canarian population aged between 6 and 75 years old, every person at this age range who was living and censed in the canarian community towns was the base-population. The sampling technique was two-step made, stratified by habitat and randomized by conglomerates, the towns being the sampling primary unit, and the people censed in them being the last one. A total of 662 sera were tested, 368 corresponding to women and 294 to men.

For the detection of IgG and IgM antibodies against *C. burnetii* phase II antigens a IFA was used (bioMérieux, France). A titer of IgG $\geq 1:80$ along with a negative IgM were used as criteria for previous exposition, although the serologic screening for IgG detection begun with a 1:20 dilution. Acute Q fever was diagnosed if the titer of IgG were $\geq 1:320$ and IgM $\geq 1:50$.

We recorded the following epidemiologic data: age, sex, profession or occupation, socioeconomic status (low, medium, high), place (island, village) and type of residence (rural: less than 10,000, semiurban: between 10,000 and 100,000 and urban: more than 100,000 people).

Statistical analyses

We used the SPSS statistic pack in its 10.0 version for Windows. The statistics used were the *t*-student for independent samples (differences among means and proportions) and the χ^2 (Chi-square) independence test. A value for $p < 0.05$ was required for significance.

Results

As reflected in Table 1, if we choose an IgG antibody titer against *C. burnetii* of 1:80 as diagnostic proof for past infection, the observed global seroprevalence was 21.5%. If the cut-off was 1:20, the observed prevalence increased up to 35.8% ($p = 0.001$). Significantly different seroprevalence rates were obtained at these two different cut-offs when results were analysed for groups of age or socioeconomic status, but not for either the island of origin or for farmers.

If we assumed a cut-off of 1:80 IgG titer, we observed a significant positive correlation between seroprevalence rates and age, from 13.2% in children and young below 16 to 28.1% in persons aged 45 or older ($p = 0.003$). A clear inflexion point was observed at 30 years. Men showed a higher seroprevalence rate 25.2% vs. 18.5% ($p = 0.047$).

We found a higher seroprevalence rate in occupations related with farming (42.4%, $p = 0.009$). No differences were observed when rates were compared

Table 1. Epidemiological features of the infection by *Coxiella burnetii* in the Canary Islands

	Titers \geq 1:80 (%)	Titers \geq 1:20 (%)	p value
Seroprevalence	21.5	35.8	0.001
Sex			
Men	25.2	35.7	0.008
Women	18.5	35.9	0.001
Age (years)			
16	13.2	24.8	0.027
16–30	11.9	22.9	0.049
31–45	25.2	39.3	0.009
46–65	28.1	45.3	0.001
>65	24.6	42.0	0.047
Habitat			
Rural	23.3	36.6	0.001
Semiurban	19.1	34.0	0.002
Urban	20.6	36.4	0.003
Socio-economic status:			
Low	20.6	36.0	0.001
Medium	23.2	33.5	0.046
High	19.5	34.5	0.042
Farmers	42.4	51.5	0.624

for rural or urban type of residence, or for the socioeconomic status.

The prevalence rates among the different Canary Islands vary from 13.2% in Fuerteventura to 32.5% in Lanzarote (Figure 1).

In six cases (0.9%) out of the 662 tested sera samples, titers of IgG $\geq 1:320$ and IgM $\geq 1:50$ were obtained, indicating acute or recent infection.

Discussion

Various clinical and epidemiological studies conducted in our community indicate that Q fever is a frequent disease in the Canary Islands. This has been confirmed in the present study as we find a global prevalence of IgG antibodies against *Coxiella burnetii* of 21.5%. Seroprevalence rates significantly differ depending on the chosen value for the IgG titer (1:20 or 1:80) as indicative for past infection. This fact, as noted by other authors too [13, 14], raises the importance of unifying the methodological criteria (serologic techniques and cut-offs) to use in the different studies to permit a more accurate comparison of data.

Other studies conducted in Spain with similar methodology (using IFA and an IgG cut-off at 1:80) have found seroprevalence rates that vary according to the geographic area, from 5.1% in Huelva (southwest of the Iberian peninsula) [14] to 40.6% in Leon (center-north) [15], with mid rates of 12.7% in Madrid [16] and 20.8% in Soria (central and central-northern areas, respectively) [17]. In the Basque

Country (northern Iberian peninsula), using IFA and a cut-off point of 1:20, a seroprevalence rate of 38.5% was obtained, similar to that in our study [18].

Only 22.8% of the positive sera in our study had IgG titers $\geq 1:320$. Some authors take these titers as indicative of acute infection [13, 14]; however there are insufficient data to support this assumption.

In a recent study from our hospital [8], the seroprevalence (IgG $\geq 1:80$) rate obtained on clinical samples (sent by clinicians for *C. burnetii* serology testing) was of 23.9%, similar to that detected in the healthy people in our island. Similar results (18.7 and 18.0% respectively) have been reported from Lanzarote [5]. These results suggest that the seroprevalence on clinical samples would actually be reflecting the true global seroprevalence in that community.

When we analyse the seroprevalence according to sex, we observe that it is higher for men ($p = 0.004$). Some other studies find similar result while others, like the one conducted in Salamanca [19] find a similar seroprevalence for both sexes. Anyway, it seems clear that these differences, at least in rural areas, could be explained by occupational hazards. So, in the study from Lanzarote [5], the global prevalence was similar for both sexes, but when comparing the results for adults, the rate was higher for women, who in these areas are those mainly occupied in farming labours.

It is well known that Q fever tends to affect preferentially people in their third decade, and this result is also obtained in our study.

Interestingly, 13.3% of young people (below 16 years old) had antibodies indicative of previous infection by *C. burnetii*. This result differs from those obtained in Soria and Huelva, with seroprevalence rates for this population of 5.0 and 0.6% respectively [14, 17], and suggests that Q fever should be ruled out in children with a febrile illness in our community. Of note, a study from Japan [20] found that 32.7% of cases of flu-like illnesses in children were due to acute *C. burnetii* infection.

The seroprevalence rates in our study were higher for farmers (42.4%). However, the rates were similar when comparing rates for urban, semiurban or rural areas.

In high prevalence areas, like our islands seems to be, the finding of antibodies of the IgM class against *Coxiella burnetii* is uncommon in the general population. So, only 0.9% of the sera had titers indicative of acute infection. Somewhat lower prevalence rates have been obtained from the Basque Country (0.3%) [18]. This low rates suggest that the presence of IgG titers $\geq 1:320$ plus positive IgM titers could indeed be accepted as diagnostic for acute Q fever provided a compatible clinical context.

In summary, our results strongly suggest that *Coxiella burnetii* infection is endemic in all the seven Canary Islands. Although it is more frequent in males above 30 years old, it can affect people from all ages,

and thus it should be borne in mind in the setting of any febrile, clinically compatible syndrome.

Acknowledgements

This study was supported by Gobierno de Canarias. Consejería de Educación, Cultura y Deportes.

References

1. Palosuo T, Leinikki P, Pettersson T, et al. Hazards of expanding tourism: Report of six cases of Q fever in Finland. *Scand J Infect Dis* 1974; 6: 173–176.
2. Téllez A, Sainz C, Echevarria C, et al. Q fever in Spain: Acute and chronic cases, 1981–1985. *Rev Infect Dis* 1988; 10: 198–202.
3. Laynez Cerdeña P, Pascual Velasco F. Fiebre Q en Lanzarote. *Can Med* 1987; 3: 37–38.
4. Millán Mon A, Argany Fajardo A, Febles Bethencourt J, et al. Fiebre Q en la isla de La Palma. Revisión de 35 pacientes. *An Med Intern (Madrid)* 1989; 6: 527–530.
5. Pascual Velasco F. Estudio epidemiológico de la fiebre Q en la isla de Lanzarote (Canarias). Tesis doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 1994.
6. Farfante J, Lafarga B, Sagrera J, et al. Fiebre Q. Estudio de 14 casos en la isla de Gran Canaria. *Can Med* 1992; 7: 23–26.
7. Laynez P, Romero F, Pérez A, et al. Fiebre Q. Revisión de 35 casos en la isla de Tenerife. *An Med Intern (Madrid)* 1994; 11(suppl 1): 85.
8. Santana OE, Rodríguez E, Rodríguez J, et al. Características epidemiológicas y presentación clínica de fiebre Q en pacientes hospitalizados. *Can Med* 1999; 14: 103–107.
9. Pascual Velasco F, Otero Ferrio I, Borobio Enciso MV. Estudio de la prevalencia de anticuerpos frente a *Coxiella burnetii* en la población sana de Lanzarote (Islas Canarias). *An Med Intern (Madrid)* 1991; 8: 233–234.
10. Pascual Velasco F, Rodríguez Pérez JC, Otero Ferrio I, et al. Seroprevalencia de la fiebre Q en la población natural adulta de Lanzarote (Isla Canarias). *An Med Intern (Madrid)* 1992; 9: 428–432.
11. Del Castillo A, Pérez Cabrera MA, De Armas F, et al. 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, 1995.
12. Serra Majem L. Encuesta Nutricional de Canarias 1997–1998. Servicio Canario de Salud. Santa Cruz de Tenerife, 1999.
13. Pascual Velasco F. Fiebre Q. Junta de Castilla y León. Zamora, 1996.
14. Lepe JA, Guerrero FJ, Ruiz Calderón A, et al. Epidemiología de la fiebre Q en la zona norte de Huelva. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1999; 17: 65–68.
15. Suárez J, Rodríguez JI, Gutiérrez CB, et al. Seroepidemiological survey of Q fever in Leon province, Spain. *Eur J Epidemiol* 1996; 12: 245–250.
16. Téllez A, Martín A, Anda P, et al. Study of *C. burnetii* human and animal seroprevalence in rural population in Madrid community. *Eur J Epidemiol* 1989; 5: 444–446.
17. Saz JV, Bacellar F, Merino FJ, et al. Seroprevalencia de la infección por *Coxiella burnetii* y *Rickettsia conorii* en la provincia de Soria. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1993; 11: 469–473.
18. Sanzo JM, García Calabuig MA, Audicana A, et al. Q fever: Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in the Basque Country. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 1183–1188.
19. Ruiz Beltrán R, Herrero Herrero JI, Martín Sánchez AM, et al. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia typhi* in Salamanca Province (Spain). Serosurvey in the human population. *Eur J Epidemiol* 1990; 6: 293–299.
20. Nagaoka H, Akiyama M, Sugieda M, et al. Isolation of *Coxiella burnetii* from children with influenza-like symptoms in Japan. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 147–151.

Address for correspondence: Dr Antonio M. Martín Sánchez, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, C/ Dr Pasteur s/n, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain
Phone: +34-928-451-459; Fax: +34-928-451-416
E-mail: amartin@dcc.ulpgc.es

OE 3.2. Seroprevalencia de la infección por *Rickettsia typhi* y *R. conorii* en las islas Canarias (España)

Tras la detección de casos clínicos de tifus murino se planteó realizar un estudio de seroprevalencia para:

- Conocer la seroprevalencia de la infección por *Rickettsia typhi* y *Rickettsia conorii* en las Islas Canarias.
- Evaluar las características epidemiológicas asociadas a ambas infecciones.

Para ello se analizó una muestra representativa de la población canaria, compuesta por 662 individuos. Para la detección de anticuerpos de clase IgG frente a *Rickettsia typhi* y *R. conorii* se empleó una inmunofluorescencia indirecta, comenzando a una dilución 1/40.

La seroprevalencia global observada fue del 3,9% frente a *R. typhi* y del 4,4% frente a *R. conorii*. La seroprevalencia mas alta frente a *R. typhi* correspondió a los individuos residentes en la Gomera (19,1%) y las mas baja la de los individuos residentes en Gran Canaria (1,5%). Frente a *R. conorii* la seroprevalencia mas alta corresponde a los habitantes de la isla de El Hierro (9,7%) y la mas baja a los residentes en Lanzarote (no existen individuos con serología positiva).

La seroprevalencia fue similar en ambos sexos y se demostraron resultados positivos en todos los grupos de edad , aunque con un porcentaje mayor en los mayores de 46 años.

La seroprevalencia frente a *Rickettsia typhi* fue mas prevalente en áreas rurales y en los individuos dedicados a labores de agricultura y ganadería.

A pesar de que ambas especies de rickettsia comparten antígenos comunes por lo que las técnicas serológicas pueden dar resultados falsos positivos, en esta muestra solo se encontraron tres individuos con ambos resultados positivos.

Concluimos que así aunque existen casos clínicos de infección por *Rickettsia typhi*, no se han diagnosticado casos autóctonos de infecciones por *R. conorii*. Por ello, sospechamos que deben existir otras rickettsias del grupo de las fiebres exantemáticas que estén produciendo infecciones en individuos residentes en estas islas.



Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infections in the Canary Islands (Spain)

Margarita Bolaños-Rivero ^a, Évora Santana-Rodríguez ^{a,b}, Alfonso Ángel-Moreno ^{c,d}, Michele Hernández-Cabrera ^{c,d}, José-María Limiñana-Canal ^e, Cristina Carranza-Rodríguez ^{c,d}, Antonio-Manuel Martín-Sánchez ^{a,b}, José-Luis Pérez-Arellano ^{c,d,*}

^a Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain

^b Departamento de Ciencias Clínicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain

^c Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain

^d Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria 35080, Spain

^e Servicio de Bioestadística, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 January 2011

Received in revised form 19 March 2011

Accepted 30 March 2011

Corresponding Editor: Jane Zuckerman,
London, UK.

Keywords:

Rickettsia typhi

Rickettsia felis

Rickettsia conorii

Seroepidemiology

SUMMARY

Objective: The aim of this work was to evaluate the prevalence of past infection due to *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* in the Canary Islands (Spain).

Methods: A representative sample of the population of the seven islands, formed of 662 people aged between 5 and 75 years (368 females, 294 males), was analyzed. Epidemiological data were obtained by direct survey. The detection of serum IgG antibodies against both microorganisms was based on an indirect immunofluorescence test, considered positive if the titers were $\geq 1/80$.

Results: Of the analyzed population 3.9% had IgG antibodies against *R. typhi* and 4.4% against *R. conorii*. Out of these positive samples, only three were positive for both species. The seroprevalence was similar in both sexes. Positive results were found in all age groups, but a higher rate was noticed in those aged 46 years and older ($p < 0.05$). *R. typhi* was found to be more prevalent in rural areas of all islands, as well as in farmers.

Conclusions: Our results confirm the presence of antibodies against the causative agents of murine typhus and Mediterranean spotted fever in the Canary Islands. Indirect data suggest that the detection of antibodies to *R. conorii* might be due to a cross-reaction between these species.

© 2011 International Society for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Infections caused by different species of the genus *Rickettsia* are a broad group of zoonoses with a worldwide distribution. However, depending on the species and the vectors involved in their transmission, the incidence of these infections varies significantly in different geographical areas.

Murine or endemic typhus is a zoonosis caused by *Rickettsia typhi*.¹ The classic biological cycle of *R. typhi* infection includes rats (*Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*) as a reservoir and the oriental rat flea (*Xenopsylla cheopis*) as a vector. The usual way of transmission is percutaneous inoculation of the microorganisms present in flea feces. However, this classic cycle seems to have been replaced in some regions by the peri-domestic animal cycle (urban and suburban outbreaks) involving cats, dogs, opossums and their fleas (*Ctenocephalides felis*).² Inhalation of desiccated flea feces has also been described as an additional mechanism of transmission.³

The disease usually presents as an acute febrile illness (7–28 days of duration) associated with headache and a skin rash.⁴ Its distribution is worldwide, with endemic areas in the southern areas of the USA, South America, Australia, Southeast Asia, and Southern Europe.^{5,6} The disease also occurs in Spain, as some reports of sporadic cases^{7–12} and a few clinical series^{13–16} have shown. In addition, some epidemiological studies in central,^{17,18} northeastern,¹⁹ and southern^{20–22} Spain have shown a seroprevalence of *R. typhi* ranging between 3.8% and 18%.

Mediterranean spotted fever caused by *Rickettsia conorii* is endemic in some areas of Spain^{17,23} and other Mediterranean countries, as well as in different areas of Asia and Africa. The disease is transmitted to humans by the bite of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*, and usually manifests itself as a febrile illness with headaches, arthromyalgia, skin rash, and a characteristic black eschar ('tache noire') at the inoculation site.

Data on the seroprevalence of antibodies against the causative agents of both infections in the Spanish population are scarce, and no such study has ever been conducted in the Canary Islands. The aim of our study was to analyze the seroprevalence and epidemiology of *R. typhi* and *R. conorii* in the Canary Islands.

* Corresponding author. Tel.: +34 928 451455; fax: +34 928 451413.

E-mail address: jlperez@dcmq.ulpgc.es (J.-L. Pérez-Arellano).

2. Subjects and methods

2.1. Characteristics of the geographic area

The Canary Islands are an archipelago of seven islands of volcanic origin in the Atlantic Ocean, located around latitude 27°–29° North and 14°–18° West. There are great differences between the islands with regard to their size and altitude (between 600 and 3700 m), which determine a great climate variability. The presence of trade winds and the actual relief of the islands of Fuerteventura and Lanzarote result in an arid climate, whereas the rest of the islands have different ecosystems.

The area in this study comprised the seven Canary Islands. The estimated population in 1996 was 1 606 549 people (50.4% female, 49.6% male), resulting in a population density of 219 people per square kilometer. The distribution by age was as follows: 20.6%

younger than 16 years; 27.7% between 16 and 30 years; 22.5% between 31 and 45 years; 18.7% between 46 and 65 years; and 10.5% older than 65 years. The two main islands, Gran Canaria and Tenerife, account for 85.5% of the population.

2.2. Study method

We analyzed a representative sample of the population by obtaining sera associated with the 1998 National Survey on Nutrition²⁴ and preserving it at –70 °C until testing was performed. Informed consent was obtained from each subject, so that the serum could be used for our study. The study universe was constituted of the entire population aged between 5 and 75 years. The base population comprised every single person registered in the census. A two-stage sampling by conglomerates was performed, with the municipality (county) being the primary

Table 1
Cases of positive IgG titers ($\geq 1/80$) for *Rickettsia typhi* and/or *Rickettsia conorii* obtained from a representative sample ($N = 662$) of the general population on the Canary Islands (Spain)

Case	Age (years)	Sex (M/F)	Island	<i>R. typhi</i> (IgG)	<i>R. conorii</i> (IgG)
1	58	M	La Gomera	1/2560	$\leq 1/40$
2	61	F	La Palma	1/2560	$\leq 1/40$
3	46	F	Lanzarote	1/640	$\leq 1/40$
4	61	F	Tenerife	1/640	$\leq 1/40$
5	58	M	La Gomera	1/640	$\leq 1/40$
6	39	F	La Gomera	1/640	$\leq 1/40$
7	54	M	Tenerife	1/640	$\leq 1/40$
8	68	F	Gran Canaria	1/320	$\leq 1/40$
9	21	M	Tenerife	1/320	1/80
10	74	M	La Palma	1/320	$\leq 1/40$
11	15	F	El Hierro	1/320	$\leq 1/40$
12	70	M	La Palma	1/320	$\leq 1/40$
13	64	F	La Gomera	1/320	$\leq 1/40$
14	58	M	Fuerteventura	1/160	$\leq 1/40$
15	40	F	La Gomera	1/160	$\leq 1/40$
16	57	F	La Gomera	1/160	$\leq 1/40$
17	15	F	El Hierro	1/160	1/80
18	75	F	El Hierro	1/160	$\leq 1/40$
19	14	F	Gran Canaria	1/80	1/80
20	35	F	Gran Canaria	1/80	$\leq 1/40$
21	63	M	Tenerife	1/80	$\leq 1/40$
22	74	M	La Gomera	1/80	$\leq 1/40$
23	55	M	La Gomera	1/80	$\leq 1/40$
24	75	M	El Hierro	1/80	$\leq 1/40$
25	20	M	La Gomera	1/80	$\leq 1/40$
26	58	M	Gran Canaria	1/80	$\leq 1/40$
27	65	M	Fuerteventura	$\leq 1/40$	1/160
28	59	M	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
29	69	M	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
30	68	M	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/160
31	47	F	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
32	55	M	Tenerife	$\leq 1/40$	1/80
33	63	M	Tenerife	$\leq 1/40$	1/160
34	62	M	La Gomera	$\leq 1/40$	1/80
35	8	F	La Palma	$\leq 1/40$	1/80
36	54	F	La Palma	$\leq 1/40$	1/80
37	69	F	La Palma	$\leq 1/40$	1/160
38	8	M	El Hierro	$\leq 1/40$	1/80
39	51	F	Tenerife	$\leq 1/40$	1/80
40	59	M	Tenerife	$\leq 1/40$	1/160
41	69	M	Tenerife	$\leq 1/40$	1/80
42	14	F	Tenerife	$\leq 1/40$	1/160
43	44	F	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
44	53	F	Tenerife	$\leq 1/40$	1/320
45	64	F	Fuerteventura	$\leq 1/40$	1/80
46	63	F	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
47	61	F	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
48	44	M	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
49	63	M	El Hierro	$\leq 1/40$	1/80
50	31	M	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
51	26	M	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80
52	66	M	Gran Canaria	$\leq 1/40$	1/80

IgG, immunoglobulin G; M, male; F, female.

unit of the sampling and the individuals registered in it, the secondary unit. A total of 662 sera were tested, 368 from females and 294 from males.

The following epidemiological data were recorded for each person: age, sex, profession or occupation, socioeconomic status (low, medium, high), and place (village, island) and type of residence (rural: <10 000 inhabitants, semi-urban: between 10 000 and 100 000, and urban: >100 000 inhabitants).

2.3. Serological technique

Human serum samples were evaluated by indirect immunofluorescence assay (IFA) with commercially available antigens for *R. typhi* and *R. conorii* (*Rickettsia mooseri*- Spot IF, *Rickettsia conorii*-Spot IF, BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The antigens were obtained from cultures on Vero cells and then fixed on the slides. Titers of immunoglobulin G (IgG) $\geq 1/80$ were considered positive (indicative of past infection). We also evaluated the presence of immunoglobulin M (IgM) antibodies against both species of Rickettsia. According to the manufacturer's specifications, the sensitivity and specificity of these tests are over 90% for both antigens.

2.4. Statistical analysis

Biostatistical analysis was performed using SPSS version 10.0 for Windows statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA). The Chi-square test was performed to establish associations between the different variables taken into consideration and the Student's *t*-test for the average comparison of normal values. A *p*-value of <0.05 was considered significant.

3. Results

The seroprevalence (IgG) of *R. typhi* infection was 3.9% (26 positive samples) and the seroprevalence (IgG) of *R. conorii* infection was 4.4% (29 positive samples). The highest titer of antibodies found against *R. conorii* was 1/320 (only one sample), while seven positive samples for *R. typhi* presented higher titers, two of them reaching a value of 1/2560 (Table 1). Only three serum samples had antibodies against both rickettsial species. In these

Table 2

Epidemiological data for subjects with serological evidence of past infection due to *Rickettsia typhi* and/or *Rickettsia conorii*. Data are expressed as number (n) and percentage (%) of positive cases.

	IgG against <i>R. typhi</i> $\geq 1:80$		IgG against <i>R. conorii</i> $\geq 1:80$	
	n	%	n	%
Sex				
Male	14	53.8	16	55.2
Female	12	46.2	13	44.8
Age (years)				
<16	3	11.5	5	17.2
16–30	2	7.7	2	6.9
31–45	3	11.5	3	10.3
46–65	12	46.2	14	48.3
>65	6	23.1	5	17.2
Residence				
Rural	14	53.8	9	31.0
Semi-urban	6	23.1	7	24.1
Urban	6	23.1	13	44.8
Socioeconomic status				
High	6	23.1	9	31.0
Medium	12	46.2	11	37.9
Low	8	30.7	9	31.0
Island				
Gran Canaria	4	15.4	12	41.4
Fuerteventura	1	3.8	2	6.9
Lanzarote	1	3.8	0	0
Tenerife	4	15.4	8	27.6
La Palma	3	11.5	3	10.3
La Gomera	9	34.6	1	3.4
El Hierro	4	15.4	3	10.3

IgG, immunoglobulin G.

samples the titers against *R. conorii* reached a value of 1/80, while those against *R. typhi* were: 1/80, 1/160, and 1/320 in each case. None of the 662 subjects studied had IgM antibodies against both species of Rickettsia.

Seroprevalence rates for both diseases in relation to sex, age, type of residency, socioeconomic status, and occupation are shown in Table 2. The rates were similar for males and females. Positive titers were found in all age groups, but were significantly higher in people aged 46 years or older (*p* < 0.05). In terms of residence pattern, the seroprevalence of murine typhus was higher in rural

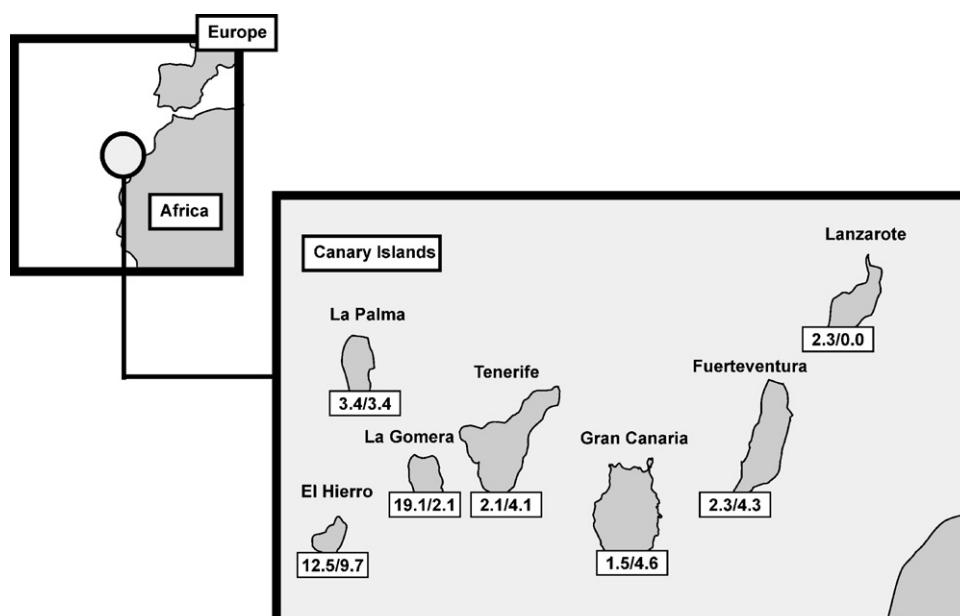


Figure 1. Seropositivity rates for *Rickettsia typhi*/*Rickettsia conorii* on each of the seven Canary Islands, expressed as percentages.

than in urban areas (53.8% vs. 23.1%; $p < 0.05$). On the other hand, positive immunofluorescent antibody test results for *R. conorii* were more prevalent in urban than in rural areas (44.8% vs. 31.0%), although this difference was not statistically significant. In terms of professional occupation, an association with farming was found only for *R. typhi* (11.9%; $p < 0.05$).

The geographical distribution (Figure 1) shows that *R. typhi* is present on all seven Canary Islands, with the highest prevalence rates being on the islands of El Hierro and La Gomera (12.5% and 19.1%; $p < 0.05$). Positive titers against *R. conorii* were not found in individuals from the island of Lanzarote, but were found from the other six islands, with the highest rate being on El Hierro (9.7%).

4. Discussion

Mediterranean spotted fever is a well-known disease in Spain; some endemic areas exist, and cases are clustered in the spring and summer. However, murine typhus, very frequent after the Spanish Civil War in the 1940 s, has became a virtually forgotten disease in the last decades. Information on the prevalence and geographical distribution of these two infections is scarce and extrapolated from clinical series.

As opposed to Mediterranean spotted fever, murine typhus is not considered endemic in any Spanish region, and data on the seroprevalence in the healthy population are even scarcer. In our study, we found that 3.9% of the studied subjects had titers equal to or greater than 1/80 against *R. typhi* and 4.4% subjects were seropositive for *R. conorii*. Although a similar seropositivity could be interpreted as a cross-reaction between *R. typhi* and *R. conorii*,^{17,23,25} the analysis of the positive cases (Table 1) makes this interpretation unlikely. In fact, antibodies to both species of rickettsiae were only detected in three subjects, and at low titers. In addition, samples with higher titers against *R. typhi* were negative for *R. conorii*.

The seroprevalence to *R. typhi* in the Canary Islands (3.9%) is notably lower than that recorded by Ruiz-Beltrán et al.¹⁷ in Salamanca (northwest region of the Spanish Iberian peninsula; 12.8%), but higher than that reported by García-Curiel et al. (1984)²¹ in Seville (southwest Spain; 0.6–2% for people aged ≥ 10 years). Interestingly, no clinical cases of murine typhus have been reported in Salamanca and, conversely, the largest series in Spain has been published in Seville, with 104 cases being reported in 17 years, accounting for 6.7% of all patients admitted to the hospital with fever of an intermediate duration in that area.¹⁴ In the previously mentioned study performed in Salamanca,¹⁷ there were no statistically significant differences observed concerning the seropositivity with regard to age, sex, habitat, geographic area, or occupation. Our data present several differences, mainly in terms of geographical distribution, occupation, and age. Thus, the presence of antibodies against *R. typhi* was associated with a rural residence and farming. In addition, the seropositivity was higher as the age of the studied individuals increased. However, the rate in children under 16 years of age was 2.3%. Data reported from several studies suggest that children are equally susceptible to infection, but diagnosis is frequently missed.^{26–28}

Until recently, the description of cases of murine typhus from the Canary Islands was anecdotal.¹² However in recent years, two series of cases have been published in Tenerife¹⁵ and Gran Canaria.¹⁶ Moreover, in this last series, the patients showed some clinical differences (i.e., renal involvement) in comparison to those reported in other geographical areas.

With regard to the presence of antibodies against *R. conorii* in the Canary Islands, we found an overall prevalence of 4.4%. This rate is lower than those reported from other Spanish regions in which the disease is endemic.^{17,21,29} However, some areas that are

not considered endemic such as the province of Soria,³⁰ show a prevalence rate similar to ours.

An important aspect to note is that while autochthonous cases of murine typhus have been described from the Canary Islands, no case of Mediterranean spotted fever has yet been reported. Although the seroprevalence rate and the IgG titers are low, there is the suspicion of a possible cross-reaction between *R. conorii* and other spotted fever group rickettsiae (mainly *Rickettsia felis* and *Rickettsia massiliae*).³¹ In fact for *R. felis*, a flea-transmitted Rickettsia causing a murine typhus-like illness: (1) it can be transmitted by the same vectors,³² (2) the cross-reactivity with spotted fever group rickettsiae has been demonstrated,³¹ and (3) several cases of human infection by *R. felis* have been recorded in the Canary Islands.³³ Moreover, Fernández de Mera et al. described the finding of *R. massiliae* in *Rhipicephalus pusillus* ticks from Gran Canaria,³⁴ a Rickettsia that has been recognized as a human tick-borne spotted fever group Rickettsia.³⁵ Therefore, we do think that the detection of antibodies against *R. conorii* represents a cross-reaction against other rickettsiae of the spotted fever group.

Finally, when analyzing the distribution of cases with antibodies to *R. conorii*, the highest prevalence was observed in urban areas, a fact reported previously in France³⁶ and in our country as well.³⁷ This change in the epidemiological pattern of the infection consists of a shift from rural towards urban.

In summary, our results confirm the presence of antibodies against the agents of murine typhus and Mediterranean spotted fever in the Canary Islands. Taking into account that no autochthonous cases of Mediterranean spotted fever have been reported from the Canary Islands and the description by our group of other species of Rickettsia (*R. felis*, *R. massiliae*), it is possible that the detection of antibodies to *R. conorii* represents a cross-reaction between these species.

Acknowledgements

The authors thank Marion Hemmersbach-Miller for reviewing this paper.

Conflict of interest: No conflict of interest to declare.

References

- Hackstadt T. The biology of rickettsiae. *Infect Agents Dis* 1996;5:127–43.
- Traub R, Wissemann CL, Azad AF. The ecology of murine typhus, a critical review. *Trop Dis Bull* 1978;75:237–317.
- Azad AF. Epidemiology of murine typhus. *Ann Rev Entomol* 1990;35:553–69.
- Bolaños M, Angel-Moreno A, Pérez-Arellano JL. Murine typhus. A disease to think about here and now. *Med Clin (Barc)* 2004;122:383–9.
- Whiteford SF, Taylor JP, Dumler JS. Clinical, laboratory, and epidemiologic features of murine typhus in 97 Texas children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:396–400.
- WHO Working Group on Rickettsial Disease. Rickettsioses: a continuing disease problem. *Bull World Health Organ* 1982;60:157–64.
- Nicolás Sánchez FJ, Ribes Amorós I, Cervera del Pino M, Sarrat Nuevo RM, Bestard Solivellas J, Cabau Rúbies J. Cavitated pneumonia caused by murine typhus. *An Med Interna* 2008;25:46–7.
- Lozano de León F, Lucio-Villegas ME, López LF, Gómez-Mateos J, García-Bragado F. Parotid involvement in murine typhus. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1991;9:585.
- Noureddine López M, Martín Escalante MD, Romero Gómez C, García Alegría JJ. Murine typhus is a cause of fever of intermediate duration. *Rev Clin Esp* 2008;208:371.
- Moreno Castillo JL, Sánchez Román J, Pamies Andreu E, Morales Sandino M, Vázquez García F, Torronteras Santiago R. Pleuropericarditis caused by *Rickettsia mooseri*. An unusual manifestation of murine typhus. *Rev Clin Esp* 1984;173:125–7.
- Gómez J, Molina M, Baños V, Sempere M. Murine typhus. Efficacy of treatment with ciprofloxacin. *Enferm Infect Microbiol Clin* 1992;10:377.
- Pascual Velasco F, Borobio Enciso MV. Acute suppurative arthritis: an unusual manifestation of murine typhus (endemic). *Med Clin (Barc)* 1991;97:142–3.
- López Cortes LF, Pachón Diaz J, Viciana Fernandez P, Cuello Contreras JA, Palomino Nicas J, Carneado de la Fuente J, et al. Tifus murino: revisión clínica y serológica de 42 casos. *Med Clin (Barc)* 1983;81:835–8.

14. Bernabeu-Wittel M, Pachón J, Alarcón A, López-Cortés LF, Viciana P, Jiménez-Mejías ME, et al. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration: a 17-year study in the south of Spain. *Arch Intern Med* 1999;159:872–876.
15. Miguélez M, Laynez P, Linares M, Hayek M, Abella L, Marañez I. Murine typhus in Tenerife. Cliniccoepidemiological study and differential clinical features with Q fever. *Med Clin (Barc)* 2003;121:613–5.
16. Hernández Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E, Bolaños M, Francès A, Martín-Sánchez MS, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 2004;10:740–3.
17. Ruiz-Beltrán R, Herrero-Herrero JL, Martín-Sánchez AM, Martín-González JA. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia typhi* in Salamanca province (Spain): serosurvey in the human population. *Eur J Epidemiol* 1990;6:293–9.
18. Lledo L, Gegundez MI, Medina J, Gonzalez JV, Alamo R, Saz JV. Epidemiological study of *Rickettsia typhi* infection in two provinces of the north of Spain: analysis of sera from the general population and sheep. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005;5:157–61.
19. Nogueras MM, Cardeñosa N, Sanfelix I, Muñoz T, Font B, Segura F. Serological evidence of infection with *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* among the human population of Catalonia, in the northeast of Spain. *Am J Trop Med Hyg* 2006;74:123–6.
20. Bernabeu-Wittel M, del Toro MD, Nogueras MM, Muniaín MA, Cardeñosa N, Márquez FJ, et al. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of Southern Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:375–81.
21. García-Curiel A, Nájera-Morondo E. Epidemiological study of rickettsiosis in the province of Seville based on serological reaction to indirect immunofluorescence. *Rev Sanid Hig Pública (Madr)* 1984;58:83–98.
22. Santibáñez S, Astasio A, Villa-Real R, Cámara JA, Oteo JA, Márquez FJ. Serologic study of *Rickettsia typhi* infection among the human population of southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(Suppl 2):247–8.
23. Font-Creus B, Espejo Arenas E, Muñoz Espín T, Uriz Urzainqui S, Bella Cueto F, Segura Porta F, et al. Mediterranean boutonneuse fever. Study of 246 cases. *Med Clin (Barc)* 1991;96:121–5.
24. Serra Majem L. Encuesta Nutricional de Canarias. ENCA. 1997–1998 (vol. 1–5). Santa Cruz de Tenerife: Servicio Canario de Salud; 1999–2000.
25. Guerin JM, Meyer P, Guillausseau PJ, Potevin P, Maroni M. Severe and uncommon form of murine typhus. *Presse Med* 1988;17:2037.
26. Marshall GS. *Rickettsia typhi* seroprevalence among children in the southeast United States. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:1103–4.
27. Dumler JS. Murine typhus. *Semin Pediatr Infect Dis* 1994;5:137–42.
28. Silpapojakul K, Chupuppakarn S, Yuthasompong S, Varachit B, Chaipak D, Borkerd T, et al. Scrub and murine typhus in children with obscure fevers in the tropics. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:200–3.
29. Espejo Arenas E, Font Creus B, Alegre Segura MD, Segura Porta F, Bella-Cueto F. Seroepidemiological survey of Mediterranean spotted fever in an endemic area (Vallés Occidental. Barcelona. Spain). *Trop Geogr Med* 1990;42:212–6.
30. Saz JV, Bacellar F, Merino FJ, Filipe A. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia conorii* infection in the province of Soria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11:469–73.
31. Fang R, Raoult D. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:221–8.
32. Noden BH, Radulovic S, Higgins JA, Azad AF. Molecular identification of *Rickettsia typhi* and *R. felis* in co-infected *Ctenocephalides felis* (*Siphonaptera: Pulicidae*). *J Med Entomol* 1998;35:410–4.
33. Pérez-Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A, Bolaños M, Hernández M, Santana E, et al. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1961–4.
34. Fernández de Mera I, Zivkovic Z, Bolaños M, Carranza C, Pérez Arellano JL, Gutierrez C, et al. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1869–70.
35. Vitale G, Mansuelo S, Rolain JM, Raoult D. *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerg Infect Dis* 2006;12:174–5.
36. Raoult D, Toga B, Chaunet H, Chiche-Portiche C. Rickettsial antibodies in southern France: antibodies to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnetii* among urban, suburban and semirural blood donors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:80–1.
37. Pons Camps R, Serra Renobales E, Cerdá Perarnau J, Puig Pujol FX. Mediterranean boutonneuse fever: retrospective study of 44 cases in the Bages region (Barcelona). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1989;7:370–3.

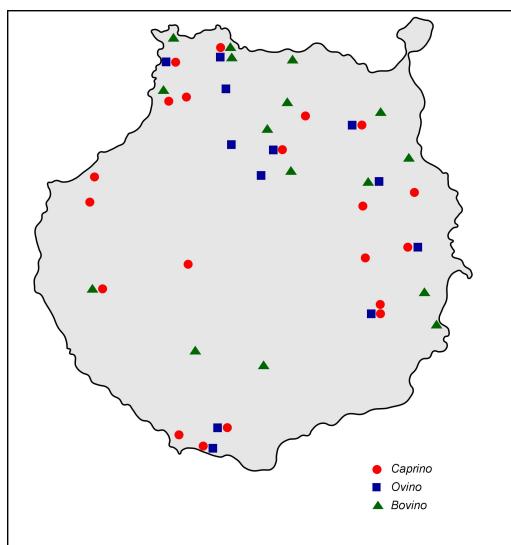
OE. 4.1. Seroprevalencia de la infección por *Coxiella burnetii* en rumiantes domésticos en la isla de Gran Canaria.

Dentro del ciclo de la infección por *Coxiella burnetii*, el ganado constituye el primer reservorio de la infección, por lo que se decidió estudiar la prevalencia de la infección en los rumiantes domésticos.

Para determinar el tamaño muestral y las zonas de muestreo se realizó una actualización de la información a través del censo ganadero, de las zonas geoclimáticas y de la distribución del ganado.

Para un nivel de confianza del 95%, con un 5% de precisión absoluta deseada y una prevalencia esperada del 10% en bovinos, del 30% en ovinos y del 50% en caprinos, el tamaño muestral fue de 1294 animales, distribuidos así: i) 733 ganado caprino, ii) 369 ganado ovino y iii) 147 ganado bovino.

La distribución de las zonas de muestreo se representa en la siguiente figura:



La sangre se obtuvo a través de la vena yugular, se centrifugó y se guardó a 4º C hasta su análisis. Para la determinación de anticuerpos frente a *Coxiella burnetii* se realizó una técnica de ELISA (Q fever Ruminants Serum , LSI, Lissieu, Francia), siguiendo las recomendaciones del fabricantes.

La seroprevalencia global obtenida fue del 46,1% , detectándose una mayor prevalencia en el ganado caprino (60,4%), en relación con el ganado ovino (31,2%) y bovino (12,2 %).



SHORT COMMUNICATION

Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Gran Canaria island, Spain

N. F. Rodríguez¹, C. Carranza², M. Bolaños², J. L. Pérez-Arellano^{2,3} and C. Gutierrez¹

¹ Department of Animal Medicine and Surgery, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Canary Islands, Spain

² Insular University Hospital of Gran Canaria, Canary Service of Health, Las Palmas, Canary Islands, Spain

³ Department of Medical and Surgical Sciences, University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, Canary Islands, Spain

Keywords:

Coxiella burnetii; Canary Islands; ruminants; zoonosis

Correspondence:

C. Gutierrez. Department of Animal Medicine and Surgery, University of Las Palmas de Gran Canaria, 35413, Las Palmas, Canary Islands, Spain. Tel.: 00 34 928451115; Fax: 00 34 928451142; E-mail: cgutierrez@dpat.ulpgc.es

Received for publication January 26, 2010

doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01116.x

Summary

Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever, a zoonosis with worldwide occurrence. In the Canary Islands, the overall seroprevalence in humans has been estimated to be 21.5%. Gran Canaria island concentrates the highest ruminant population in the archipelago and the prevalence of the human infection is 23.5%. To evaluate the seroprevalence in livestock and the affected areas in Gran Canaria island, a total of 1249 ruminants were randomly selected for this study (733 goats, 369 sheep and 147 cattle). The samples were evaluated using an indirect ELISA Kit. The results showed seroprevalences of 60.4%, 31.7% and 12.2% in goats, sheep and cattle, respectively. Based on these results, Q fever could be considered as endemic in Gran Canaria island. Sanitary measures should be taken at the farm level to minimize the risk of exposure of *C. burnetii* to humans.

Introduction

Coxiella burnetii, an obligate intracellular pathogen, is the causative agent of Q fever, a zoonosis with worldwide occurrence (OIE, 2008). The reservoir of this bacterium is extensive and includes arthropods (mainly ticks) as well as many wild and domestic mammals and birds (Sawyer et al., 1987). With 170 patients reported in all Canary Islands until 2002, the overall seroprevalence in human population is estimated to be 21.5% (Bolaños et al., 2003). Gran Canaria island, which concentrates the highest livestock census in the Archipelago, showed also one of the highest seroprevalences (23.5%). However, there is no information about *Coxiella burnetii* infection in livestock in the islands. The purpose of this work was to assess the seroprevalence in ruminant species in Gran Canaria to devise sanitary measures in the farms to avoid contact of the population with the bacteria.

Materials and Methods

A total of 1249 ruminants (733 goats, 369 sheep and 147 cattle) belonging to different ecosystems of Gran Canaria

island were randomly selected for this study. The sample size was considered at 95% level of confidence, 5% of desired absolute precision and expected prevalence of 10% for cattle, 30% for sheep and 50% for goats. Blood samples were obtained from the jugular vein, sera were obtained by centrifugation at 1.800 g for 10 min and kept at 2–8°C until their analysis. An indirect ELISA Kit was used (Q fever Ruminants Serum; LSI, Lissieu-France) and determinations were performed according to the manufacturer's recommendations.

Results and Discussion

The overall seroprevalence obtained was 34.7% (60.4%, 31.7% and 12.2% in goats, sheep and cattle, respectively). The most affected areas in the island were those in which small ruminants, particularly goats, were raised (South and East of the island), while the North area, in which cattle are concentrated, showed the lowest prevalence. Based on these results, Q fever could be considered as endemic in Gran Canaria island. Cattle, sheep and goats are the primary reservoirs of *C. burnetii*, but usually clinical signs are not observed except abortions and reproduc-

tive disorders (Lang, 1990). Q fever in humans is principally transmitted by the respiratory route, by inhalation of desiccated aerosol particles, and through contact with infected animals and their reproductive tissues (OIE, 2008). Q fever outbreaks have resulted mainly from occupational exposure involving veterinarians, meat processing plant workers, sheep and dairy workers, livestock farmers, and researchers at facilities housing sheep (CDC, 2009). Sanitary measures should be taken at any facility to minimize the risk of exposure of *Coxiella burnetii* to humans. Finally, it is important to remember that *Coxiella burnetii* is a highly infectious agent that is rather resistant to heat and drying. This agent could be developed for use in biological warfare and is considered a potential terrorist threat (CDC, 2009).

References

- Bolaños, M., O. E. Santana, A. Angel-Moreno, J. L. Pérez-Arellano, J. M. Limiñana, L. Serra-Majem, and A. M. Martín-Sánchez, 2003: Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). *Eur. J. Epidemiol.* 18, 259–262.
- CDC (Center for Disease Control), 2009: Q fever. <http://www.cdc.gov> (last accessed on 14 June 2009).
- Lang, G. H., 1990: Coxiellosis (Q fever) in animals. In: Marrie, T. J. (ed.), *Q Fever. Volume I: The Disease*, pp. 23–48. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- OIE (Office International des Épizooties), 2008. Q fever. In: *Manual of Diagnostic and Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. <http://www.oie.int> (last accessed on 14 June 2009).
- Sawyer, L. A., D. B. Fishbein, and J. E. McDade, 1987: Q fever: current concepts. *Rev. Infect. Dis.* 9, 935–946.

OE. 4.2. Estudio de la infección por *Coxiella burnetii* y *Rickettsia* spp en garrapatas y animales silvestres en Gran Canaria.

Tanto *Coxiella burnetii*, el agente causal de la fiebre Q, como diferentes especies de *Rickettsia*, son patógenos bacterianos que pueden ser transmitidos por garrapatas.

Aunque se han descrito muchos casos de fiebre Q y tifus murino en Canarias, los estudios epidemiológicos del ciclo silvestre de estas infecciones son escasos.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación del ciclo de *C. burnetii* y *Rickettsia* spp en Gran Canaria en micromamíferos y garrapatas.

Durante tres años se capturaron 229 pequeños mamíferos y se obtuvieron 1741 garrapatas.

Globalmente, *Hyalomma lusitanicum* fue la principal especie de garrapata detectada en la vegetación, establecimientos ganaderos y animales silvestres, mientras que *Rhipicephalus sanguineus* fue la principal especie de garrapata obtenida de perros domésticos.

Globalmente, la prevalencia de infección por *Coxiella burnetii* encontrada garrapatas fue del 6,8%. Existían diferencias significativas dependiendo del ámbito de estudio y del tipo de garrapatas estudiadas. Así, en ninguna de las garrapatas de la vegetación se detectó material genético de *Coxiella burnetii*. Sin embargo, la prevalencia de infección fue elevada en garrapatas obtenidas en establecimientos ganaderos.

Por otro lado, observamos la presencia de infección por *Rickettsia* spp en un elevado tanto por ciento de micromamíferos (roedores) (24%) y de garrapatas (23%). En garrapatas, la infección por *Rickettsia* era mayor en las garrapatas adheridas a animales con respecto a las presentes en la vegetación.

Estos resultados sugieren que en Canarias, el ciclo de *Coxiella burnetii* es principalmente peridoméstico, más que silvestre. Por otro lado, los micromamíferos constituyen un importante reservorio de *Rickettsia* spp en nuestra área y las garrapatas desempeñan un papel importante en la transmisión a humanos y animales.

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary
Microbiology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Detection of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp DNA in wildlife animals and ticks on Gran Canaria island (Spain).

Article Type: Short Communication

Keywords: *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp, ticks, wildlife animals, Canary Islands

Corresponding Author: Prof. Jose Luis Perez-Arellano, Full Professor

Corresponding Author's Institution: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

First Author: Margarita Bolaños-Rivero

Order of Authors: Margarita Bolaños-Rivero; Cristina Carranza-Rodriguez; Noe F Rodriguez; Carlos Gutierrez; Jose Luis Perez-Arellano, Full Professor

Abstract: *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever, and *Rickettsia* spp. are bacterial pathogens that can be transmitted by ticks. Despite the presence of numerous human cases of Q fever and murinus typhus on the Canary Islands, epidemiological information available is very limited. The aim of this study was to investigate the wild cycle of *C. burnetii* and *Rickettsia* spp in Gran Canaria (Spain), in wild animals and ticks. A total of 229 small mammals were captured and 1741 ticks were collected during the 3-year study. Globally, *Hyalomma lusitanicum* was the main species identified in vegetation, livestock and wildlife while *Rhipicephalus sanguineus* was the main tick in domestic animals. Overall, the prevalence of infection by *Coxiella burnetii* found in ticks was 6.8%. There was differences between settings and tick species analyzed. In none of the questing ticks obtained from vegetation the presence of *Coxiella burnetii* genetic material was detected. However, the prevalence of infection was high in ticks obtained on livestock farms. We found the presence of *Rickettsia* spp DNA in a high percentage of small rodents assessed (24%), while *Rickettsia* spp. DNA was detected in 23.0% of ticks. The infection prevalence was higher in feeding ticks and lesser in questing ticks.

These results suggest that on the Canary Islands, *C. burnetii* developed in a peridomestic cycle rather than in a wild cycle. Moreover, our data suggest that micromammals are an important reservoir of *Rickettsia* spp in our area and that ticks play an important role in the transmission of these infections to humans and mammals.

Detection of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp DNA in wildlife animals and ticks on Gran Canaria island (Spain).

Margarita Bolaños-Rivero^{1a}, Cristina Carranza-Rodríguez^{2,3a}, Noe F. Rodriguez⁴, Carlos Gutierrez⁵, José-Luis Pérez-Arellano^{2,3}.

1. Servicio de Microbiología y Parasitología. Complejo Hospitalario Universitario Insular – Materno Infantil de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
 2. Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Complejo Hospitalario Universitario Insular –Materno Infantil de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
 3. Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
 4. Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba, Provincia del Chimborazo, Ecuador
 5. Research Institute of Biomedical and Health Sciences, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain,
- a. These authors contributed equally to this article.

Corresponding Author:

Prof. José-Luis Pérez-Arellano. Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 35080 Las Palmas de Gran Canaria (Spain). Phone: +34928451455 Fax +34928451413 e-mail: jlperz@dcnq.ulpgc.es

Abstract

Coxiella burnetii, the causative agent of Q fever, and *Rickettsia* spp. are bacterial pathogens that can be transmitted by ticks. Despite the presence of numerous human cases of Q fever and murinus typhus on the Canary Islands, epidemiological information available is very limited. The aim of this study was to investigate the wild cycle of *C. burnetii* and *Rickettsia* spp in Gran Canaria (Spain), in wild animals and ticks. A total of 229 small mammals were captured and 1741 ticks were collected during the 3-year study. Globally, *Hyalomma lusitanicum* was the main species identified in vegetation, livestock and wildlife while *Rhipicephalus sanguineus* was the main tick in domestic animals. Overall, the prevalence of infection by *Coxiella burnetii* found in ticks was 6.8%. There were differences between settings and tick species analyzed. In none of the questing ticks obtained from vegetation the presence of *Coxiella burnetii* genetic material was detected. However, the prevalence of infection was high in ticks obtained on livestock farms. We found the presence of *Rickettsia* spp DNA in a high percentage of small rodents assessed (24%), while *Rickettsia* spp. DNA was detected in 23.0% of ticks. The infection prevalence was higher in feeding ticks and lesser in questing ticks.

These results suggest that on the Canary Islands, *C. burnetii* developed in a peridomestic cycle rather than in a wild cycle. Moreover, our data suggest that micromammals are an important reservoir of *Rickettsia* spp in our area and that ticks play an important role in the transmission of these infections to humans and mammals.

Key Words:

Coxiella burnetii, *Rickettsia* spp, ticks, wildlife animals, Canary Islands

Introduction

Arthropod-borne diseases are a major health problem in most European countries (**Parola et Raoult, 2001**). Specifically on the Canary Islands, a significant number of clinical cases of Q fever (*Coxiella burnetii* infection) and murine typhus (associated with *Rickettsia typhi* and *R. felis*) has been reported (**Bolaños et al, 2003; Hernández-Cabrera et al, 2004; Pérez Arellano et al, 2005**). Furthermore, epidemiological studies have revealed a high seroprevalence of antibodies in humans caused by these microorganisms on the Canary Islands (**Bolaños et al, 2003b; Bolaños-Rivero et al 2011**).

In the epidemiology of Q fever it is important to distinguish three types of reservoirs and / or sources of infection (**Parker el al, 2006**). Firstly, domestic or peri-domestic animals, (goats, sheep and cattle), and to a lesser extent cats and dogs are the main source of infection. A second reservoir is formed by wild animals, especially small mammals, although occasionally also birds, reptiles, amphibians and fishes. Finally, various types of ticks are a major reservoirs for *Coxiella burnetii*. The interaction between humans and the three reservoirs takes two different patterns, though linked: the “wild cycle” and the “domestic cycle”. In the wild cycle, infection of wild animals and ticks are the key elements while in the domestic cycle is the interaction between humans and livestock.

Murine typhus is a disease classically related to infection by *R. typhi* which naturally remains between host mammals (rats of the species *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus* and humans) and vectors (fleas of the species *Xenopsylla cheopis*) (**Civen and Ngo, 2008**). However , the current life cycle includes new reservoirs (i.e . dogs or cats), new vectors (i.e *Ctenocephalides felis*) and new species of *Rickettsia* (i.e. *R. felis*) (**Hernández-Cabrera et al, 2004; Pérez Arellano et al, 2005**).

On the Canary Islands, specifically on Gran Canaria, our group has reported the highest prevalence of *Coxiella burnetii* infection in ruminants, especially in goats (**Rodriguez et al, 2010**). However, information about the wild cycle of *Coxiella burnetii* or *R typhi* is currently unknown.

Thus, the aim of this study was to investigate the wild cycle of *C. burnetii* and *Rickettsia* spp on Gran Canaria (Spain), in wild animals and ticks (from wild animals, questing ticks, livestock ticks and domestic animals).

Materials and Methods

Study site

The Canary Islands are an archipelago of seven islands of volcanic origin in the Atlantic Ocean, located around latitude 27°– 29° North and 14°–18° West (**Figure 1a**). The presence of trade winds and the actual relief of the islands of Fuerteventura and Lanzarote result in an arid climate, whereas the rest of the islands have different ecosystems. Specifically, on Gran Canaria island four climatic areas were selected according to botanic and land vegetation, annual rainfall, land use altitude and temperature. These areas were *i*) The coastal area of southeast, south and southwest with dry desert soil. *ii*) The northern part with dry steppe climate *iii*) The central area with temperate climate with dry and cool summers *iv*) between both a temperate climate with warm and dry summer (**Figure 1b**).

Wildlife sampling

Sample collection was conducted from January 2006 to December 2008. Two different animals were sampled: small rodents (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus* and *R. rattus*) and lagomorphs (*Oryctolagus cuniculus*). Small rodents were captured using traps INRA traps (5 cm x 5 cm x 15 cm, BTS Mechanique, Besançon, Francia), in the vicinity of farms. Geographic coordinates of sampling sites were recorded in order to localize possible foci of *C. burnetii* infection. Feeding ticks were removed and specimens were transported to the laboratory. A complete necropsy was performed and blood and tissue samples (spleen and/or liver) were stored at -20 °C before being processed for PCR analysis. Lagomorph species were sampled during the hunting season (August to November, 2007 and 2008). Whenever possible, animals were subjected to a detailed external examination for tick collection. Feeding ticks were removed and specimens

were examined and sampled outdoors.

Tick collection and identification

Ticks were collected from four different settings from January 2006 to December 2008: *i*) questing ticks from the vegetation. *ii*) feeding ticks from wildlife animals (small mammals, lagomorphs and selvatic animals from the Center Recovery Wild Fauna of Gran Canaria) *iii*) feeding ticks from ruminants in previously identified livestocks (**Rodriguez et al, 2010**) and *iv*) feeding ticks from domestic dogs. Questing adult thicks were collected by 31 samplings during the three years of the study in the areas showed in **figure 2**. Ticks (adults, nymphs, and larvae) were collected from the vegetation by the blanket-dragging method (**Sonenshine, 1993**). Briefly, a 2 x 1.6-m white blanket was dragged for 30 minutes, and ticks attached to the blanket were collected every 5 minutes. Ticks feeding on domestic, livestocks or wild animals were manually collected. Ticks were counted and identified using taxonomic keys (**Gil-Collado et al, 1979; Manilla, 1998**), and stored at -80 °C until subsequent DNA purification.

DNA extraction and polymerase chain reaction assays.

Briefly, genomic DNA from tissue samples from wild animals was obtained by extraction kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen , Hilden , Germany) following the manufacturer's instructions. In the liver samples it was processed as maximum 25 mg tissue and in spleen samples not more than 10 mg. For DNA extraction, 70%-ethanol-disinfected ticks were individually crushed and processed with the QiAamp DNA mini kit after treatment with a proteinase K solution (Qiagen, Hilden, Alemania) at 56°C overnight. DNAs obtained and resuspended in 100 µl of elution buffer were stored at – 20^a until further use. DNA extracted, about 100-300 ng, as measured with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE), were subjected to two PCR amplifications, one for the detection of *C. burnetii* (transposase gene in insertion element IS1111) and a second for *Rickettsia* spp (23S-5S intergenic spacer) using PCR protocols previously described (**Berri et al 2000; Jado et al 2006**). Prevention of cross-contamination and false-

positives was managed using plugged tips, setting PCR reactions in a separate room from that used for post-PCR analysis, and including a negative (water) control in each run.

Ethical issues

Animal experimentation meets the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences.

Results

***C. burnetii* and *Rickettsia* spp DNA in wildlife tissues**

A total of 229 small mammals were captured during the time of the study (61 *Rattus norvergicus*, 15 *Rattus rattus*, 24 *Mus musculus* and 129 *Oryctolagus cuniculus*). Blood and tissue samples (liver and spleen) were analyzed by PCR (**Table I**). Due to technical reasons we are unable to evaluate *Rickettsia* spp DNA in rabbit samples.

Tick collection

A total of 1735 ticks were collected during the 3-year study. Detection of ticks in four different settings is expressed in **Table II**. The four main species identified were *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus*. Globally, *Hyalomma lusitanicum* was the main species identified in vegetation, livestock and wildlife while *Rhipicephalus sanguineus* was the main tick in domestic animals. A total of 26 selvatic animals were studied: 10 hedgehogs (*Atelerix algirus*), 14 birds (7 *Burhinus oeclicnemus*, 3 *Falco tinnunculus*, 1 *Falco pelegrinoides*, 1 *Buteo buteo*, 1 *Chlamydotis undulata* and 1 *Columba junoniae*) and two reptile species (*Gallotia atlantica* and *Testudo graeca*). Although the samples were taken in the four seasons, in the coldest months (November to January) no ticks were collected.

***C. burnetii* and *Rickettsia* spp DNA in ticks**

The number of ticks studied and the detection of genetic material of *C. burnetii* and

Rickettsia spp in each group is shown in **Table III**.

Overall, the prevalence of infection by *Coxiella burnetii* found in ticks was 6.8%. There were differences between settings and tick species analyzed. In none of the questing ticks obtained from vegetation the presence of genetic material of *Coxiella burnetii* was detected. However, the prevalence of infection was considered high in ticks obtained on livestock farms (11.3%), domestic dogs (6.9%) and wildlife animals (6%). The highest prevalence of infection was observed in *R. turanicus* followed by *H. lusitanicum* and *R. sanguineus*. None of the specimens of *R. pusillus* were found to be infected.

Rickettsia spp. DNA was detected in 23.0% of ticks. The prevalence of infection was higher in feeding ticks [especially those obtained from domestic dogs (30.8%)] and lesser in questing ticks (11.8%). All species of ticks harboured genetic material from *Rickettsia* spp.

Discussion

Most Q fever infections result from inhalation of infectious aerosol particles and humans rarely acquire disease through tick bites (**Parker et al, 2006**). On the other hand, the two main *Rickettsia* species of murine typhus have a different transmission pattern: *R. typhi* (typhus group) through the flea bites or inhalation of contaminated flea feces and *R. felis* (spotted fever group) through tick bites. In Spain there is scarce information about the role of small mammals and ticks questing or feeding in the *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp wild cycle. In the particular case of the Canary Islands, that information was unknown.

The first observation of interest of our study is the difference between tick species obtained on Gran Canaria and others obtained in different areas of Spain or -other European countries. The results presented here represent the first systematic study of tick abundance and tick-borne pathogens carried out on the Canary Islands. Thus, in our series, the most frequently detected tick species was *Hyalomma lusitanicum* except in those obtained from dogs (*Rhipicephalus*

sanguineus). In other Spanish regions, a different distribution of ticks has been reported. Thus, in studies conducted in the Basque Country (Northern Spain), the major types of ticks found in vegetation were *Ixodes ricinus* and *Haemaphysalis punctata*, while in Madrid (Central Spain) the most frequent species were *Hyalomma lusitanicum* and *Dermacentor marginatus* (**Barandika et al 2011**). There were important differences in the monthly seasonal patterns for the different tick species (**Barandika et al 2011**). Moreover, in other regions of Central Spain (Soria), the study of tick species that bite humans show that the main species involved were *Dermacentor marginatus*, *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus bursa* (**Merino et al 2005**). A possible bias in our study was the method of collecting samples of vegetation, because the endophilic immature stages of the some tick species, such as *H. lusitanicum*, *R. pusillus*, and *D. marginatus*, are rarely collected by the blanket-dragging method and require other more effective sampling methods (**Barandika et al 2011**). Furthermore, the climatic characteristics of the Canary Islands differ markedly from those in mainland Spain, with the absence of great climatic difference among the seasons.

The role of ticks and animals in the wild cycle maintenance of *Coxiella burnetii* infection on the Canary Islands has not been previously studied. The study on blood and tissue (liver and spleen) samples of wildlife provides various important informations. On one hand, the infection prevalence is higher in small rodents than in rabbits, being the spleen tissue in which it was detected most frequently *C. burnetii* genomic material. However, *Coxiella burnetii* DNA was not detected in the blood of small mammals. This fact, together with the low presence of feeding ticks in wildlife animals argues against the role of micromammals in the wild cycle of *Coxiella burnetii* infection on the Canary Islands. These results show some differences with other published works. Thus, in Germany, in an area of high prevalence of Q fever, *Coxiella burnetii* DNA was no detected in any tissue samples from rodents (**Pluta et al, 2010**). In other Spanish studies (**Barandika et al 2007, Astobiza et al 2011**) the presence of *Coxiella burnetii* DNA was demonstrated in 0.8% of rodents (two *Mus musculus* and one *A. sylvaticus*) and 7.1% of lagomorpha. *Coxiella burnetii* infection in

ticks seems to have a different pattern on Gran Canaria. Thus, a significant percentage of collected livestock specimens are infected with this bacterium (11.3%). In contrast, in none of the ticks questing vegetation presence of *C. burnetii* DNA could be demonstrated. It would be difficult to compare our results with those obtained by other authors because of different types of ticks. For example, in a multicenter study conducted in Europe (France, Denmark, and the Netherlands), genome of *C. burnetii* was not detected in any of 7050 *Ixodes ricinus* nymphs studied (**Michelet et al 2014**). On the other hand, no evidence of *C. burnetii* infections could be found in 666 *Dermacentor* spp collected in Germany (**Pluta et al 2010**). Finally, *Coxiella burnetii* was detected in only one specimen of 691 questing adult ixodid ticks (*Haemaphysalis punctata*) in Basque Country (Spain) (**Barandika et al 2008**). However, our results differ from those obtained in Central Spain, where a high prevalence of infection with *C. burnetii* was found in questing (8.7%) and feeding (6.4%) *Hyalomma lusitanicum* (**Toledo 2008**). These results suggest that, on the Canary Islands, *C. burnetii* developed in a peridomestic cycle rather than in a wild cycle and would be associated with infected flocks and ticks (specifically *R. turanicus* would be involved in this peridomestic cycle).

There was little information about the wild cycle of *Rickettsia* spp in Canary Islands. In this paper, we find the presence of DNA of *Rickettsia* spp in a high percentage of small rodents (24%). It is interesting to note that genetic material was detected in 19.7 % of the blood samples, suggesting that these mammals are an important reservoir of *Rickettsia* spp in our area. In addition, 23% of the studied ticks were infected by *Rickettsia* spp. Infection was higher in those ticks obtained from domestic dogs (35 %) and lower in those obtained from vegetation (11.8 %). These data suggest the possibility that ticks play an important role in the transmission of these infections to humans and mammals on the Canary Islands. Similar results have been obtained in other Spanish and European studies. Thus, in Central Spain, *Rickettsia* spp . DNA was detected in 19.0 % of ticks, being *Dermacentor marginatus* the tick in which there was a highest infection prevalence and

RpA4 strain the main species detected (**Toledo et al 2009**). However, in this study, no infection was detected by *Rickettsia* spp in *H. lusitanicum*. SFG rickettsiae (*Rickettsia* sp. RpA4 and *Rickettsia* sp. DnS14) were the tick-borne pathogens most frequently found (6.9% of analyzed ticks) in *Dermacentor reticulatus* collected in the Basque Country (**Barandika et al 2008**). In Soria (Central Spain) 14% of ticks that bite humans carried DNA from *Rickettsia* spp. (mainly *Rickettsia slovaca*) (**Merino et al 2005**). In other European studies it has been described ticks harbouring other types of *Rickettsia* as *R. raoultii* in Germany (**Pluta et al 2010**) or *R. helvetica* in other European countries (**Michelet et al 2014**). On the Canary Island we have found evidence of infection by *R. massiliae* in ticks (**Fernández de Mera et al 2009**), similar to those observed in Salamanca (Central Spain) (**Fernández-Soto et al 2006**). Further studies are needed to identify the species of *Rickettsia* present on Gran Canaria and its pathogenic role in human and livestock infections.

Acknowledgements

This work was supported by funding from INIA, FAU2006-00002-C04-01. We thank **Pino Sosa** for laboratory assistance and Rubén Hernández and Antonio Cilleros for their contribution to this study.

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no competing interest.

References

- Astobiza, I., Barral, M., Ruiz-Fons, F., Barandika, J.F., Gerrikagoitia, X., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., 2011. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. Vet Microbiol.147,190-4

Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Esteban, C., Gil, H., Escudero, R., Barral, M., Jado, I., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol.* 73, 6166-71.

Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adults ticks from Northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 829-35.

Barandika, J.F., Olmeda, S.A., Casado-Nistal, M.A., Hurtado, A., Juste, R.A., Valcárcel, F., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2011. Differences in questing tick species distribution between Atlantic and continental climates areas in Spain. *J Med Entomol.* 48:13-9.

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.

Bolaños, M., Santana, O.E., Pérez-Arellano, J.L., Ángel-Moreno, A., Moreno, G. , Burgazzoli, J.L. , Martín-Sánchez, A.M. 2003. [Fiebre Q en Gran Canaria. Aportación de 40 nuevos casos]. *Enferm Infect Microbiol Clin.* 21, 20-3

Bolaños, M., Santana, O.E., Angel-Moreno, A., Pérez-Arellano, J.L., Limiñana, J.M., Serra-Majem, L., Martín-Sánchez A.M., 2003. Seroprevalence of infection by *Coxiella burnetii* in Canary Islands (Spain). *Eur J Epidemiol.* 18, 259-62.

Bolaños-Rivero, M., Santana-Rodriguez, E., Angel-Moreno, A., Hernández-Cabrera, M., Limiñana-Canal, J.M. , Carranza-Rodríguez, C., Martín-Sánchez, A.M., Pérez-Arellano, J.L., 2011 Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infections in the Canary Islands (Spain). *Int J Infect Dis.* 15, e481-5

Civen, R., Ngo, V., 2008. Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease. *Clin Infect Dis.* 46, 913-8.

Fernández de Mera, I.G. , Zivkovic, Z., Bolaños, M., Carranza, C., Pérez-Arellano, J.L.,

Gutiérrez, C., de la Fuente, J., 2009. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. *Emerg Infect Dis.* 15,1869-70.

Fernández-Soto, P., Pérez-Sánchez, R., Díaz, M., Encinas-Grandes, A, Álamo Sanz, R, , 2006. *Rickettsia massiliae* in ticks removed from humans in Castilla y Leon, Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 25, 811–813.

Gil-Collado, J., Guillén-Llera, J.L., Zapatero-Ramos, L.M., 1979. [Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos)]. *Rev Iber Parasitol.* 39,107–111.

Hernández-Cabrera, M., Angel-Moreno, A., Santana, E., Bolaños, M., Francès, A., Martín-Sánchez, AM, Pérez-Arellano J.L., 2004. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 10,740-3.

Jado, I., Escudero, R., Gil, H., Jiménez-Alonso, M.I., Sousa, R., García-Pérez, A.L., Rodríguez-Vargas, M., Lobo, B., Anda, P. , 2006. Molecular method for identification of *Rickettsia species* in clinical and environmental samples. *J Clin Microbiol.* 44, 4572-6.

Manilla, G., 1998. *Acari Ixodida*. Fauna d'Italia. Bologna, Italy: Edizioni Calderini. 63–236.

Michelet, L., Delannoy, S. , Devillers, E., Umhang, G., Aspan, A., Juremalm, M. , Chirico, J, van der Wal, F.J., Sprong, H., Boye Pihl, T.P., Klitgaard, K., Bødker, R., Fach, P., Moutailler, S., 2014. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Front Cell Infect Microbiol.* 4,103.

Merino, F.J, Nebreda, T., Serrano, J.L., Fernández-Soto, P., Encinas, A., Pérez-Sánchez R, 2005. Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. *Epidemiol Infect.* 133, 943–949.

Parker, N.R., Barralet , J.H., Bell, A.M., 2006. Q fever. *Lancet.* 367,679-88

Parola, P., Raoult, D., 2001. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 7,80–83.

Pérez-Arellano, J.L., Fenollar, F., Angel-Moreno, A., Bolaños, M., Hernández, M., Santana,

E., Hemmersbach-Miller, M., Martín, A.M., Raoult, D., 2005. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 1, 1961-4.

Pluta, S., Hartelt, K., Oehme, R., Mackenstedt, U., Kimming, P., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 1,145-147.

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.* 57,66-7.

Sonenshine, D.E. ,1993. *Biology of Ticks*. New York: Oxford University Press
Toledo, A., Jado, I., Olmeda, A.S., Casado-Nistal, M.A., Gil, H., Escudero, R., Anda, P., 2009. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9,465-8.

Toledo, A., Olmeda, A.S., Escudero, R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M.A., Rodríguez-Vargas, M., Gil, H., Anda, P. , 2009. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from Central Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 81,67-74.

Host species	Sample	Number	% PCR positive for <i>C. burnetii</i>	% PCR positive for <i>Rickettsia</i> spp
Rabbits	Liver	72	0 %	-
	Spleen	34	5.9 %	-
Small rodents	Liver	40	2.5 %	17.4 %
	Spleen	70	10%	24.2 %
	Blood	47	0 %	19.7 %

Table I. *C. burnetii* and *Rickettsia* spp. DNA in wildlife samples

Source	<i>H. lusitanicum</i>	<i>R. pusillus</i>	<i>R. turanicus</i>	<i>R. sanguineus</i>	Total
Vegetation	1074	87	6	2	1169
Livestock	262	0	64	9	335
Domestic dogs	3	8	66	92	169
Wildlife animals	57	3	2	0	62*
Small rodents	0	0	0	0	0
Lagomorphs	11	0	0	0	6
Hedgehogs	18	2	2	0	21
Birds	28	1	0	0	30
Reptils	0	0	0	0	2*
TOTAL	1396	98	138	103	1735

Table II. Tick collection

Source	Nº of ticks studied	PCR + for <i>C. burnetii</i>	Nº of ticks studied	PCR + for SFG <i>Rickettsia</i> spp
Vegetation	133	0	34	4**** (11.8%)
Livestock	151	17* (11.3%)	26	8***** (30.8%)
Domestic dogs	43	3** (6.9%)	17	6***** (35.3%)
Wildlife animals	50	3*** (6,0%)	23	5***** (21.7%)
TOTAL	377	23 (6,1%)	100	23 (23%)

Table III. *C. burnetii* and *Rickettsia* spp. DNA in ticks

Figure

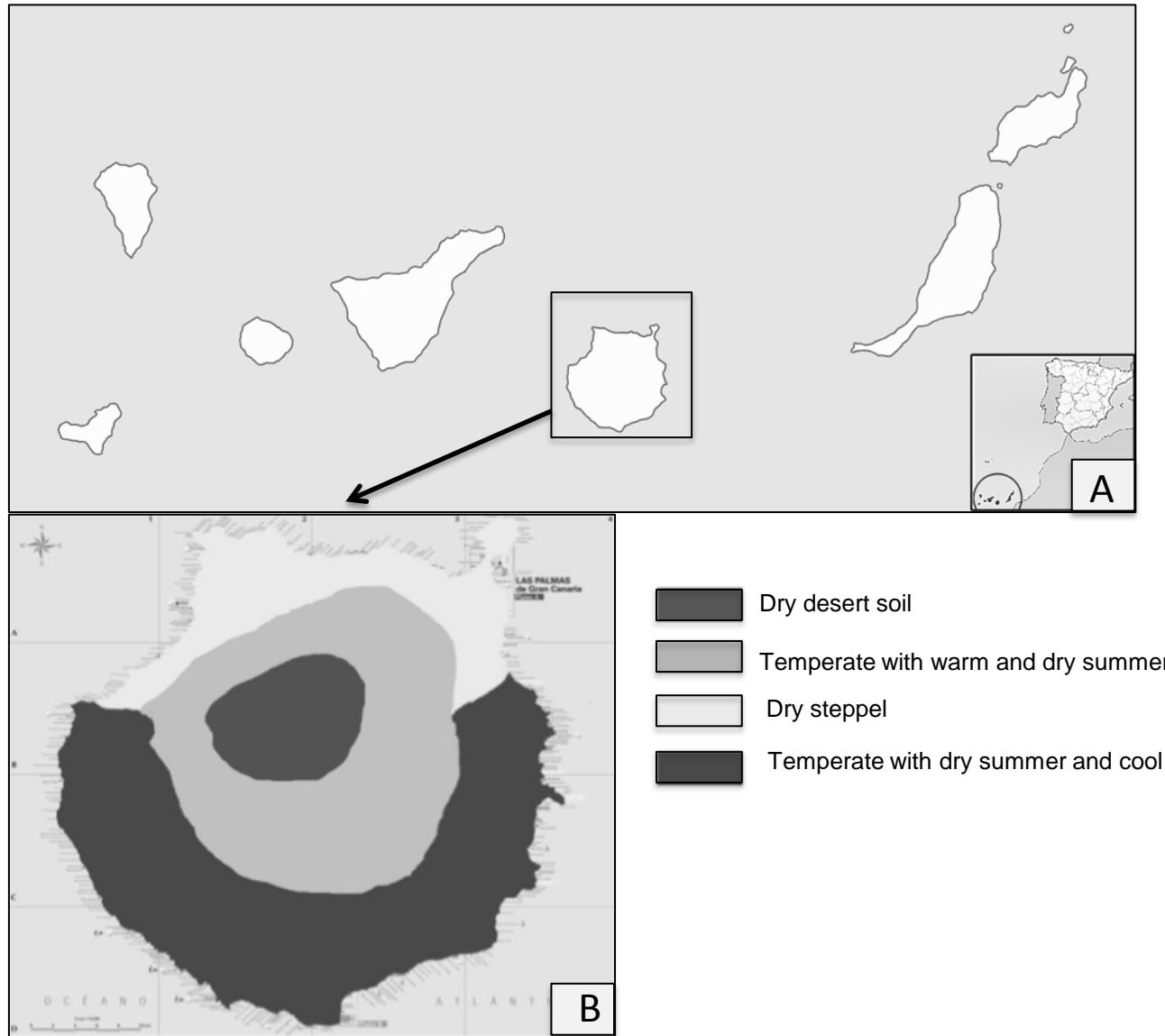


Figure1: (a) Location of Canary Islands (b) Climatic areas in Gran Canaria

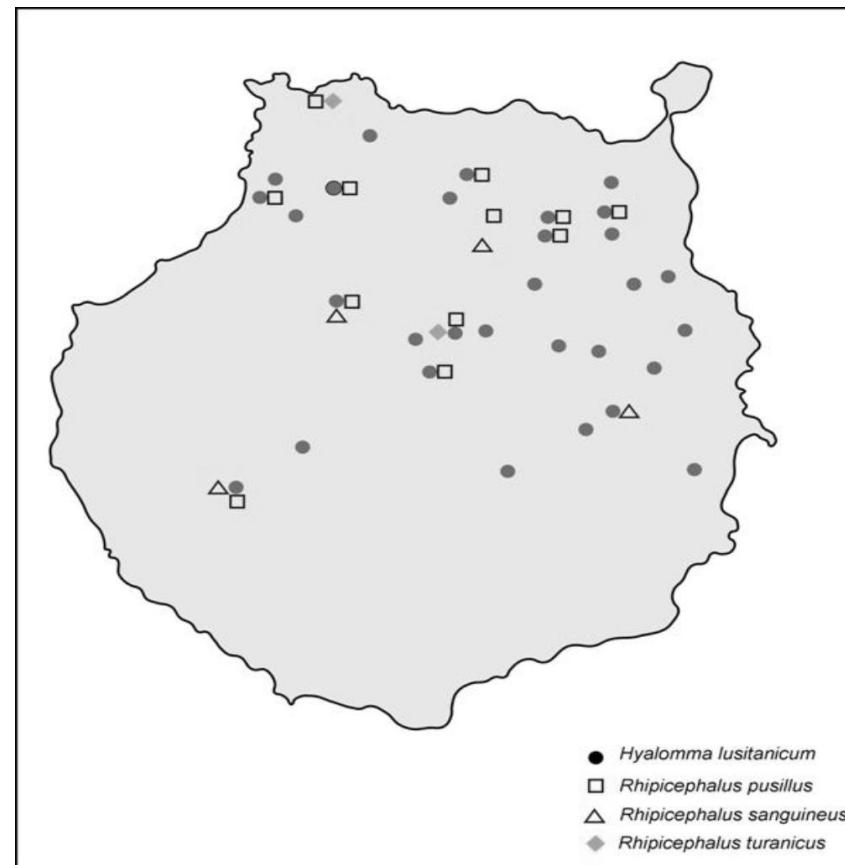


Figure 2: Location of questing ticks

A manuscript number has been assigned: VETMIC-D-15-11287

EE

ees.vetmic.0.353d98.52bc645a@eesmail.elsevier.com en nombre



Responder a todos | ▾

Para: jlperez@dcmq.ulpgc.es; ▾

jue 12/11/2015 13:41

Ms. No. VETMIC-D-15-11287

Detection of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp DNA in wildlife animals and ticks on Gran Canaria island (Spain).

Dear Prof. Perez-Arellano,

Your manuscript has been assigned the following reference number: VETMIC-D-15-11287

You will be able to check the progress of your paper by logging in as Author at <http://ees.elsevier.com/vetmic/>

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content.

Thank you for submitting your manuscript to Veterinary Microbiology.

Kind regards,

Veterinary Microbiology

Elsevier Editorial System(tm) for
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Utilidad del diagnóstico molecular precoz de la fiebre de duración intermedia. Usefulness of early molecular diagnosis of fever of intermediate duration .

Article Type: Original Breve

Keywords: Palabras clave: Fiebre de duración intermedia, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp, PCR

Keywords

Fever of intermediate duration, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp, PCR

Corresponding Author: Prof. Jose Luis Perez-Arellano, Full Professor

Corresponding Author's Institution: Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

First Author: Margarita Bolaños Rivero

Order of Authors: Margarita Bolaños Rivero; Cristina Carranza Rodriguez; Michele Hernandez Cabrera; Elena Pisos Álamo; Nieves Jaén Sánchez; Jose Luis Perez-Arellano, Full Professor

Abstract: La mayor parte de los casos de fiebre de duración intermedia (FDI) en España corresponden a enfermedades infecciosas (principalmente fiebre Q y rickettsiosis). En la práctica clínica, el diagnóstico causal de estas entidades se basa en el inmunodiagnóstico, con una escasa utilidad en fases precoces. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la utilidad de técnicas moleculares en el diagnóstico precoz de fiebre Q y rickettsiosis en pacientes con FDI. Se estudió mediante PCR la presencia de material genético de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia* spp en muestras sanguíneas de 271 pacientes con FDI. La sensibilidad y especificidad de ambas técnicas fueron muy elevadas. Estos datos sugieren que el empleo de técnicas moleculares, con una adecuada selección de la muestra de estudio y el empleo de cebadores adecuados es un elemento útil en la diagnóstico precoz de las principales causas de FDI, principalmente si la serología es negativa o no es concluyente.

Most cases of fever of intermediate duration (FDI) in Spain are related with infectious diseases (mainly Q fever and rickettsial infections). In clinical practice, the causal diagnosis of these entities is based on immunodiagnostic technique posing with a little help in the early stages. Therefore, the aim of this study was to evaluate the usefulness of molecular techniques for the early diagnosis of Q fever and rickettsial diseases in patients with FDI. It was studied by PCR for the presence of genetic material of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp in blood samples of 271 patients with FDI . The sensitivity and specificity of both techniques were very high . These data suggest that the use of molecular techniques , with proper selection of the study sample and using

appropriate primers is a useful element in early diagnosis of the main causes of FDI , especially if serology is negative or inconclusive .

Utilidad del diagnóstico molecular precoz de la fiebre de duración intermedia.

Margarita Bolaños-Rivero^{1a}, Cristina Carranza-Rodríguez^{2,3a}, Michele Hernández-Cabrera^{2,3}, Elena Pisos-Álamo^{2,3}, Nieves Jaén-Sánchez^{2,3}, José-Luis Pérez-Arellano^{2,3}.

1. Servicio de Microbiología y Parasitología. Complejo Hospitalario Universitario Insular – Materno Infantil de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
2. Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Complejo Hospitalario Universitario Insular –Materno Infantil de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
3. Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Las Palmas de Gran Canaria (Spain).
 - a. Ambas autoras contribuyeron de forma similar en este artículo

Autor para correspondencia

Prof. José-Luis Pérez-Arellano. Unidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 35080 Las Palmas de Gran Canaria (Spain). Phone: +34928451455 Fax +34928451413 e-mail: jlperez@dcmq.ulpgc.es

Financiación: Este trabajo ha sido financiado en parte INIA, FAU2006-00002-C04-01.

Conflicto de intereses: No

Confidencialidad: No procede

1 **Resumen**
2
3 La mayor parte de los casos de fiebre de duración intermedia (FDI) en España
4
5 corresponden a enfermedades infecciosas (principalmente fiebre Q y rickettsiosis). En la práctica
6
7 clínica, el diagnóstico causal de estas entidades se basa en el inmunodiagnóstico, con una escasa
8
9 utilidad en fases precoces. Por ello, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la utilidad de
10
11 técnicas moleculares en el diagnóstico precoz de fiebre Q y rickettsiosis en pacientes con FDI. Se
12
13 estudió mediante PCR la presencia de material genético de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia* spp en
14
15 muestras sanguíneas de 271 pacientes con FDI. La sensibilidad y especificidad de ambas técnicas
16
17 fueron muy elevadas. Estos datos sugieren que el empleo de técnicas moleculares, con una
18
19 adecuada selección de la muestra de estudio y el empleo de cebadores adecuados es un elemento
20
21 útil en de diagnóstico precoz de las principales causas de FDI, principalmente si la serología es
22
23 negativa o no es concluyente.

31 **Palabras clave**
32
33 Fiebre de duración intermedia, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp, PCR

1
2 **Abstract**
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Most cases of fever of intermediate duration (FDI) in Spain are related with infectious diseases (mainly Q fever and rickettsial infections). In clinical practice, the causal diagnosis of these entities is based on immunodiagnostic technique posing with a little help in the early stages. Therefore, the aim of this study was to evaluate the usefulness of molecular techniques for the early diagnosis of Q fever and rickettsial diseases in patients with FDI. It was studied by PCR for the presence of genetic material of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp in blood samples of 271 patients with FDI . The sensitivity and specificity of both techniques were very high . These data suggest that the use of molecular techniques , with proper selection of the study sample and using appropriate primers is a useful element in early diagnosis of the main causes of FDI , especially if serology is negative or inconclusive .

31 **Key words**
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fever of intermediate duration, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp, PCR

Introducción

El concepto de fiebre de duración intermedia (FDI) incluye aquella situación clínica en la que se detecta una temperatura axilar superior a 38 °C, sin foco aparente, con una duración superior a 1 semana e inferior a 3 semanas, que aparece en pacientes no inmunodeprimidos, sin ingreso hospitalario previo y en los que tras una evaluación inicial se desconoce su etiología (1). La mayor parte de los casos corresponden a enfermedades infecciosas [principalmente fiebre Q, rickettsiosis, brucelosis, y los agentes causales de mononucleosis infecciosa (2)]. En la práctica clínica, el diagnóstico causal de estas entidades se basa en el inmunodiagnóstico, lo que requiere una media de 15-21 días desde el comienzo de la infección hasta que aparecen anticuerpos. Por ello, las técnicas serológicas son poco útiles en el diagnóstico precoz de estas enfermedades. Sin embargo, la identificación de los agentes causales en las fases iniciales tiene gran interés por varias razones: (i) frecuentemente son enfermedades con una gran afectación del estado general que se benefician del tratamiento etiológico, (ii) en ocasiones, se presentan como cuadros clínicos graves o complicados que requieren hospitalización (3) y (iii) la duración del tratamiento empírico recomendado difiere entre las dos formas principales encontradas (fiebre Q y tifus murino) y (iv) en algunos casos de fiebre Q, a pesar del tratamiento antimicrobiano adecuado persisten las manifestaciones clínicas, lo que indica la necesidad de añadir corticoides (4).

Por ello, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la utilidad de técnicas moleculares (PCR, *polymerase chain reaction*) en el diagnóstico precoz de fiebre Q y rickettsiosis en pacientes con fiebre de duración intermedia.

Pacientes y métodos

La población de estudio estaba constituida por 302 pacientes con criterios de FDI (1), evaluados durante un periodo de 6 años (2004-2009) en las consultas externas de la Unidad de

1 Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical (UEIMT). En todos ellos se recogieron de forma
2 protocolizada los datos epidemiológicos, clínicos y se realizaron pruebas complementarias
3 habituales. Se prestó un especial interés en la determinación del la duración desde el inicio de la
4 clínica y el empleo previo de antimicrobianos. Además se realizaron tres hemocultivos y se
5 obtuvieron tres muestras de sangre, una para estudios serológicos y dos para la obtención de
6 plasma (una con heparina y otra con EDTA) para su estudio posterior.
7
8
9
10
11
12
13

14 El diagnóstico serológico de infección por *Coxiella burnetii* y *R. typhi* se realizó por
15 inmunofluorescencia indirecta (IFI) (*Coxiella burnetii*-Spot IF, BioMérieux, Francia). Los criterios
16 empleados para el diagnóstico de fiebre Q fueron: (i) un título único de IgM $\geq 1/80$ e IgG $\geq 1/320$,
17 (ii) seroconversión (desde títulos iniciales negativos a positivos a las 2-3 semanas) o (iii) un
18 incremento de cuatro veces el título de IgG entre la fase aguda y la fase de convalecencia. Los
19 criterios diagnósticos para el tifus murino fueron (i) una serología inicial con IgM $\geq 1/40$ e IgG \geq
20 1/160, (ii) seroconversión (desde títulos iniciales negativos a positivos a las 2-3 semanas) o (iii) un
21 incremento de cuatro veces el título de IgG entre la fase aguda y la fase de convalecencia. El
22 diagnóstico serológico de infección por *Coxiella burnetii* y *R. typhi* se realizó por
23 inmunofluorescencia indirecta (IFI) (bioMérieux ,Marcy l'Étoile, France). Los criterios empleados
24 para el diagnóstico de tifus murino fueron (i) una serología inicial con IgM $\geq 1/40$ e IgG $\geq 1/160$, (ii)
25 seroconversión (desde títulos iniciales negativos a positivos a las 2-3 semanas) o (iii) un
26 incremento de cuatro veces el título de IgG entre la fase aguda y la fase de convalecencia.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Los pacientes se clasificaron en varios grupos: (i) **Diagnóstico definido de fiebre Q o de**
51 **tifus murino**, que fueron subdivididos atendiendo a si la serología inicial era negativa o positiva;
52 (ii) **Otros diagnósticos definidos** (infección por virus de Epstein Barr y citomegalovirus,
53 empleando los criterios usuales de diagnóstico); (iii) **Diagnóstico “incompleto”**, en los que no
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 pudo establecerse un diagnóstico definido debido a que el paciente no acudió para su seguimiento
2 y (iv) **No diagnóstico**, si tras todos los estudios no se llegó a un diagnóstico definido.
3
4

5 El diagnóstico molecular de infección por *Coxiella burnetii* y de *Rickettsia* spp se realizó
6 mediante técnicas previamente publicadas utilizando, para *Coxiella burnetii*, cebadores que
7 amplifican el segmento de inserción *IS1111* (5) y para *Rickettsia* spp. cebadores de PCR que
8 emplean como diana el espacio intergénico 23S-5S rRNA (6).
9
10
11
12
13
14
15

16 **Resultados**

17

18 Durante el presente estudio se diagnosticaron serológicamente 86 casos de fiebre Q, 66
19 pacientes con tifus murino y 29 pacientes con otros diagnósticos. En 64 pacientes no se pudo
20 llegar al diagnóstico final y 57 presentaron un “diagnóstico incompleto”. Por ello, exactamente la
21 mitad de los pacientes con FDI fueron diagnosticados serológicamente de fiebre Q o tifus murino.
22
23
24
25
26
27
28
29

30 Se estudió mediante PCR la presencia de material genético de *Coxiella burnetii* en 271
31 pacientes con FDI (**Tabla I**). Excluyendo los casos “incompletos”, existía una asociación significativa
32 desde un punto de vista estadístico entre la positividad de la prueba (detección molecular
33 mediante PCR de *Coxiella burnetii*) y el diagnóstico de fiebre Q (Test de Fisher p < 0,05). Las
34 características de la prueba fueron las siguientes: (i) sensibilidad: 92,0% (IC95% = 75,0-97,8% (ii)
35 especificidad: 96,9% (IC95% = 93,4-98,6%), (iii) valor predictivo positivo: 79,3% (IC95% = 61,6-
36 90,2%) y (iv) valor predictivo negativo: 98,9% (IC95% = 96,2-99,7%).
37
38

39 Con el objetivo de identificar la utilidad de la detección molecular mediante PCR de *Coxiella*
40 *burnetii* en pacientes con fiebre Q, reevaluamos los resultados atendiendo a los resultados de la
41 serología. Los datos se expresan en la **tabla IIa**. Empleando el test de Fisher se observó que existía
42 una asociación significativa (p < 0,001) entre la presencia de una serología inicial positiva y una
43 PCR de *Coxiella burnetii* negativa.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Este hecho se relaciona con el tiempo de evolución de la enfermedad , que era menor significativamente menor en los pacientes con PCR positiva [7 días (5-12)] con respecto a los que la PCR era negativa [14 días (4-90)] . Por otro lado, un 56% de los pacientes con fiebre Q en los que la PCR de *C. burnetii* fue negativa habían recibido algún tratamiento antimicrobiano (doxiciclina en dos casos, quinolonas, en seis casos y betalactámicos en 27 casos).

Se estudió mediante PCR la presencia de material genético de *Rickettsia* spp en 142 pacientes con FDI (**Tabla I**). Excluyendo los casos “incompletos”, existía una asociación significativa desde un punto de vista estadístico entre la positividad de la prueba (detección molecular mediante PCR de *Rickettsia* spp.) y el diagnóstico de tifus murino (Test de Fisher p < 0,0001). Las características de la prueba fueron las siguientes: (i) sensibilidad: 85,3% (IC95%= 69,9-93,6%); (ii) especificidad: 78,1% (IC95% = 67,3-86,0%), (iii) valor predictivo positivo: 64,4% (IC95% = 49,8-76,8%) y (iv) valor predictivo negativo: 91,9% (IC95% = 82,5-96,5%).

Con el objetivo de identificar la utilidad de la detección molecular mediante PCR de *Rickettsia* spp en pacientes con tifus murino, reevaluamos los resultados atendiendo a los resultados de la serología. Los datos se expresan en la **tabla IIb**. No existía asociación entre la presencia de serología negativa frente a *R. typhi* y una PCR positiva de *Rickettsia* spp (test de χ^2 , p = 0,80).

Discusión

Existen escasos estudios en humanos acerca de la utilidad de la PCR de *Coxiella burnetii* en muestras sanguíneas para el diagnóstico de la fiebre Q (**7,8,9,10**). Nuestro estudio presenta similitudes, pero también algunas diferencias con ellos. Así, como hemos comprobado, la rentabilidad de la PCR es mayor cuando se realiza en fases precoces de la enfermedad (**7, 8**). Los

1 resultados también son diferentes cuando se emplean cebadores que amplifican secuencias
2 diferentes (p. ej. *htp AB* o *ompA*) , técnicas diferentes (PCR clásica, *nested* PCR o PCR a tiempo
3 real) (7,8,9,10) o diferentes cantidades de la muestra. Por otro lado, nuestros resultados son
4 similares a los de otros autores al obtener una mayor rentabilidad diagnóstica cuando se emplean
5 muestras de plasma frente a muestras de suero (9). De cualquier forma, en nuestro trabajo se
6 observa que esta técnica presenta una elevada sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la
7 fiebre Q aguda en las fases precoces de la enfermedad. La negatividad de la prueba en fases
8 precoces puede relacionarse con el elevado empleo de antimicrobianos (incluidos los beta-
9 lactámicos) lo que refuerza la actitud de evitar su empleo en casos de FDI. Por otro lado la
10 presencia de material genético de *C. burnetti* en pacientes en los que la serología es positiva
11 puede sugerir la posibilidad de desarrollo de una forma crónica (7,8).

12
13 El empleo de la PCR para el diagnóstico precoz de infecciones por *Rickettsia* empleando
14 muestras sanguíneas es aún menor que para la fiebre Q y estos trabajos el número de pacientes
15 estudiados es muy escaso (11,12,13). En general, los datos de la literatura demuestran una baja
16 sensibilidad, aunque también se observan diferencias atendiendo al momento evolutivo de la
17 enfermedad. En nuestro trabajo, el empleo de cebadores genéricos permite detectar no solo *R*
18 *typhi* sino otras rickettsias presentes en nuestro medio (p. ej *R felis* o *R massiliae*) (14,15) por lo
19 que no sorprende la detección de casos positivos mediante PCR en pacientes con serología
20 negativa frente a *R. typhi*.

21
22 En resumen, nuestros datos sugieren que el empleo de técnicas moleculares, con una
23 adecuada selección de la muestra de estudio y el empleo de cebadores adecuados es un elemento
24 útil en de diagnóstico precoz de las principales causas de FDI, principalmente si la serología es
25

negativa o no es concluyente. El empleo de otras técnicas moleculares como LAMP, que no
1
2 necesita del uso de termociclador y se realiza en 60 minutos, podría aportar ventajas adicionales.
3
4
5

6 Bibliografia

- 7 1. Rivero A, Zambrana JL, Pachón J. Fiebre de duración intermedia. Enf Infect Microbiol Clin
8 2003; 21: 145 - 50.
- 9 2. Espinosa N, Cañas E, Bernabeu-Wittel M, Martín A, Viciiana P, Pachón J. Cambios en el
10 espectro etiológico de la fiebre de duración intermedia. Enf Infect Microbiol Clin
11 2010;28:416-420
- 12 3. Hernández Cabrera M, Ángel-Moreno A, Santana E, Bolaños M, Francès A, Martín-Sánchez
13 MS, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands, Spain. Emerg Infect Dis.
14 2004;10:740-3.
- 15 4. Garcia-Alfranca F, Clemente-Rodríguez C, Pigrau-Serrallach C, Fonollosa-Pla V, Vilardell-
16 Tarres M. Q fever associated with persistent fever: an immunologic disorder?. Clin Infect
17 Dis. 1994;18:122-3.
- 18 5. Berri M, Laroucau K, Rodolakis A. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital
19 swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction.
20 Vet. Microbiol. 2000. 72, 285–293.
- 21 6. Jado I, Escudero R, Gil H, Jiménez-Alonso MI, Sousa R, García-Pérez AL et al. Molecular
22 method for identification of *Rickettsia species* in clinical and environmental samples. J Clin
23 Microbiol 2006; 44, 4572-6.
- 24 7. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute
25 Q fever. J Clin Microbiol. 2003;41:5094-8.
- 26 8. Ughetto E, Gouriet F, Raoult D, Rolain JM. Three years experience of real-time PCR for the
27 diagnosis of Q fever. Clin Microbiol Infect. 2009;15 Suppl 2:200-1.
- 28 9. Schneeberger PM, Hermans MH, van Hannen EJ, Schellekens JJ, Leenders AC, Wever PC.
29 Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever.
30 Clin Vaccine Immunol. 2010;17:286-90.
- 31 10. Jaton K, Peter O, Raoult D, Tissot JD, Greub G. Development of a high throughput PCR to
32 detect *Coxiella burnetii* and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period.
33 New Microbes New Infect. 2013;1:6-12.

- 1 11. Giulieri S, Jaton K, Cometta A, Trellu LT, Greub G. Development of a duplex real-time PCR
2 for the detection of *Rickettsia* spp. and typhus group rickettsia in clinical samples. FEMS
3 Immunol Med Microbiol. 2012;64:92-7.
- 4 12. Renvoisé A, Rolain JM, Socolovschi C, Raoult D. Widespread use of real-time PCR for
5 rickettsial diagnosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012;64:126-9.
- 6 13. Znazen A, Sellami H, Elleuch E, Hattab Z, Ben Sassi L, Khrouf F, et al. Comparison of two
7 quantitative real time PCR assays for *Rickettsia* detection in patients from Tunisia. PLoS
8 Negl Trop Dis. 2015;9:e0003487
- 9 14. Pérez-Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A, Bolaños M, Hernández M, Santana E, et al.
10 Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. Emerg Infect Dis. 2005;11:1961-4.
- 11 15. Fernández de Mera IG, Zivkovic Z, Bolaños M, Carranza C, Pérez-Arellano JL, Gutiérrez C, et
12 al. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. Emerg Infect Dis. 2009;15:1869-70.
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27

TABLAS

Tabla I: Resultados de ambas PCR en los grupos de estudio

* PCR Cox : PCR para *Coxiella burnetii*; **PCR Rck: PCR para *Rickettsia* ***CMV: Citomegalovirus VEB: ****Virus de Epstein Barr

Tabla II: Relación entre los datos serológicos y los resultados de la PCR

Tabla IIa. * PCR Cox : PCR para *Coxiella burnetii* ** En 2 pacientes con resultado de PCR Cox + no se pudo realizar la serología inicial frente a *Coxiella burnetii* *

Tabla IIb. * PCR Rck: PCR para *Rickettsia*

Tablas (Tables)

Grupo Diagnóstico	PCR Cox +*	PCR Cox -	PCR Cox Total	PCR Rck +*	PCR Rck -	PCR Rck Total
Fiebre Q	23	63	86	0	15	15
Tifus murino	1	34	35	29	16	45
Infección por CMV***	0	16	16	1	4	5
Infección por VEB****	0	13	13	1	6	7
Diagnóstico "incompleto"	2	55	57	1	34	35
No diagnóstico	2	62	64	3	32	35
Total	28	243	271	35	107	142

Tabla I: Resultados de ambas PCR en los grupos de estudio

* PCR Cox : PCR para *Coxiella burnetii*; **PCR Rck: PCR para *Rickettsia* ***CMV: Citomegalovirus VEB: ****Virus de Epstein Barr

Tablas (Tables)

	Serología inicial negativa	Serología inicial positiva	Total
PCR Cox* +	20	1	21
PCR Cox -	20	43	63
Total	40	44	84**

Tabla IIa. * PCR Cox : PCR para *Coxiella burnetii* ** En 2 pacientes con resultado de PCR Cox + no se pudo realizar la serología inicial frente a *Coxiella burnetii* *

	Serología inicial negativa	Serología inicial positiva	Total
PCR Rck* +	12	17	29
PCR Rck -	6	10	16
Total	18	27	45

Tabla IIb. * PCR Rck: PCR para *Rickettsia*

Tabla II: Relación entre los datos serológicos y los resultados de la PCR

EIMC-D-15-00438: Su número de referencia / Your Reference Number

EE ees.eimc.0.355dad.38254f77@eesmail.elsevier.com en nombre de

Para: jlperez@dcmq.ulpgc.es;

mié 18/11/2015 6:35

Responder a todos |

Estimado/a Prof. Perez-Arellano,

Le confirmamos que su artículo "Utilidad del diagnóstico molecular precoz de la fiebre de duración intermedia. Usefulness of early molecular diagnosis of fever of intermediate duration ." ha iniciado el proceso de revisión de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica con el número EIMC-D-15-00438.

Para consultar el estado de su artículo debe seguir los siguientes pasos:

1. Acceda a la página <http://ees.elsevier.com/eimc/>.

2. Introduzca sus datos de registro:

Usuario: jlperez@dcmq.ulpgc.es

Si no sabe o no recuerda su password, entre en:

http://ees.elsevier.com/EIMC/automail_query.asp.

3. Acceda como autor al sistema (esto le llevará a su menú principal).

4. Entre en "Submissions Being Processed"

Muchas gracias por el interés mostrado hacia nuestra Revista.

Reciba un cordial saludo,

Azucena Saavedra
Journal Manager

OE 5. Tifus murino con afectación renal en Gran Canaria.

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes adultos diagnosticados de tifus murino durante un periodo de 20 meses.

El diagnóstico se realizó ante un cuadro clínico compatible, coincidiendo con la detección de un título de anticuerpos fase II de clase IgM frente a *Rickettsia typhi* $\geq 1/40$ o un aumento de cuatro veces el título de IgG entre el suero de fase aguda y suero de fase de convalecencia o la existencia de seroconversión.

Se incluyeron 22 pacientes con una edad media de 28 años (rango de 14-76), de los que 21 eran hombres. Todos los pacientes procedían de la zona sureste de la isla de Gran Canaria. La enfermedad se diagnosticó más frecuentemente en los meses de verano. Todos los pacientes relataban contacto con animales.

Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron fiebre (media de 39,3°C), con una duración media de 10 días (rango de 7 a 20). La cefalea estaba presente en el 90% de los pacientes y el rash en el 68,2 %, con distribución centrípeta y maculopapular. Un tercio presentaba tos seca y el resto de los datos clínicos eran menos frecuentes.

En los datos analíticos destacan la elevación de las transaminasas (AST y ALT), elevación de la VSG, y trombopenia. Lo mas característico de nuestra serie fue que tres pacientes presentaron una insuficiencia renal aguda y el 87% de ellos tenían alteraciones en el análisis de orina, principalmente microhematuria (87%).

Las complicaciones graves fueron un síndrome renopulmonar, una encefalitis y una meningitis con insuficiencia renal.

El tratamiento de elección fue la doxiciclina. En ocho casos no fue preciso tratamiento por recuperación espontánea, y al resto se les pautó doxiciclina a dosis de 100 mg dos veces al día, y la fiebre desapareció en un intervalo de 1-6 días (media de dos días).

Murine Typhus with Renal Involvement in Canary Islands, Spain

Michele Hernández-Cabrera,^{1*}†
 Alfonso Angel-Moreno,^{1,*†} Evora Santana,^{1*}
 Margarita Bolaños,^{1*} Adela Francès,^{1*}
 Antonio-Manuel Martín-Sánchez,^{1,*†}
 and Jose Luis Pérez-Arellano^{1*}†

Murine typhus and “murine-typhus-like” disease are reemerging infectious diseases. In Canary Islands (Spain), a rather distinct clinical pattern characterized by higher incidence of complications, especially renal damage (including acute failure and urinalysis abnormalities), is apparent and highly suggestive. It could be related to different strains of *Rickettsia typhi* or other cross-reactive species.

The Study

Murine or endemic typhus is caused by *Rickettsia typhi*, formerly *R. mooseri* (1). Classic murine typhus is a zoonosis maintained in rats (*Rattus rattus* and *Rattus norvergicus*) and transmitted to humans through damaged skin by infected feces from the oriental rat flea (*Xenopsylla cheopis*) (2). New patterns of disease (“murine typhus-like” disease) have been described in recent years, and a new species of *Rickettsia* (*R. felis*) that causes a similar clinical picture has been identified (1–3). New modes of infection have been identified, including infection through inhalation of flea feces and transmission by different types of fleas (*Ctenophthalmis felis*) and from different reservoirs (e.g., dog, cat, and opossum).

Murine typhus occurs worldwide, particularly in warm and humid climates (1). In Spain, two seroepidemiologic surveys, in Salamanca and Madrid (Central/Western Spain), yielded seroprevalence rates of 12.8% and 68%, respectively, in the general population (4,5). However, no clinical cases have been reported. In Seville (Southwestern Spain), murine typhus is an important cause of fever of intermediate duration (6), and in Canary Islands, 10 autochthonous cases have been reported from Tenerife (7). For this reason, we include serologic testing for *R. typhi* in

the evaluation of patients with fever of intermediate duration. We describe the clinical picture of murine typhus in the Canary Islands.

Adult (≥ 14 years of age) inpatients and outpatients at the Hospital Universitario Insular of Las Palmas with a serologic diagnosis of murine typhus during December 1, 2000, through July 30, 2002, were included in our study. A case was defined by an immunoglobulin (Ig) M titer $\geq 1: 40$, or a fourfold or higher increase in IgG titers against *R. typhi* by direct immunofluorescence test in 8 weeks (bioMérieux, France), or both.

Epidemiologic, clinical, and laboratory data were collected. Antibodies against other agents that may cause a fever of intermediate duration (e.g., *Coxiella burnetii*, *R. conorii*, *Leptospira* sp., Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus) were systematically tested. Twenty-two patients (21 men, 1 woman), with a mean age of 28 years (range 14 to 76 years), were included. Murine typhus was more frequent in summer (Figure 1). No case aggregation was observed. The geographic distribution is shown in Figure 2. All patients reported contact with animals (13 with dogs, 6 with horses, 5 with goats, 2 with cats, and 1 with camels).

The main symptoms and signs recorded are shown in Table 1. All patients had a high fever (mean 39.3°C) during a mean of 10 days (range 7 to 20 days). A light maculopapular, nonpurpuric rash, with rather centripetal distribution, was a frequent finding (68.2%). Up to one third of the patients had a dry cough. Hepatomegaly and, less frequently, splenomegaly were detected. Skin lesions suggestive of insect bites were found in 13.6% of the patients.

Four patients had a mild normocytic anemia. For most patients, leukocyte counts were normal, mild leukopenia was detected in two patients, and mild leukocytosis in four

Total no.

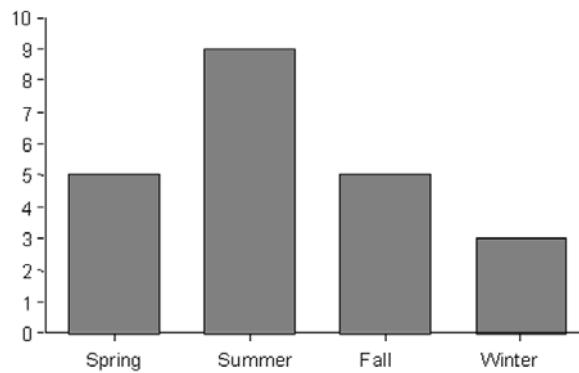


Figure 1. Distribution of cases of murine typhus by season.

*Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Canary Islands, Spain; and †Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Canary Islands, Spain

¹Drs. Hernández-Cabrera and Angel-Moreno contributed equally to the article.

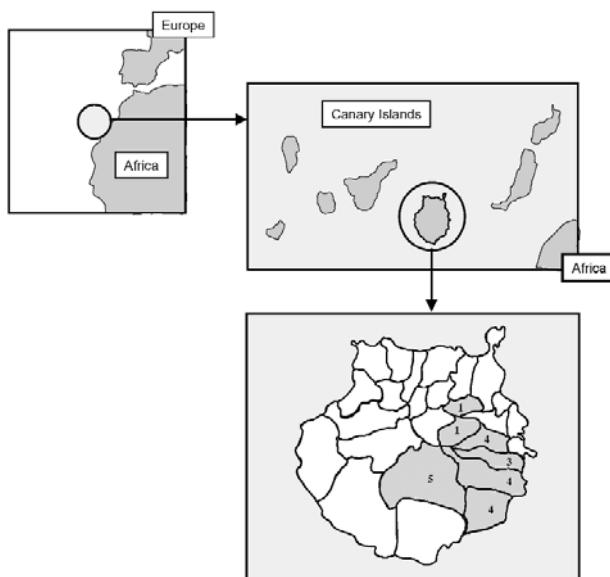


Figure 2. Distribution of cases of murine typhus by geographic area.

patients. Ten case-patients (45%) had thrombocytopenia. In most patients (89.5%), the erythrocyte sedimentation rate was high (11–83 mm/h), and the activated partial thromboplastin time (aPTT) was prolonged in six patients.

Aminotransferase elevation, usually four times above normal, was found frequently; two patients had normal values. Four patients had alanine aminotransferase values 10 times the normal value. Plasma bilirubin was normal for all patients.

In 36% of the patients, the plasma blood urea nitrogen was elevated; plasma creatinine was above normal in three cases (13%). In 19 cases (87%), alterations were found in the urinalysis. Fifteen patients had proteinuria and microhematuria with or without leukocyturia and granular casts,

with a negative nitrite reaction. In two patients, isolated proteinuria occurred, and isolated microhematuria occurred in two other patients. All of these findings resolved quickly.

Eight patients fulfilled both diagnostic criteria (IgM $\geq 1:40$ plus seroconversion), eight patients had initial IgM elevation, and six seroconverted without IgM increase. Cross-reactivity between *R. typhi* and other microorganisms was not observed. Fifty percent of the patients had serologic evidence of past infection with *C. burnetii* (12/22) or *R. conorii* (3/22) and, in one case, of co-infection with *C. burnetii*.

Eight cases were not treated because of spontaneous recovery. The remaining patients received doxycycline (100 mg twice a day). Fever disappeared from 1 to 6 days (median 2 days).

Three patients had severe signs and symptoms. Patient 6 was admitted with acute respiratory failure, lung infiltrates, and acute renal failure (plasma creatinine 2.8% mg), microhematuria, and leukocyturia. Intravenous fluids, doxycycline, ciprofloxacin, and methylprednisolone (1 g) were administered, and the patient rapidly improved. Autoantibodies and cryoglobulins were negative. Patient 16 had a dry cough and acute renal failure (plasma creatinine 2.7% mg) and later became disoriented. A cranial contrast computed tomography scan was normal, and cerebrospinal fluid (CSF) showed mononuclear pleocytosis (90 cells/ μ L), protein 70 mg/dL, and normal glucose. Doxycycline was administered with rapid neurologic improvement. Conjunctivitis and rash appeared but waned shortly after. Finally, patient 21 had a progressive meningeal syndrome, CSF showed mononuclear pleocytosis (19 cells/ μ L), increased protein (49 mg/dL), and normal glucose levels. The patient completely recovered in 48 hours after receiving doxycycline.

Table 1. Clinical findings^a

Clinical findings	Researcher and location of study						
	Dumler, TX 1991	Silpapojakul, Thailand 1992	Bernabeu, Seville 1999	Fergie, TX 2000	Whiteford, TX 2001	Gikas, Crete 2002	Canary Islands 2003
n	80	137	104	30	97	83	22
Fever	98	100	100	100	100	100	100
Headache	75	41	71	77	76	88	90
Rash	54	20	62	80	63	80	-
Arthromyalgia	46	44	77	57	40	45	45
Hepatomegaly	-	24	29	-	-	22	38
Cough	35	-	25	40	15	28	28
Diarrhea	26	5	5	40	33	11	18
Splenomegaly	-	5	24	-	-	23	14
Bite	39	0	3	3,3	34	-	13
Nausea/vomiting	48	3	23	43	45	18	13
Abdominal pain	23	10	-	60	27	11	13
Confusion	8	2	4	7	8	10	13

^aData are expressed as a percentage; TX, Texas.

Table 2. Comparative laboratory findings in patients with murine typhus

Laboratory test results	Researcher and location of study						Canary Islands
	Dumler, TX	Silpapojakul, Thailand	Bernabeu, Seville	Fergie, TX	Whiteford, TX	Gikas, Crete	
Anemia	75	-	1	57	69	25	18
Leukopenia	28	4	18	40	37	7	9
Leukocytosis	29	-	20	3	1	0	18
Neutrophilia	-	-	-	63	77	-	36
Thrombocytopenia	48	3	19	60	43	51	45
ESR elevated	-	-	59	75	81	-	89
Increased ratio prothrombin time	30	-	-	-	-	-	23
Increased ratio aPTT	-	-	-	-	-	-	27
Plasma BUN increased	27	-	-	0	3	-	36
Plasma creatinine increased	21	-	-	0	0	-	14
Hyponatremia	60	-	-	66	58	37	18
Plasma creatine kinase increased	21	-	-	-	-	42	10
Plasma LDH increased	87	-	-	-	100	82	81
Plasma AST increased	90	-	67	67	82	86	77
Plasma ALT increased	73	-	67	67	38	64	99
Plasma alkaline phosphatase increased	60	-	25	-	-	15	30
Plasma GGT increased	-	-	-	-	-	-	57.2
Hypoalbuminemia	89	-	-	46	87	82	54.5
Hypergammaglobulinemia	-	-	-	-	-	-	75.0

^aData are expressed as a percentage. TX, Texas; ESR, erythrocyte sedimentation rate; aPTT, activated partial thromboplastin time; BUN, blood urea nitrogen; LDH, lactate dehydrogenase; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamic transferase.

Fever of intermediate duration has been defined by others in Spain as fever of 7 to 28 days without localizing signs (i.e., respiratory, digestive, urinary, or neurologic), plus the absence of diagnostic clues after a complete evaluation (6). A few diseases can account for most cases of this type of fever (mainly Q fever, brucellosis, boutonneuse fever, leptospirosis, mononucleosic syndromes, and murine typhus). In our area, autochthonous cases of boutonneuse fever or brucellosis have never been reported. Diagnosis is usually based on serology, which requires time for confirmation. Therefore, in the meantime, identifying clinical data for empirical treatment is important.

In our study, the number of cases per year is 12, higher than that in other areas of Spain (6), Israel (8), or the United States (9,10), with higher rate in summer. Most patients were male. All patients had direct contact with animals as reported by others (9,10); dogs were the most frequently cited animal (9,10).

The clinical features in our study are similar to those reported by others (6,9–13) with respect to those most frequent symptoms (fever, headache, and arthromyalgia) (Table 1). The incidence of rash is similar to that reported by Bernabeu (6) and Whiteford (9) and higher than that in other series. Reports of insect bites were more frequent in our study than studies from other areas (Bernabeu [6] and Silpapojakul [11]), but more insect bites were reported from a Texas study (9).

The laboratory findings in our study are similar to findings in other studies, although its relative frequency is

variable (Table 2). The frequency of anemia varies from 1% to 69%, leukopenia from 4% to 40%, and thrombocytopenia from 3% to 60% (6,9,10,11). While 80% of the patients with Q fever in our area have a prolonged aPTT, 27% of the patients with murine typhus displayed this abnormal coagulation test. An elevation of aminotransferases in the range of viral hepatitis was common, but hyperbilirubinemia is exceptional and usually associated with alcoholism, co-infection, or glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency.

Nephrologic alterations had a high frequency in our study. Three patients had acute renal failure, and 87% had some abnormality in the urinalysis, mainly microhematuria. These data are in sharp contrast with the low incidence of urinary alterations found in other studies. Some broad studies (6,9,10) do not report urinary abnormalities in murine typhus, though Dumler et al. (13) reported microhematuria or proteinuria in 28% of their patients. In a study specifically focused on renal involvement in murine typhus, Shaked et al. observed urinary abnormalities in 5 of 27 patients studied (8). To the best of our knowledge, 11 cases of acute renal failure have been related to *R. typhi* (9,11,14,15).

In general, murine typhus is a mild disease. However, a number of miscellaneous complications have been described. Our severe cases accounted for 13% (one renopulmonary syndrome, one encephalitis, and one meningitis with renal failure).

Conclusions

In summary, in the Canary Islands, incidence of murine typhus seem to be higher, patients more frequently report contact with dogs, the frequency of complicated cases is higher, and the incidence of renal involvement is higher. These data define a clinical picture of murine typhus that is somewhat different for the Canary Islands. These differences could be attributed to age (infantile versus adult series), mode of transmission or infection, or different strains of *R. typhi*. The diagnostic methodology was indirect, so cross-reaction with other rickettsiae cannot be excluded (11). Moreover, in our area, dogs are frequently parasitized by the flea of cats, a well-known vector for *R. felis* (3). More studies with direct diagnostic methods are needed to better define these differences. Finally, detecting urinary abnormalities in the setting of fever of intermediate duration, especially if associated with skin rash, thrombocytopenia, or hypertransaminasemia, in our geographic area is strongly suggestive of murine typhus.

Dr. Hernández-Cabrera was an associate professor of infectious diseases and tropical medicine at Faculty of Medicine at University of Las Palmas de Gran Canaria, Spain. His research interests focus on rickettsial diseases and other causes of fever of intermediate duration.

References

- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:694–719.
- Azad AF. Epidemiology of murine typhus. *Annu Rev Entomol* 1990;35:553–69.
- Márquez FJ, Muniain MA, Pérez JM, Pachón J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. *Emerg Infect Dis* 2002;8:89–91.
- Ruiz Beltrán R, Herrero-Herrero JI, Martín-Sánchez AM, Martín-González JA. Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia typhi* in Salamanca Province (Spain). Serosurvey in the human population. *Eur J Epidemiol* 1990;6:293–9.
- Lledo L, Gegundez MI, Saz JV, Beltran M. Prevalence of antibodies to *Rickettsia typhi* in an area of the center of Spain. *Eur J Epidemiol* 2001;17:927–8.
- Bernabeu-Wittel M, Pachon J, Alarcón A, López-Cortés LF, Viciana P, Jiménez-Mejías ME, et al. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration. A 17-year study in the south of Spain. *Arch Intern Med* 1999;159:872–6.
- Padilla ML, Martínez A, Abella L, Marañés I, Míguez M, Laynez P, et al. In: Abstracts of the VII Congreso de la Sociedad Canaria de Medicina Interna Adeje (Spain) 22–24 June 2000; Abstract 12.
- Shaked Y, Shpilberg O, Samra Y. Involvement of the kidneys in Mediterranean spotted fever and murine typhus. *Q J Med* 1994;87:103–7.
- Whiteford SF, Taylor JP, Dumler JS. Clinical, laboratory, and epidemiologic features of murine typhus in 97 Texas children. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;155:396–400.
- Fergie JE, Purcell K, Wanat D. Murine typhus in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:535–8.
- Silpapojakul K, Chayakul P, Krisanapan S. Murine typhus in Thailand: clinical features, diagnosis and treatment. *QJM* 1993;86:43–7.
- Gikas A, Doukakis S, Pediaditis J, Kastanakis S, Psaroulaki A, Tselentis Y. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical and therapeutic data from 83 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96:250–3.
- Dumler JS, Taylor JP, Walker DH. Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987. *JAMA* 1991;266:1365–70.
- Rosenthal T, Michaeli D. Murine typhus and spotted fever in Israel in the seventies. *Infection* 1977;5:82–4.
- Whelton A, Douglas JV, Elisberg BI. Acute renal failure complicating rickettsial infection in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. *Ann Intern Med* 1968;69:323–8.

Address for correspondence: José Luis Pérez-Arellano, Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35080, Canary Islands, Spain; fax: 928451413; email: jlper@dcn.ulpgc.es

EMERGING INFECTIOUS DISEASES *online*

www.cdc.gov/eid

To receive tables of contents of new issues send an email to listserve@cdc.gov with **subscribe eid-toc** in the body of your message.

Fiebre Q en Gran Canaria. Aportación de 40 nuevos casos

Margarita Bolaños^a, Otilia-Evora Santana^a, José Luis Pérez-Arellano^b, Alfonso Ángel-Moreno^b, Gustavo Moreno^c, Juan Luis Burgazzoli^c y Antonio Manuel Martín-Sánchez^a

^aServicio de Microbiología. ^bUnidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical.

^cUnidad Docente de Medicina Familiar y Comunitaria. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. España.

INTRODUCCIÓN. Describir las características clínicas y epidemiológicas de la fiebre Q en la zona sur de la isla de Gran Canaria.

MÉTODOS. Se realizó un análisis retrospectivo de los casos diagnosticados de fiebre Q en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria entre los años 1998 y 2000. Para la detección de anticuerpos frente a antígenos de fase II de *Coxiella burnetii* se empleó una técnica de inmunofluorescencia indirecta.

El diagnóstico de fiebre Q aguda se realizó cuando se detectaron títulos de inmunoglobulina G (IgG) $\geq 1:320$ e IgM $\geq 1:80$ o cuando se demostró seroconversión.

RESULTADOS. Durante el período de estudio se diagnosticaron serológicamente 59 casos de fiebre Q aguda (incidencia anual de 5 casos/100.000 habitantes). La seroprevalencia (IgG $\geq 1:80$) encontrada en los pacientes a los que se les solicitaba serología de fiebre Q y durante este período fue del 23,9%. Se dispuso de datos clínicos y epidemiológicos en 40 pacientes, siendo todos los casos esporádicos; el 57% de ellos fueron hospitalizados. La edad media fue de $40,6 \pm 13,3$ años (intervalo, 20-74), más frecuente en varones (85%) y procedentes del medio rural (67,5%). El 65% de los casos se produjeron de abril a julio. La manifestación clínica más frecuente fue un síndrome febril con elevación de las enzimas hepáticas (87,5%). La forma neumónica fue rara (sólo 3 casos).

CONCLUSIONES. La fiebre Q se manifiesta fundamentalmente en nuestra zona como un síndrome febril agudo con afectación hepática subclínica. Esto, y la escasez de formas neumónicas y crónicas sugieren la implicación de cepas de *C. burnetii* diferentes a las de otras zonas geográficas.

Palabras clave: *Coxiella burnetii*. Fiebre Q. Gran Canaria. Hepatitis. Neumonía. TTPa.

Q fever in Gran Canaria: 40 new cases

INTRODUCTION. The aim of this study was to describe the clinical and epidemiologic features of Q fever in the southern area of the island of Gran Canaria (Spain).

METHODS. We conducted a retrospective analysis of the clinical and epidemiological data of the cases of Q fever diagnosed by the Microbiology Laboratory of the Hospital Universitario Insular in Gran Canaria between 1998 and 2000. Antibodies against phase II *Coxiella burnetii* antigens were detected using an indirect immunofluorescence test. The diagnosis of acute Q fever was established by IgG titers $\geq 1:320$ and IgM titers $\geq 1:80$, or by seroconversion.

RESULTS. During the period of study 59 cases of acute Q fever were diagnosed, making an incidence of 5 cases/100,000 inhabitants/year. The seroprevalence (IgG $\geq 1:80$) in the patients for whom Q fever serology was requested during that period was 23.9%. Clinical and epidemiologic data were available for 40 patients. All were sporadic cases and 57% were hospitalized. The mean age of the patients was 40.6 ± 13.3 years (range 20-74 years), 85% were males and 67.5% came from a rural background. The majority of cases (65%) clustered from April to July. The most frequent clinical presentation was an acute febrile process with elevated liver enzymes (87.5%). Pneumonia was infrequent (only three cases).

CONCLUSIONS. In our area Q fever is mainly manifested as an acute febrile illness with subclinical hepatic involvement. This fact and the small number of cases with pneumonia and chronic forms suggest the etiological involvement of *C. burnetii* strains different from those in other geographic areas.

Key words: *Coxiella burnetii*. Q fever. Gran Canaria. Hepatitis. Pneumonia. aPTT.

Introducción

La fiebre Q es una zoonosis de distribución mundial causada por *Coxiella burnetii*. La infección se caracteriza por el polimorfismo de su espectro clínico, que abarca desde la infección subclínica, en más de la mitad de los casos¹, hasta cuadros graves, incluso mortales. Las formas clínicas más frecuentes en la fiebre Q de presentación aguda son el síndrome febril aislado, la neumonía y la hepatitis. Otros síndromes como meningitis, meningoencefalitis, miocarditis o pericarditis son excepcionales. La fiebre Q crónica puede adoptar a su vez diversas formas clínicas, fundamentalmente endocarditis, hepatitis granulomatosa o enfermedad pulmonar intersticial difusa, siendo la endocarditis la forma más frecuente y grave².

La fiebre Q fue descrita por primera vez en las Islas Canarias a principios de los años setenta por autores finlandeses

Correspondencia: Dr. A.M. Martín-Sánchez.
Dr. Pasteur, s/n. 35016 Las Palmas de Gran Canaria. España.
Correo electrónico: amartin@dcc.ulpgc.es

Manuscrito recibido el 06-02-2002; aceptado el 08-07-2002.

al diagnosticar la infección en turistas que habían estado de vacaciones en el archipiélago³. A comienzos de los años ochenta, el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias de Majadahonda (Madrid) registró la existencia de sueros con títulos significativos de anticuerpos frente a *C. burnetii* procedentes de Tenerife⁴. El primer caso autóctono de Lanzarote⁵ se comunica en 1987 y poco más tarde de la primera serie de 35 casos observados entre 1986 y 1988 en La Palma⁶. Posteriormente, se comunican series de Lanzarote⁷, área norte de Gran Canaria⁸, Tenerife⁹ y área sur de Gran Canaria¹⁰. En total se han comunicado unos 170 casos de fiebre Q en el archipiélago, con claro predominio de la forma febril aguda con alteración hepática sobre la forma neumónica y sólo 7 casos de endocarditis.

El propósito de este estudio es describir las características clínicas y epidemiológicas de la fiebre Q en la zona sur de la isla de Gran Canaria.

Métodos

Se analizaron de forma retrospectiva las características clínicas y epidemiológicas de los casos diagnosticados de fiebre Q en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Insular de Gran Canaria durante un período de 3 años (1998-2000). Este hospital atiende un área sanitaria de 360.000 habitantes.

Se analizaron 1.583 muestras de suero correspondientes a 1.358 pacientes. Para la detección de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) e IgM frente a antígenos de fase II de *C. burnetii* se utilizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (bioMérieux, Francia).

El diagnóstico de fiebre Q aguda se realizó cuando se cumplieron los siguientes criterios:

1. La detección de IgG $\geq 1:320$ e IgM $\geq 1:80$ o la demostración de seroconversión (positivización de IgG e IgM o aumento de 4 veces el título de IgG en 2 muestras tomadas con un intervalo de 2 a 4 semanas).
2. Un cuadro clínico compatible (incluyendo síndrome febril aislado, cuadro seudogripal, hepatitis o neumonía).
3. Descartar la existencia de otros procesos.

Como criterio de exposición previa (no reciente) a *C. burnetii* se consideró cualquier título de IgG $\geq 1:80$ en ausencia de anticuerpos de tipo IgM.

Se revisaron las historias clínicas de estos pacientes recogiéndose los siguientes datos: edad, sexo, procedencia (rural o urbana), profesión, contacto con animales, consumo de leche o quesos frescos sin control sanitario, enfermedades previas, manifestaciones clínicas (fiebre, cefalea, mialgias, artralgias, tos, exantema, hallazgos auscultatorios y neurológicos), analíticas (hemograma, velocidad de sedimentación globular, tiempo de tromboplastina parcial activado [TTPa], bilirrubina, transaminasas, lacticodeshidrogenasa, fosfatasa alcalina y gammaglutamiltranspeptidasa) y otras pruebas complementarias (radiografía de tórax, electrocardiograma, ecocardiograma).

Con respecto al cuadro clínico que presentaban los pacientes, se utilizaron las siguientes definiciones:

1. Hepatitis, cuando existió elevación de transaminasas por encima de su valor normal en más de una determinación.
2. Colestasis disociada, cuando existió elevación de al menos 2 enzimas de colestasis junto a valores normales de bilirrubina.
3. Neumonía, como la existencia de un síndrome clínico pulmonar como disnea o tos, más infiltrado en la radiografía de tórax.
4. Fiebre aislada, se definió como temperatura corporal mayor de 38 °C sin criterios de neumonía, hepatitis u otro síndrome específico.

La evolución se registró como recuperación total, recuperación con secuelas neurológicas, enfermedad crónica o muerte.

Resultados

En el período de estudio la prevalencia de anticuerpos de clase IgG a títulos iguales o mayores a 1:80 frente a *C. burnetii* en esta población fue del 23,9% (tabla 1). Sólo en el 14% de los pacientes se remitió una segunda muestra de suero para verificar seroconversión.

Se diagnosticaron 59 casos de fiebre Q aguda, lo que representa el 4,3% de los pacientes estudiados. En 8 de los 59 pacientes (13,6%) se documentó seroconversión. Durante este período no se diagnosticó ningún caso de fiebre Q crónica.

Se pudo disponer de datos clínicos y epidemiológicos de 40 pacientes. De ellos, 23 fueron hospitalizados (57,5%). Todos los casos fueron esporádicos. La edad media de los pacientes fue de $40,6 \pm 13,3$ años (intervalo, 20-74), siendo la edad media de 39,2 años en los varones y 48,2 años en las mujeres ($p = 0,131$). El 85% de los pacientes eran varones (relación varón:mujer de 5,6:1). La distribución estacional se muestra en la figura 1. El 65% de los casos se acumularon de abril a julio. Tenían su residencia habitual en el medio rural 27 pacientes (67,5%) ($p = 0,004$), y el resto vivía en la ciudad de Las Palmas.

Sólo 15 pacientes referían contacto habitual con animales: en dos de ellos el contacto era profesional (un ganadero y un estudiante de veterinaria), 6 pacientes referían ingesta de leche o quesos sin control sanitario y 3 pacientes referían contacto con aguas residuales.

TABLA 1. Estudios serológicos realizados en nuestro hospital durante el período de referencia

Año	Sueros	Pacientes	IgG $\geq 1/80$ (%)	Casos de fiebre Q
1998	532	468	32,7	13
1999	469	382	21,2	17
2000	582	508	17,9	29
Total	1.583	1.358	23,9	59

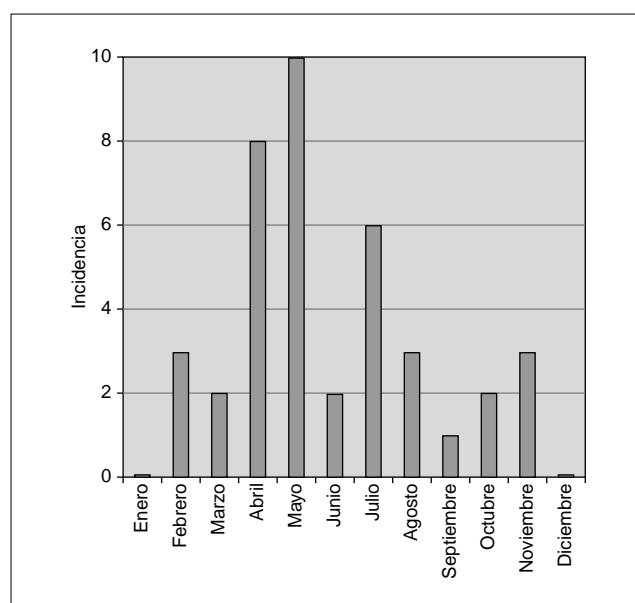


Figura 1. Incidencia estacional de los casos de fiebre Q.

TABLA 2. Prevalencia de datos clínicos y biológicos

Dato	Porcentaje
Fiebre	100
Hepatitis	87,5
VSG elevada	82,5
TTPa* elevado	80
Colestasis disociada	62,5
Neumonía	7,5
Hepatitis y neumonía	5
Accidente cerebrovascular isquémico	5
Exantema	5
Glomerulonefritis aguda	2,5

*Prueba realizada en 32 pacientes.

VSG: velocidad de sedimentación globular; TTPa: tiempo parcial de tromboplastina activada.

Todos los pacientes presentaron fiebre, con una duración media de $13,3 \pm 8,3$ días (intervalo, 5-45 días). Las formas de presentación clínica más frecuentes fueron un síndrome febril (100%) con hepatitis (87,5%) o colestasis disociada (62,5%). Otras presentaciones fueron neumonía (7,5%), neumonía y hepatitis (5%), síndrome febril aislado (5%), accidente cerebrovascular (5%), artritis (2,5%) y glomerulonefritis aguda (2,5%). Dos pacientes presentaron exantema cutáneo con fiebre y hepatitis. Un hecho característico fue que el 87,5% de los pacientes presentaron fiebre con elevación de alguna de las enzimas hepáticas (de citólisis o colestasis) (tabla 2).

Es de destacar también la elevada frecuencia de prolongación del TTPa, presente en el 80% de los 32 casos en los que se determinó.

Tenían alguna enfermedad previa 8 pacientes (20%), siendo las más frecuentes diabetes mellitus e hipertensión arterial. Un paciente era portador de anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

De los 3 casos con neumonía, dos se manifestaron con tos, dolor pleurítico e infiltrado alveolar segmentario, el tercer paciente era un agricultor de 74 años que ingresó con una neumonía intersticial aguda bilateral y elevación de transaminasas, en situación crítica, y falleció antes de establecerse diagnóstico. La necropsia demostró neumonía aguda bilateral y esteatosis hepática difusa de grado leve a moderado, sin que se mencione la presencia de granulomas.

Todos, a excepción del paciente que falleció, recibieron tratamiento con doxiciclina ante la sospecha clínica o cuando se dispuso del resultado serológico. La duración del tratamiento osciló entre 14 y 21 días. En 37 pacientes la evolución fue favorable con recuperación total. Los 2 pacientes con manifestaciones neurológicas se recuperaron con hemiparesia.

Discusión

Debido a que la fiebre Q no está incluida dentro de las enfermedades de declaración obligatoria, se desconoce su verdadera incidencia, aunque numerosos estudios indican que esta enfermedad debe considerarse un problema de salud pública en una mayoría de países, incluida España. Con los datos aportados en este estudio asciende a 210 el número de casos de fiebre Q documentados en nuestra comunidad autónoma y a 94 los descritos en la isla de Gran Canaria. Aunque por el número de casos no se llegue a

considerar un grave problema de salud pública como en otras comunidades autónomas, consideramos que es una enfermedad importante, de considerable incidencia en nuestro medio, que durante estos 3 años asciende a 5 casos/100.000 habitantes/año, inferior a la descrita en la isla de La Palma⁶ (1986-1988) y en Lanzarote⁷ (1985-1992) con 15 y 9 casos, respectivamente. Debido a que muchos casos de fiebre Q son autolimitados sin recibir asistencia médica, y a que precisa pruebas serológicas para su diagnóstico, es probablemente una enfermedad infradiagnosticada, no sólo en España sino en todo el mundo. Así, autores franceses han estimado² que la incidencia anual de la enfermedad aguda en su país es de 50 casos/100.000 habitantes, y sólo el 2% de los pacientes son hospitalizados¹¹.

Sólo en el 14% de los pacientes se remitió más de una muestra de suero para verificar seroconversión o variación coherente de títulos, lo que explicaría, en parte, el posible infradiagnóstico de esta enfermedad.

La seroprevalencia observada en los pacientes a los que se les solicitaba serología de fiebre Q fue del 23,9%, similar a la descrita entre 1991 y 1997 (24,8%) en este mismo hospital¹⁰. En la revisión de los datos publicados en España se encuentra una gran dispersión de las tasas en función de la población estudiada y su localización geográfica¹², con valores que oscilan entre el 0,6 y el 48,6%. Por otra parte, el empleo de diferente metodología (IFI, fijación del complemento), y puntos de corte, obliga a interpretar los resultados con cierta cautela. Al igual que otros autores^{12,13}, consideramos necesaria la estandarización de los distintos métodos de estudio para poder comparar la incidencia y seroprevalencia de la enfermedad entre distintas zonas.

La edad media y la distribución por sexos de nuestros pacientes no difieren de los descritos en otras series. Por diversas razones, siendo la más importante la actividad laboral relacionada con animales de granja, la fiebre Q tiende a afectar más a hombres a partir de la tercera década de la vida, dado que las posibilidades de contraer la infección aumentan cuanto más estrecho es el contacto entre hombre y animales. Sin embargo, esta enfermedad no es excepcional en la edad infantil y en ancianos. Diversos estudios de seroprevalencia realizados indican que la infección por *C. burnetii* se produce con la misma frecuencia en hombres que en mujeres, aunque tiende a ser más grave en los primeros¹.

El 65% de los pacientes tenía su residencia en el medio rural, al igual que ocurre en otras series y a diferencia de lo observado en un estudio previo de nuestro hospital en el que no existían diferencias significativas¹⁰.

La cabra ganadera más abundante en nuestra isla es la caprina. La mayoría de casos de fiebre Q se manifiestan en primavera y verano, hecho relacionado con el parto de las cabras que se produce de noviembre a abril, considerando esta demora probablemente debida a desecación, aerosolización y período de incubación. Se supone, por tanto, que esta distribución estacional se debe a mayor contaminación ambiental con *C. burnetii*. En el resto de Europa la máxima incidencia de la enfermedad también ocurre durante estos meses. Teniendo en cuenta que el clima de nuestra isla es muy diferente al de Europa continental, suponemos que esta distribución se debe a otros factores.

La manifestación clínica más frecuente de la enfermedad en nuestra zona es un síndrome febril con elevación discreta de transaminasas y/o colestasis disociada, siendo rara la

neumonía. Este mismo cuadro clínico es similar al descrito en Francia², Extremadura¹³ y Andalucía¹³, al contrario de lo que ocurre en otros lugares como Canadá y el País Vasco, donde se manifiesta principalmente como un cuadro neumónico^{14,15}. Aunque la fiebre Q debe incluirse entre las causas de neumonía adquirida en la comunidad, la afectación pulmonar es muy poco frecuente en nuestra zona, como queda demostrado tanto en nuestro estudio como en el resto de series de Canarias.

Tampoco en el presente estudio se ha encontrado ningún caso de fiebre Q crónica. Según los datos disponibles de Canarias, se han comunicado 7 casos de endocarditis por fiebre Q, que representan el 3% de los casos totales. En la mayor serie comunicada hasta la actualidad², el 22,6% eran casos de fiebre Q crónica, endocarditis el 73% de ellos. Aunque la expresión clínica de la fiebre Q como forma crónica estaría más relacionada con factores del hospedador (cardiopatía predisponente) que con variaciones genómicas de las cepas, esta gran diferencia en las tasas de fiebre Q crónica con la serie francesa no podría explicarse únicamente sobre el primer supuesto.

Dado que nuestra comunidad es en su mayoría de origen europeo mediterráneo y las vías de transmisión son con toda probabilidad las mismas, esta amplísima diferencia en los porcentajes de neumonía y endocarditis respecto a series del norte peninsular¹⁶ y Francia² sugiere principalmente la participación de diferentes cepas infectantes. Aunque no puede descartarse un posible sesgo por infradiagnóstico de formas neumónicas (sólo el 14% de segundas muestras de suero) el grado de sospecha clínica en nuestro hospital es elevado y se solicita de manera sistemática serología de fiebre Q ante todo caso de neumonía extrahospitalaria, de endocarditis con cultivo negativo y de hipertransaminasemia aguda o crónica. La disponibilidad de perfil bioquímico, TTPa y el uso prioritario de β-lactámicos como tratamiento empírico inicial durante la época de estudio hacen muy difícil pasar por alto una neumonía por *C. burnetii*, al menos en los pacientes ingresados. Por otra parte, los estudios sobre una posible correlación entre distintas cepas y distinta geografía o síndrome clínico no han demostrado por ahora resultados concluyentes, aparentemente por usar diferente metodología y sobre distinto sustrato genético o antigenético, correlación que encuentran algunos autores¹⁷⁻²⁰ pero no otros²¹⁻²³. Lo consideramos una vía abierta para encontrar explicación a esta diferente expresión clínica "norte-sur" de la fiebre Q.

El tanto por ciento de pacientes que recibió tratamiento empírico o específico con doxiciclina es superior al referido en otras series^{7,10,24}. Esto podría explicarse por una mayor sospecha clínica debido al reconocimiento de la enfermedad en la zona (la inexistencia de brucelosis y fiebre tifoidea en nuestra zona también aumentaría la sospecha relativa de fiebre Q en casos de síndrome febril aislado).

La conclusión más destacable de este estudio es que la fiebre Q se manifiesta en nuestra zona como un síndrome febril con afectación hepática, principalmente en hombres de edad media, procedentes del medio rural y de manera preferente durante los meses de abril a julio. La diferente

expresión clínica con respecto a otras zonas sugiere principalmente la implicación de diferentes cepas de *C. burnetii*.

Bibliografía

1. Maurin M, Raoult D. Q Fever. Clin Microbiol Rev 1999;12:518-53.
2. Raoult D, Tissot-Dupont H, Foucault C, Gouvernet J, Fournier PE, Bernit E, et al. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1.383 infections. Medicine 2000;79:109-23.
3. Palosuo T, Leinikki P, Petterson T, Jantti V. Hazards of expanding tourism: Report of six cases of Q fever in Finland. Scand J Infect Dis 1974;6: 173-6.
4. Tellez A, Sainz C, Echevarria C, De Carlos S, Fernández MV, Leon P, et al. Q fever in Spain: Acute and chronic cases; 1981-1985. Rev Infect Dis 1988;10:198-202.
5. Laynez Cerdeña P, Pascual Velasco F. Fiebre Q en Lanzarote. Can Med 1987;3:37-8.
6. Millán Mon A, Argany Fajardo A, Febles Bethencourt J, González Caloca G, Vento Remedios TE, Fernández Cabrera M. Fiebre Q en la isla de Las Palmas. Revisión de 35 pacientes. An Med Intern (Madrid) 1989;6:527-30.
7. Pascual Velasco F. Estudio epidemiológico de la fiebre Q en la isla de Lanzarote (Canarias). Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 1994.
8. Farfante J, Lafarga B, Sagrera J, Jiménez P, Pérez S. Fiebre Q. Estudio de 14 casos en la isla de Gran Canaria. Can Med 1992;5:23-6.
9. Laynez P, Romero F, Pérez A, Hayek M, Davila M, Linares M, et al. Fiebre Q. Revisión de 35 casos en la isla de Tenerife. An Med Intern (Madrid) 1994; 11(Supl 1):85.
10. Santana OE, Rodríguez E, Rodríguez J, De Miguel I, Martín AM. Características epidemiológicas y presentación clínica de fiebre Q en pacientes hospitalizados. Can Med 1999;14:103-7.
11. Dupuis G, Petite J, Peter O, Vouilloz M. An important outbreak of human Q fever in a Swiss alpine valley. Int J Epidemiol 1987;16:282-7.
12. Lepe JA, Guerrero RJ, Ruiz Calderón A, Castillo E, Gómez-Salvago S, Jiménez Alonso MA, et al. Epidemiología de la fiebre Q en la zona norte de Huelva. Enferm Infect Microbiol Clin 1999;17:65-8.
13. Pascual Velasco F. Fiebre Q. Zamora. Junta de Castilla y León, 1996.
14. Marrie TJ. Q fever, 1979-1987-Nova Scotia. Can Dis Wkly Rep 1988; 14:69-70.
15. Montejano Baranda M, Corral Carranceja J, Aguirre Errasti C. Q fever in the Basque country: 1981-1984. Rev Infect Dis 1985;7:700-1.
16. Sobradillo V, Ansola P, Baranda F, Corral C. Q fever pneumonia: A review of 164 community -acquired cases in the Basque country. Eur Respir J 1989;2:263-6.
17. Valkova D, Kazar J. A new plasmid (QpDV) common to *Coxiella burnetii* isolates associated with acute and chronic Q fever. FEMS Microbiol Lett 1995;125(2-3):275-80.
18. Ho T, Htwe KK, Yamasaki N, Zhang GQ, Ogawa M, Yamaguchi T, et al. Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. Microbiol Immunol 1995;39:663-71.
19. Zhang GQ, To H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K. Differentiation of *Coxiella burnetii* by sequence analysis of the gene (com1) encoding a 27-kDa outer membrane protein. Microbiol Immunol 1997;41:871-7.
20. To H, Hotta A, Zhang GQ, Nguyen SV, Ogawa M, Yamaguchi T, et al. Antigenic characteristics of polypeptides of *Coxiella burnetii* isolates. Microbiol Immunol 1998;42(2):81-5.
21. Stein A, Raoult D. Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. Microb Pathog 1993;15:177-85.
22. Masuzawa T, Sawaki K, Nagaoka H, Akiyama M, Hirai K, Yanagihara Y. Relationship between pathogenicity of *Coxiella burnetii* isolates and gene sequences of the macrophage infectivity potentiator (Cbmip) and sensor-like protein (qrsA). FEMS Microbiol Lett 1997;154:201-5.
23. Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by com1 and mucZ sequence comparison. FEMS Microbiol Lett 1999;180:61-7.
24. González L, Corral JL, Rodríguez-Baño J, Borobio MV, Conejo MJ, Muniaín MA. Fiebre Q aguda en Sevilla: características clínicas y epidemiológicas de 100 casos: En VII Congreso de la SEIMC. Torremolinos; 5-8 mayo 1996.

Tifus murino importado de Senegal en un inmigrante viajero

Sr. Editor: El tifus murino o endémico es una zoonosis causada por *Rickettsia typhi*, transmitida a través de pulgas de ratas y animales domésticos¹. Su epidemiología, patogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento han sido objeto de dos recientes revisiones nacionales^{2,3}. Esta entidad cursa generalmente como un síndrome febril agudo autolimitado aunque se han descrito ocasionalmente complicaciones graves, incluso mortales^{2,3}. El tifus murino es una enfermedad propia de climas templados y de amplia distribución, habiéndose comunicado en España series de casos autóctonos⁴⁻⁶ y un dudoso caso importado⁷. Sin embargo, esta enfermedad es probablemente poco considerada en nuestro país ante pacientes febres, incluyendo a viajeros al regreso de zonas altamente endémicas. Describimos aquí un caso de tifus murino importado en territorio español, en un inmigrante viajero, con el objetivo de alertar a los clínicos acerca de este problema emergente.

Varón de 35 años que ingresó en julio de 2004 por fiebre alta al regreso de Senegal. Se trataba de un paciente de raza negra, senegalés residente en Gran Canaria desde hacía 9 años. De profesión comerciante, no tenía hábitos tóxicos, ni contacto con animales domésticos, ganado o aguas residuales u otras actividades de riesgo epidemiológico, excepto viajes anuales a Senegal por razones familiares.

El paciente viajó por Senegal durante 3 semanas visitando aldeas de pobres condiciones higiénicas, con animales domésticos en libertad, no habiendo consumido lácteos no higienizados. No había realizado profilaxis antipalúdica. A la semana del regreso comenzó con fiebre diaria de 40 °C con escalofríos, cefalea frontal y sudoración profusa sin otros datos focales, ingresando 8 días después. En la exploración destacaba fiebre de 39,5 °C y una discreta hemorragia subconjuntival unilateral, siendo el resto normal.

El hemograma era normal, con ligera monocitosis; la VSG era de 50 mm/h y los estudios de hemostasia eran nor-

males. En el perfil bioquímico destacaban GOT: 118 U/l; GPT: 243 U/l; fosfatasa alcalina: 303 U/l; LDH: 300 U/l, y GGT: 823 U/l, con bilirrubina normal. El análisis sistemático de orina reveló proteinuria de 500 mg/dl y microhematuria. La radiografía de tórax fue normal. Los hemocultivos, urocultivo, coprocultivo y el examen parasitológico (por triplicado) de heces fueron negativos.

Se realizaron en cuatro ocasiones estudios de sangre periférica (frotis fino) para el diagnóstico de hemoparasitosis y pruebas inmunocromatográficas (ICT Pf/Pv® y OptiMal®) para el diagnóstico de malaria, que fueron negativos. También se realizaron las siguientes pruebas serológicas: frente a virus A de la hepatitis (IgM negativo, IgG positivo), virus de Epstein-Barr (IgM negativo, IgG positivo), virus dengue (IgM negativo, IgG positivo), *Brucella* spp. (rosa de Bengala negativo, ELISA [IgG e IgM] negativos), citomegalovirus (IgM negativo, IgG positivo), *Toxoplasma* spp. (IgM negativo, IgG positivo).

El paciente fue tratado empíricamente con sulfato de quinina (600 mg/8 h), doxiciclina (100 mg/12 h) y levofloxacino (500 mg/24 h) quedando afebril y asintomático a las 24 h del inicio. El estudio serológico frente a varias rickettsiosis (*R. typhi*, *R. conorii* y *Coxiella burnetii*) se efectuó mediante inmunofluorescencia indirecta (BioMérieux) siendo los resultados expresados en la tabla 1.

El paciente objeto de esta comunicación presentó un cuadro clínico-biológico característico de un tifus murino teniendo en cuenta la presencia de fiebre elevada con cefalea intensa, sin focalidad infecciosa aparente y relativamente bien tolerada, discreta elevación de las enzimas hepáticas de citólisis y colestasis (disociada), y rápida respuesta a doxiciclina. Además presentó microhematuria, hallazgo frecuente en nuestra experiencia⁶, aunque no extrema (imposible de evaluar en piel negra) ni trombocitopenia. Los datos epidemiológicos (contacto con animales durante el viaje y período de incubación) apoyan claramente que este cuadro era importado.

La serología fue diagnóstica por la tasa y cinética temporal de los títulos así como por la negatividad de otras

pruebas útiles en el estudio de fiebre importada (p. ej., malaria, fiebre tifoidea, brucelosis, dengue). Como puede observarse en la tabla, durante la fase aguda se encontraron títulos elevados de anticuerpos frente a *R. conorii* y, en menor medida frente a *C. burnetii*. En presencia de reacción cruzada, una situación relativamente frecuente en las enfermedades producidas por rickettsiales, el diagnóstico exacto puede realizarse mediante datos serológicos o por PCR⁸. Un esquema útil para el diagnóstico serológico consiste en tres pasos sucesivos: a) considerar como agente causal a aquel cuyos títulos de anticuerpos (IgM o IgG) sean ≥ 2 diluciones con respecto a otros antígenos rickettsiales; b) si los títulos difieren en menos de 2 diluciones, realizar un Western blot y c) si los resultados del Western blot no son concluyentes realizar estudios de adsorción cruzada⁸. En general, estas técnicas complementarias (Western blot, PCR) sólo están disponibles en centros de referencia⁸.

En nuestra revisión previa² recordábamos la conveniencia de pensar en esta enfermedad en España y advertíamos sobre la probable emergencia de casos importados dado el creciente número de viajeros procedentes de zonas endémicas. Debe destacarse que nuestro paciente era un inmigrante viajero, senegalés en este caso, que viajaba a su país por razones no turísticas, lo que parece confirmar el mayor riesgo de esta población para ciertas enfermedades importadas, como se ha sugerido recientemente⁹. Además, conviene recordar que Senegal es el segundo país de origen de inmigrantes subsaharianos en España y un frecuente destino turístico¹⁰, por lo que es predecible la aparición de nuevos casos importados.

Alfonso Ángel-Moreno^a,
Margarita Bolaños^b, Evora Santana^b
y José L. Pérez-Arellano^a

^aUnidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. ^bServicio de Microbiología. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria y Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. España.

Bibliografía

- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997;10:694-719.
- Bolaños M, Ángel-Moreno A, Pérez-Arellano JL. Tifus murino. Una enfermedad en la que pensar aquí y ahora. Med Clin (Barc). 2004; 122:383-9.
- Bernabeu-Wittel M, Segura-Porta F. Enfermedades producidas por rickettsias. Enf Infec Microbiol Clin. 2005;23:163-72.

TABLA 1.

	Fase aguda		Convalecencia	
	IgM	IgG	IgM	IgG
<i>Rickettsia typhi</i>	1:640	1:20.840	1:160	1:1.280
<i>Rickettsia conorii</i>	1:320	1:640	1:40	1:80
<i>Coxiella burnetii</i>	< 1:40	1:320	< 1:40	< 1:40

4. Bernabeu-Wittel M, Pachón J, Alarcón A, López-Cortés LF, Viciana P, Jiménez-Mejías ME, et al. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration. A 17-year study in the south of Spain. *Arch Intern Med.* 1999;159:872-6.
5. Miguélez M, Laynez P, Linares M, Hayek M, Abella L, Marañez I. Tifus murino en Tenerife. Estudio clínico-epidemiológico y características clínicas diferenciales con la fiebre Q. *Med Clin (Barc).* 2003;121:613-5.
6. Hernández-Cabrera M, Ángel-Moreno A, Santana E, Bolaños M, Francés A, Martín-Sánchez AM, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands (Spain). *Emerg Infect Dis.* 2004;10:740-3.
7. Campos Rivas R, Fanlo Mateo P, Arteaga Mazzuelas H, Tiberio López G. Síndrome general tras un viaje a la India. *Med Clin (Barc).* 2005;125:278.
8. Pérez Arellano JL, Fenollar F, Ángel-Moreno A, Bolaños M, Hernández M, Santana E, et al. Human *Rickettsia felis* Infection, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1961-4.
9. Valerio L, Guerrero L, Martínez O, Sabría M, Garrido P, Fabregat A, et al. Los inmigrantes viajeros. *Aten Primaria.* 2003;32:330-6.
10. Velasco M, Gascón J, Valls ME, Vilella A, Corachán M. Paludismo importado de Senegal: a propósito de 17 casos en el año 2000. *Med Clin (Barc).* 2005;124:19-21.

Tifus endémico (murino). Una enfermedad en la que pensar aquí y ahora

Localizador web
Artículo 62.725Margarita Bolaños^a, Alfonso Angel-Moreno^{b,c}, José Luis Pérez-Arellano^{b,c}^aServicio de Microbiología. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. Gran Canaria.^bUnidad de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Insular de Gran Canaria. Gran Canaria.^cDepartamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Gran Canaria. España.

Es muy probable que la mención de la enfermedad conocida como tifus murino o tifus endémico evoque, en España, 2 ideas: *a)* se trata de una enfermedad «antigua», y *b)* es una infección «exótica». Sin embargo, la revisión de la bibliografía reciente contradice ambas ideas, ya que se trata de un proceso relativamente frecuente, ya sea como infección autóctona o como enfermedad importada por viajeros. Por otro lado, además de la forma clásica de tifus murino, en la última década se han descrito «nuevas» variedades de esta entidad (en lo que respecta a sus agentes causales, los reservorios de la infección, las formas de transmisión o las manifestaciones clínicas). Por todo ello, en este artículo emplearemos preferentemente la denominación tifus endémico, ya que engloba de forma más amplia este grupo de entidades clínicas.

Breve reseña histórica

La delimitación del tifus murino como una enfermedad diferente fue realizada por el epidemiólogo norteamericano Maxcy en 1926¹. Cinco años después, Dyer et al² aislarón el agente causal en ratas y pulgas. En las décadas siguientes se describieron casos de esta entidad en múltiples regiones del planeta, y desde entonces se ha considerado una enfermedad de distribución mundial con un ciclo clásico en el que las ratas constituirían el reservorio y los humanos se infectarían por la autoinoculación de heces de pulgas, a través de la picadura. En España, aunque se describieron comunicaciones aisladas y series de casos de forma continua hasta 1990³, la difusión de estos datos no ha sido suficiente, de tal forma que la mayor parte del colectivo sanitario desconocía (y desconoce) su existencia como enfermedad autóctona en nuestro país.

Por otro lado, desde 1990 se han descrito nuevos patrones de tifus murino o enfermedades similares: *a)* la infección por *Rickettsia typhi* a través de la inhalación de heces desecadas de pulgas^{4,5}, *b)* la transmisión de *R. typhi* por otros tipos de pulgas (principalmente la pulga de los gatos, *Ctenocephalides felis*) y desde otros reservorios (perros, gatos, zarigüeyas)⁶, y *c)* la identificación una nueva especie de *Rickettsia* (*R. felis*) que origina un cuadro clínico similar al producido por *R. typhi*^{7,8}.

Agentes causales y formas de transmisión

Los organismos del tifus endémico (*R. typhi* y *R. felis*) se incluyen taxonómicamente, tal como se expresa en la tabla 1, dentro del género *Rickettsia*⁹. Tradicionalmente este género se ha subdividido en varios subgrupos, que se exponen en la tabla 2. Los 2 microorganismos relacionados con el tifus endémico se incluyen taxonómicamente en diferentes subgrupos: *R. typhi* en el grupo del «tifus»⁴ y *R. felis* en el grupo de las « fiebres manchadas»¹⁰.

Los microorganismos causales de tifus endémico poseen las características comunes del género *Rickettsia*. Así, se localizan en el citoplasma celular como microorganismos libres (no en el compartimiento vacuolar) y su genoma es circular y de pequeño tamaño (1-1,6 Mb)¹¹.

El ciclo biológico de *R. typhi* se mantiene en la naturaleza entre hospedadores mamíferos (rata y humanos) y vectores (pulgas). El ciclo clásico natural de esta entidad incluye 2 especies de rata (*Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) y la pulga oriental de la rata (*Xenopsylla cheopis*). Las pulgas adquieren la infección a partir de ratas con rickettsemias y mantienen la infección (que no afecta a su supervivencia) durante el resto de su vida. La transmisión de la enfermedad a los humanos (y a otras ratas) tiene lugar de 3 formas diferentes. La más frecuente es la autoinoculación a partir de las heces de las pulgas en la zona de la picadura, debido a que ésta presenta un carácter pruriginoso que lleva al raspado. Otras formas son la transmisión directa por la picadura y la inhalación de heces de pulga contaminadas. Este ciclo clásico sigue siendo causa de tifus endémico en algunas regiones como Grecia¹² o Tailandia¹³.

En otras zonas del mundo, el tifus endémico presenta otros patrones, no caracterizados de forma tan concreta. El aspecto más importante es la presencia de otros reservorios (p. ej., gatos, perros o zarigüeyas), otro vector (*C. felis*, la pulga de los gatos) y otra especie (*R. felis*). Este «nuevo» vector condiciona características epidemiológicas diferentes de las del tifus endémico. Así, *C. felis* no sólo parasita a gatos, sino a otros mamíferos, principalmente los perros¹⁴, lo que facilita su diseminación en el ámbito doméstico. En segundo lugar,

TABLA 1

Taxonomía general de los microorganismos causales de tifus endémico

Orden	Familia	Tribu	Género
<i>Rickettsiales</i>	<i>Anaplasmataceae</i> <i>Bartonellaceae</i> <i>Rickettsiaceae</i>	<i>Ehrlichiae</i> <i>Wolbachiae</i> <i>Rickettsiae</i>	<i>Rickettsia</i>

Correspondencia: Prof. J.L. Pérez Arellano.

Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas.

Centro de Ciencias de la Salud. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Pza. Dr. Pateur, s/n. 35080 Las Palmas de Gran Canaria. España.

Correo electrónico: jl.perez@dcmq.ulpgc.es

Recibido el 22-10-2003; aceptado para su publicación el 13-1-2004.

TABLA 2

Grupos «clásicos» de infecciones por el género *Rickettsia*

	Grupo		
	Fiebres exantemáticas	Tifus	Fiebre de las trincheras
Localización intracelular Temperatura óptima de crecimiento Reacción cruzada Prototipo de infección	Citoplasma 32 °C OX-2** Fiebre manchada de las Montañas Rocosas Fibre botonosa	Citoplasma* 35 °C OX-19 Tifus exantématico	Citoplasma 35 °C OX-K Fiebre de los matorrales

*Excepto *R. canadensis*; **excepto *R. rickettsii*.

TABLA 3

Estudios de seroprevalencia de infección por *R. typhi* en el mundo

País (zona)	N.º de casos	Tipo de muestra	Prevalencia	Fuente bibliográfica
Europa				
España (Salamanca)	400	Población general	12,5%	Ruiz et al. Eur J Epidemiol 1990;6:293-9
España (Madrid)	640	Población general	6,8%	Lledo et al. Eur J Epidemiol 2001;17:927-8
Grecia	1.584	Población general	2%	Daniel et al. Am J Trop Med Hyg 2002;66:76-9
Bosnia-Herzegovina	183	Población general	37,7%	Punda-Polic et al. Eur J Epidemiol 1995;11:697-9
América				
EE.UU. (Nueva York)	204	Usuarios drogas por vía intravenosa	0%	Comer et al. Am J Trop Med Hyg 2001;65:855-60
EE.UU. (Los Ángeles)	200	Indigentes	0%	Smith et al. J Infect Dis 2002;186:1673-6
EE.UU. (Sudeste)	1.999	Personas 1-17 años	0,6%	Marshall GM. Ped Infect Dis J 2000;19:1103-4
Africa				
Angola	113	Población general	0%	Dupont et al. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33
Burkina Faso	102	Población general	5,9%	Dupont et al. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33
Congo	100	Población general	5,0%	Dupont et al. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33
Costa de Marfil	89	Población general	2,3%	Dupont et al. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33
Islas Comores	93	Población general	2,2%	Dupont et al. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33
Mali	100	Población general	11,0%	Dupont et al. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33
Mauritania	118	Población general	1,7%	Niang et al. Eur J Epidemiol 1998;14:817-8
Marruecos (Casablanca)	300	Donantes de sangre	1,7%	Meskini et al. Eur J Epidemiol. 1995;11:655-60
Marruecos (Fez)	126	Muestras de laboratorio	4%	Meskini et al. Eur J Epidemiol. 1995;11:655-60
República Centroafricana	99	Población general	10,1%	Dupont et al. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33
Tanzania	150	Mujeres embarazadas	28%	Anstey et al. Am J Trop Med Hyg 1997;57:187-9
Túnez	500	Donantes de sangre	3,6%	Letaief et al. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995;89:266-8
Zambia	377	Población general	5%	Okabayashi et al. Am J Trop Med Hyg 1999;61:70-2
Asia				
Indonesia	464	Población general	34,7%	Richards et al. Am J Trop Med Hyg 1997;57:91-5
Tailandia	215	Donantes de sangre	8%	Strickman et al. Am J Trop Med Hyg 1994;51:149-53

la pulga del gato es capaz de transmitir las dos especies de *Rickettsia* relacionadas con el tifus endémico¹⁵. Finalmente, la transmisión transovárica de *R. typhi* en *X. cheopis* es muy limitada¹⁶, mientras la de *R. felis* en *C. felis* es muy eficaz¹⁷, lo que facilita la diseminación de la infección.

Epidemiología

El tifus endémico es una enfermedad que aparece de forma endémica en climas templados y específicamente en las zonas costeras¹⁸. Las principales series clínicas se han descrito en EE.UU.¹⁹⁻²¹, México²², sudeste asiático^{13,23,24}, Australia²⁵, Grecia¹² y España²⁶⁻²⁸. Sin embargo, existen estudios de seroprevalencia que señalan que la infección por *R. typhi* tiene una mayor difusión que la indicada exclusivamente por los datos clínicos. En la tabla 3 se indican los datos más relevantes acerca de los estudios de seroprevalencia en diferentes países y regiones. Por otro lado, se ha detectado infección por *R. typhi* en varias especies de mamíferos (p. ej., roedores, perros) en diferentes países, incluidos España y Portugal. Otro aspecto epidemiológico de interés clínico es la comunicación de casos de tifus endémico como enfermedad importada tanto en viajeros^{29,30} como en refugiados³¹. En la mayor parte de las series el tifus endémico tiene un patrón temporal característico (tabla 4), predominando durante el verano y el principio del otoño^{12,19,21,26,28}. Sin embargo, en otras zonas se describen casos durante todo el

año^{13,19,28}. No existe una asociación entre esta infección y el hábitat rural o urbano (tabla 3).

Esta enfermedad aparece en todos los grupos de edad (desde los 5 meses a los 81 años) y es relativamente frecuente la afección infantil (tabla 4). Por otro lado, se ha observado que la prevalencia de anticuerpos frente a *R. typhi* aumenta con la edad. En lo que respecta a la distribución por sexo, no existen diferencias significativas.

En la mayor parte de las series clínicas no se ha detectado una asociación entre la presencia de tifus endémico y la actividad profesional de los pacientes. Sin embargo, en determinadas zonas, se ha observado una relación significativa con algunas profesiones concretas como recolectores de caucho o basureros.

Finalmente, parece que la raza no influye de forma importante en la infección, aunque no existen datos sobre su papel en la aparición de enfermedad. Únicamente en un trabajo se menciona la diferencia en personas de diferentes razas, pero este hecho se atribuye a la mayor exposición al agente causal.

Los datos epidemiológicos particulares de la infección por *R. felis* son menos conocidos, debido a la identificación más reciente de esta especie, y secundariamente a la disposición de técnicas diagnósticas específicas. De cualquier forma, se han detectado casos clínicos de tifus endémico por *R. felis* en América (Texas⁷, México³² y Brasil³³), Europa³⁴ y Asia³⁵. También se ha comprobado que, además de los países en

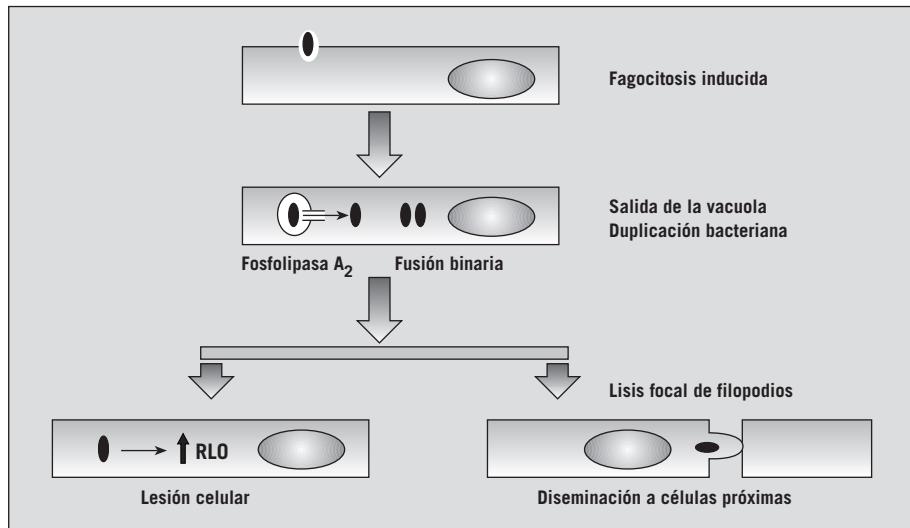


Fig. 1. Mecanismos patogénicos en el tifus endémico. RLO: radicales libres de oxígeno.

los que se han descrito casos clínicos, existe infección por *R. felis* en pulgas de gato en otras zonas del mundo^{8,15,17}.

Patogenia y fisiopatología

Los datos acerca de la patogenia y fisiopatología del tifus endémico se basan principalmente en los estudios realizados *in vitro*^{36,37} y en los escasos modelos experimentales. Además, un número considerable de datos se extrapolan de los obtenidos en otras infecciones por microorganismos del género *Rickettsia*³⁸.

Patogenia

La entrada de los agentes causales conocidos de tifus endémico (*R. typhi* y *R. felis*) en humanos tiene lugar por vía transcutánea (autoinoculación de heces de pulga o, menos frecuentemente, picadura de este artrópodo) o inhalatoria. La inoculación transcutánea de ambas rickettsias no se asocia a una lesión cutánea característica («mancha negra») propia de las rickettsiosis del grupo de las «fiebres exantemáticas» o de la fiebre de las trincheras. Desde la piel (o el aparato respiratorio), las rickettsias se diseminan por vía linfática y/o hemática hasta las células endoteliales, que constituyen su principal célula diana. La afección de las células del sistema mononuclear fagocítico y, posiblemente los hepatocitos, tiene un papel secundario en la patogenia de la enfermedad.

La lesión endotelial es el elemento clave en la patogenia y fisiopatología del tifus endémico. Las rickettsias se adhieren a las células endoteliales mediante sus proteínas externas de membrana –outer membrane proteins (OMP) A y B–, sien-

do desconocido el receptor celular. Inmediatamente penetran en las células endoteliales empleando un mecanismo peculiar denominado «fagocitosis inducida», ya que el aporte de energía corresponde al agente patógeno. Aunque inicialmente las rickettsias son englobadas en una vacuola de fagocitosis, antes de que se produzca la fusión lisosoma-fagosoma acceden al citoplasma gracias a una fosfolipasa A₂ producida por las propias bacterias. En el citoplasma se produce la división celular por fisión binaria, utilizando las fuentes energéticas del hospedador. Las consecuencias de la infección celular son de 2 tipos. Por un lado, se produce la diseminación a las células próximas por un mecanismo peculiar, que implica la reordenación de la actina de la célula endotelial. Por otro lado, se produce una lesión endotelial directa (no mediada por toxinas o por mecanismos inmunológicos) en cuya génesis están implicados los radicales libres de oxígeno (fig. 1).

Fisiopatología

La mayor parte de las manifestaciones del tifus endémico dependen de la endotelitis, que: a) altera la permeabilidad capilar y promueve la salida de líquido hacia los tejidos; b) altera el funcionamiento normal de los órganos (sobre todo el sistema nervioso central y el pulmón), y c) desencadena una activación local de la coagulación. Otros factores asociados son la liberación de citocinas proinflamatorias por las células endoteliales y macrófagos (p. ej., las interleucinas 1 y 6, responsables de varias manifestaciones (p. ej., la fiebre)^{36,37}. La respuesta inmunitaria a los agentes causales del tifus endémico incluye un componente humorral (anticuerpos frente

TABLA 4

Datos epidemiológicos

	Dumler et al ¹⁹ , Texas (EE.UU.) 1991	Silpapojakul et al ¹³ , Tailandia 1992	Bernabeu et al ²⁶ , Sevilla 1999	Fergie et al ²⁰ , Texas (EE.UU.) 2000*	Whiteford et al ²¹ , Texas (EE.UU.) 2001*	Gikas et al ¹² , Creta (Grecia) 2002	Hernández et al ²⁸ , Las Palmas 2003
N.º de pacientes	80	137	104	30	97	83	22
Distribución temporal	Abril-junio	Sin variación	Agosto-octubre	Mayo-noviembre	Mayo-julio	Julio-octubre	Verano
Edad media (años)	48	–	37,9	10	8	50 (varones)	28
Intervalo de edad	–	4-76 años	12-81 años	2-17 años	5 meses-16 años	40 (mujeres)	14-76
Relación varones/mujeres	2:3	1,3:1	1,2:1	3:4	1,2:1	3:2	21:1
Casos urbanos	–	43%	63,5%	–	–	46%	–

*Serie exclusivamente pediátrica.

TABLA 5

Manifestaciones clínicas en las principales series de tifus murino

	Dumler et al ¹⁹ , Texas (EE.UU.) 1991	Silpapojakul et al ¹³ , Tailandia 1992	Bernabeu et al ²⁶ , Sevilla 1999	Fergie et al ²⁰ , Texas (EE.UU.) 2000	Whiteford et al ²¹ , Texas (EE.UU.) 2001	Gikas et al ¹² , Creta (Grecia) 2002	Hernández et al ²⁸ , Las Palmas 2003
N.º de casos	80	137	104	30	97	83	22
Fiebre	98	100,0	100	100	100,0	100	100,0
Cefalea	75	41,6	71,1	77	76,0	88	90,9
Exantema	54	20,4	62,5	80	63,0	80	68,2
Artralgias/mialgias	46	44,5	77,8	57	40,0	45	45,4
Hepatomegalia	—	24,1	29,8	—	—	22	38,1
Tos	35	—	25,0	40	15,0	28	28,6
Diarrea	26	5,1	5,7	40	33,0	11	18,2
Espplenomegalia	—	5,2	24	—	—	23	14,3
Picadura	39	0	3,8	3,3	34,0	—	13,6
Náuseas/vómitos	48	30,7	23	43	45,0	18	13,6
Dolor abdominal	23	10,9	—	60	27,0	11	13,6
Confusión	8	2,2	4,8	7	8,0	10	13,6
Conjuntivitis	—	2,2	—	—	7,0	25	4,5

Los datos de las manifestaciones clínicas se expresan como porcentaje.

a las proteínas externas de membrana) y un componente celular, mediado principalmente por linfocitos T citotóxicos y células *natural killer*. En general, es una respuesta eficaz, de tal forma que el individuo queda protegido de nuevos episodios.

Manifestaciones clinicobiológicas

El período de incubación de la enfermedad oscila entre 6 y 14 días³⁹, con una media de 11 días en casos experimentales. En algunos casos se ha documentado un período prodromico de 1-3 días caracterizado por cefalea, artromigias, astenia y náuseas, aunque no es excepcional un inicio más agudo. El cuadro clínico inicial se caracteriza por la tríada de fiebre elevada (a menudo asociada a escalofríos), cefalea intensa y exantema cutáneo^{12,13,19-21,28}. La frecuencia de cada uno de estos datos clínicos es diferente en cada una de las series de casos (tabla 5).

En las diferentes series, el dato más constante es la fiebre, que supera los 39 °C en la mayor parte de los casos y resulta difícil de controlar con los antitérmicos habituales. Otro dato característico es la cefalea que, exceptuando la serie de Tailandia¹³, aparece en más del 75% de los casos. En al-

gunos casos, la intensidad y características semiológicas hacen pensar en la presencia de síndrome meníngeo (véase más adelante). La presencia de exantema es muy variable (20-80% de los pacientes), aunque es posible que exista un sesgo (negativo o positivo) en su evaluación, ya que es de carácter maculopapular, poco intenso y de predominio central (tronco y zona proximal de las extremidades). En personas con piel muy pigmentada es imposible detectar este tipo de exantema.

Otras manifestaciones clínicas que aparecen en el tifus endémico se recogen en la tabla 5. Como puede observarse, dependiendo de las características de cada serie, la presencia de determinados síntomas o signos es muy variable, lo que puede estar en relación con 3 factores principales: a) la realización de una historia clínica dirigida (estudios prospectivos o retrospectivos); b) la penetración a través de diferentes vías (p. ej., cutánea o inhalatoria), que puede influir en 2 datos clínicos: la aparición de tos o la detección de picadura, y c) la existencia de diferentes microorganismos (*R. typhi*, *R. felis* y, posiblemente, otras especies no identificadas).

Los datos analíticos son también muy variables según las series (tabla 6). En el hemograma es frecuente la anemia

TABLA 6

Datos complementarios en las principales series de tifus murino

	Dumler et al ¹⁹ , Texas (EE.UU.) 1991	Silpapojakul et al ¹³ , Tailandia 1992	Bernabeu et al ²⁶ , Sevilla 1999	Fergie et al ²⁰ , Texas (EE.UU.) 2000	Whiteford et al ²¹ , Texas (EE.UU.) 2001	Gikas et al ¹² , Creta (Grecia) 2002	Hernández et al ²⁸ , Las Palmas 2003
Anemia	75	—	0,96	57	69	25	18,2
Leucocitopenia	28	3,9	18	40	37	7,2	9,0
Leucocitocitosis	29	—	20	3	1	0	18,2
Neutrofilia	—	—	—	63	77	—	36,4
Trombocitopenia	48	2,9	19	60	43	51	45,4
Elevación VSG	—	—	59,5	75	81	—	89,5
Alargamiento tiempo de protrombina	30	—	—	—	—	—	22,7
Aumento ratio TTPA	—	—	—	—	—	—	27,3
Aumento de urea	27	—	—	0	3	—	36,4
Aumento de creatinina	21	—	—	0	0	—	13,6
Hiponatremia	60	—	—	66	58	37	18,2
Aumento de CK en suero	21	—	—	—	—	42	10,0
Aumento de LDH en suero	87	—	—	—	100	82	81,8
Aumento de AST en suero	90	—	67	67	82	86	77,3
Aumento de ALT en suero	73	—	67	67	38	64	99,9
Aumento de fosfatasa alcalina en suero	60	—	25	—	—	15	30,0
Aumento GGT en suero	—	—	—	—	—	—	57,2
Hipoalbuminemia	89	—	—	46	87	82	54,5
Hipergammaglobulinemia	—	—	—	—	—	—	75,0

Los datos se expresan como porcentaje. VSG: velocidad de sedimentación globular; TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activado; CK: creatincinasa; LDH: lactatodeshidrogenasa; AST: aspartatoaminotransferasa; ALT: alaninaminotransferasa; GGT: gammaglutamiltranspeptidasa.

(en series americanas), que aparece sólo en una cuarta parte de los pacientes en otras zonas. El recuento leucocitario es muy variable, pudiendo aparecer leucocitopenia, leucocitosis (con neutrofilia) o, lo que es más habitual, un recuento leucocitario normal «inesperado» en un paciente en el que los datos clínicos apuntan a una infección bacteriana. Aproximadamente en la mitad de los pacientes aparece trombocitopenia, aunque en algunas series este hecho es menos frecuente.

La afección de la coagulación se ha estudiado poco. En nuestra serie aparece un alargamiento del tiempo de protrombina y del tiempo de tromboplastina parcial activado en una cuarta parte de los pacientes²⁸.

La lesión renal es muy variable. Es excepcional en las series infantiles^{20,21}, pero aparece una elevación de la urea y creatinina hasta en una cuarta parte de los casos^{19,28}. En nuestra experiencia, hasta el 86,9% de los pacientes presentaban alteraciones en el estudio de la orina, principalmente microhematuria²⁸, lo que contrasta con la ausencia de alteraciones en otras series de casos^{20,21,26} y la menor detección (28%) en el estudio de Dumler et al¹⁹. En un estudio centrado específicamente en las lesiones renales del tifus murino, Shaked et al⁴⁰ encontraron alteraciones urinarias en 5 de los 27 pacientes estudiados. En la bibliografía se han comunicado 14 casos de insuficiencia renal aguda^{12,19,28,40-42} asociados a tifus murino, cuyo sustrato anatopatológico era una nefritis intersticial multifocal perivascular (característico de las rickettsiosis)⁴⁰.

La afección hepática es muy frecuente en todas las series revisadas. Se detectan hipoalbuminemia e hipertransaminasemia en más del 75% de los casos (tabla 6). La hipertransaminasemia frecuentemente alcanza el rango de las hepatitis virales, y es menos frecuente la aparición de colestasis disociada. Sin embargo, es excepcional la aparición de ictericia y/o hiperbilirrubinemia, que se presentan en 3 circunstancias: alcoholismo, infecciones concomitantes o deficiencia de glucosa 6 fosfatodeshidrogenasa⁴³.

La afección pulmonar es relativamente frecuente en el tifus endémico, y la manifestación clínica más frecuente es la tos seca. En la radiografía de tórax se objetiva, hasta en una cuarta parte de los pacientes, un patrón alveolar, asociado o no a derrame pleural mínimo. No existen suficientes datos histológicos para explicar estos hallazgos, aunque se ha atribuido a las alteraciones de la permeabilidad vascular y/o a la inflamación alveolar directa inducida por *R. typhi*.

Además de las anteriores, se han descrito múltiples complicaciones que se resumen en la tabla 7. La mortalidad global del tifus endémico se cifra entre un 1-4% y es más frecuente en personas con enfermedad previa y/o edad avanzada.

Diagnóstico

El diagnóstico etiológico del tifus endémico se basa en varias técnicas diagnósticas, que revisaremos brevemente para exponer posteriormente la situación actual del diagnóstico de esta entidad.

Serología

La prueba clásica en el diagnóstico del tifus endémico ha sido la reacción de Weil-Felix empleando como antígeno *Proteus vulgaris* OX-19. Esta técnica se basa en la reacción cruzada entre la cepa mencionada de *P. vulgaris* y antígenos del grupo del «tifus» (y también de *R. rickettsii*). La reacción de Weil-Felix detecta principalmente anticuerpos de isotipo IgM, aunque su sensibilidad y especificidad son muy

TABLA 7

Complicaciones del tifus murino

Complicación	Referencias bibliográficas
Artritis	Pascual et al. Med Clin (Barc) 1991;97:142-3
Embolia pulmonar	Potzman et al. J R Soc Med 1986;97:367-8
Endocarditis	Buchs et al. South Med J 1992;85:751-3
Insuficiencia multiorgánica	Austin et al. Am J Med Sci 1987;293:320-3
Lesión retiniana	Pether et al. Lancet 1994;344:897-8
Meningoencefalitis	Bernabeu-Wittel et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:131-2
Parotiditis	Hudson et al. Int Ophthalmol 1997;21:121-6
Pleuropericarditis	Lu et al. Scand J Infect Dis 1997;29:632-3
Seudooclusión intestinal	Manor et al. Am J Ophthalmol 1977;84:559-62
Rotura esplénica	Masalha. J Neurol 1998;245:665-8
	Massung. Clin Infect Dis 2001;32:979-82
	Lozano de León et al. Enf Infect Microbiol Clin 1991;9:585
	Moreno Castillo et al. Rev Clin Esp 1984;173: 125-7
	Rabau et al. Dig Dis Sci 1980;25:314-5
	McKelvey et al. J Infect 1991; 22:296-7

bajas, por lo que su empleo ha quedado restringido a zonas con pocos recursos económicos⁴⁴.

En la actualidad, las técnicas serológicas utilizan material propio de microorganismos del género *Rickettsia* como antígeno. Los métodos iniciales para demostrar la reacción antígeno-anticuerpo en las rickettsiosis fueron múltiples: fijación de complemento⁴⁵, microaglutinación⁴⁶, hemaglutinación⁴⁷ o aglutinación de partículas de látex⁴⁸. Sin embargo, la complejidad técnica, la necesidad de una gran cantidad de antígeno o la detección de isótipos aislados limitaban su utilidad práctica. Por ello, se diseñaron nuevas pruebas que permiten medir tanto IgM como IgG frente a *R. typhi* (o al menos rickettsias del grupo del «tifus») con mayores sensibilidad y especificidad. Las más utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI)⁴⁹ y el enzimoinmunoanálisis⁵⁰. La técnica de referencia para el estudio de la infección y/o enfermedad por *R. typhi* es la inmunofluorescencia indirecta, apareciendo títulos diagnósticos aproximadamente a los 10 días del inicio de la fiebre. Aunque poco utilizada, se ha descrito una técnica que sustituye el método de detección final (fluorescencia) por un marcador cromático (peroxidasa)⁵¹. Finalmente, se han desarrollado técnicas que adaptan los métodos del ELISA a laboratorios con menor dotación tecnológica (Dot-ELISA)⁵². De cualquier forma, la prueba más utilizada es la inmunofluorescencia indirecta y, en menor medida, el enzimoinmunoanálisis.

Las 2 limitaciones principales de las técnicas serológicas son la necesidad de que transcurra un tiempo mínimo para la síntesis de anticuerpos (lo que disminuye su utilidad en los primeros días de la enfermedad) y las reacciones cruzadas con otras rickettsias del «grupo del tifus» (tifus epidémico y enfermedad de Brill-Zinser) así como otros microorganismos (en concreto *Legionella bozemani*)^{52,53}.

Cultivos

El método más habitual para el cultivo de rickettsias es la técnica de *shell-vial* partiendo de sangre anticoagulada con heparina⁵⁴. Habitualmente se emplean las líneas celulares Vero y XTC-2, manteniendo el cultivo a 28 y 32 °C. La identificación de las bacterias en el cultivo puede realizarse mediante métodos citoquímicos (principalmente la tinción de Giemsa o la tinción de Giménez), uso de anticuerpos (monoclonales o policlonales) o técnicas de amplificación genética de ácidos nucleicos. Si las bacterias se detectan en el *shell-vial*, se procede a la inoculación en cultivo celular convencional para la determinación de la especie.

Identificación de productos de R. typhi en material biológico del hospedador

La detección de antígenos de *R. typhi* se ha empleado principalmente en estudios histopatológicos retrospectivos. El empleo de diferentes protocolos ha permitido también la detección de ADN y ARN de *R. typhi* obtenido de diferentes muestras biológicas, aunque su aplicación clínica ha sido muy limitada.

Situación actual del diagnóstico del tifus endémico

El diagnóstico de las 2 formas principales de tifus endémico (infección por *R. typhi* o por *R. felis*) no está establecido en la actualidad. En primer lugar, es preciso que los datos epidemiológicos, clínicos y biológicos hagan sospechar la presencia de esta enfermedad. En segundo lugar, el diagnóstico en fases iniciales precisa del empleo de métodos directos (reacción en cadena de la polimerasa o cultivo) disponibles sólo en centros muy especializados. Por otro lado, el empleo de pruebas indirectas frente a *R. typhi* no es una técnica habitual en los laboratorios clínicos en España, lo que limita el diagnóstico de esta rickettsiosis. El diagnóstico de la infección por *R. felis*, aunque posible por el desarrollo de anticuerpos monoclonales y cebadores específicos para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa sólo puede de realizarse en laboratorios de referencia⁵⁵.

Tratamiento

El tratamiento del tifus endémico en la mayor parte de los casos es muy simple, ya que ambas bacterias (*R. typhi* y *R. felis*) son sensibles a varios antimicrobianos y la respuesta es muy rápida. En ambos casos, el fármaco de elección es la doxiciclina en dosis convencionales. Las quinolonas constituyen un fármaco alternativo^{55,56}, aunque ya se han detectado cepas resistentes a este grupo⁵⁷. La sensibilidad de ambas especies también incluye la rifampicina, el cloranfenicol y la telitromicina^{55,56,58}. Ambas especies son resistentes a los betalactámicos, aminoglucósidos y cotrimoxazol. La sensibilidad a los macrólidos es diferente en *R. typhi* y *R. felis*, lo que traduce su diferente situación taxonómica. Así, *R. typhi* es sensible a los macrólidos, especialmente a josamicina, lo que supone una alternativa útil en el tratamiento de niños y mujeres embarazadas, mientras que *R. felis* es resistente a este grupo farmacológico.

No existen estudios comparativos acerca de la duración del tratamiento. En general se recomienda que sea de 5 días, aunque presumiblemente una menor duración (incluso una dosis única) pueda ser igualmente eficaz.

Comentario final

El objetivo de este artículo es recordar a la comunidad científica española la existencia de esta entidad y sus características epidemiológicas, patogénicas, clínicas, diagnósticas y terapéuticas. La existencia de casos clínicos autóctonos (Comunidad Andaluza y Comunidad Canaria) y la documentación de infección (por estudios serológicos) en Salamanca y Madrid indican que esta rickettsiosis presenta una difusión en España mayor que la comunicada en la actualidad. Por ello, el acceso a métodos diagnósticos más rápidos, fiables y específicos facilitará el diagnóstico de los casos clínicos y ayudará en los estudios epidemiológicos.

En segundo lugar, un número importante de los españoles que viajan al extranjero eligen como destino zonas en las que el tifus murino es endémico (p. ej., Grecia, México, Indonesia o países de África Occidental). Aunque el riesgo es bajo en general, esta posibilidad debe descartarse en casos concretos de enfermedad importada.

Finalmente, todas las enfermedades producidas por rickettsiales comportan un riesgo potencial como elementos en el bioterrorismo, pues se puede modificar su estructura y resistencia a los antimicrobianos mediante la tecnología existente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- U.S. Army Medical Department. Disponible en: <http://history.amedd.army.mil/booksdocs/itsfirst50yrs/section1.1.htm>
- Science News Online. Disponible en: <http://www.sciencednews.org/20010224/timeline.asp>
- Gutiérrez-Ravé V, Luque R. Tifus murino, una causa frecuente de síndrome febril de media evolución. An Med Intern (Madrid) 1986;3:461-2.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1997;10:694-719.
- Azad AF. Epidemiology of murine typhus. Annu Rev Entomol 1990; 35:553-569
- Azad AF, Radulovic S, Higgins JA, Noden BH, Troyer JM. Flea-borne rickettsiae: ecological considerations. Emerg Infect Dis 1997;3:319-27.
- Raoult D, Scola BL, Enea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, et al. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. Emerg Infect Dis 2001;7:73-81
- Márquez FJ, Munain MA, Pérez JM, Pachón J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. Emerg Infect Dis 2002;8:89-91
- Andersson SG, Stothard DR, Fuerst P, Kurland CG. Molecular phylogeny and rearrangement of rRNA genes in *Rickettsia* species. Mol Biol Evol 1999;16:987-95.
- Fang R, Raoult D. Antigenic classification of *Rickettsia felis* by using monoclonal and polyclonal antibodies. Clin Diagn Lab Immunol. 2003;10:221-8.
- Roux V, Raoult D. Genotypic identification and phylogenetic analysis of the spotted fever group rickettsiae by pulsed-field gel electrophoresis. J Bacteriol 1993;175:4895-904.
- Gikas A, Doukakis S, Pediaditis J, Kastanakis S, Psaroulaki A, Tselenitis Y. Murine typhus in Greece: epidemiological, clinical and therapeutic data from 83 cases. Trans Roy Soc Trop Med Hygiene 2002;96:250-3.
- Silpajakul K, Chayakul P, Krisanapan S. Murine typhus in Thailand: clinical features, diagnosis and treatment. Q J Med 1993;86:43-7.
- Alcaino HA, Gorman TR, Alcaino R. Flea species from dogs in three cities of Chile. Vet Parasitol 2002;105:261-5.
- Noden BH, Radulovic S, Higgins JA, Azad AF. Molecular identification of *Rickettsia typhi* and *R. felis* in co-infected *Ctenocephalides felis* (*Siphonaptera: Pulicidae*). J Med Entomol 1998;35:410-4.
- Azad AF, Traub R, Baqar S. Transovarial transmission of murine typhus rickettsiae in *Xenopsylla cheopis* fleas. Science 1985;227:543-5.
- Azad AF, Sacci JB Jr, Nelson WM, Dasch GA, Schmidtman ET, Carl M. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:43-6.
- Dupont HT, Brouqui P, Faugeron B, Raoult D. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, and *Rickettsia typhi* in seven African countries. Clin Infect Dis 1995;21:1126-33.
- Dumler JS, Taylor JP, Walker DH. Clinical and laboratory features of murine typhus in south Texas, 1980 through 1987. JAMA 1991;266:1365-70.
- Fergie JE, Purcell K, Wanat D. Murine typhus in South Texas children. Pediatr Infect Dis J 2000;19:535-8.
- Whiteford SF, Taylor JP, Dumler JS. Clinical, laboratory, and epidemiologic features of murine typhus in 97 Texas children. Arch Pediatr Adolesc Med 2001;155:396-400.
- Acuña-Soto R, Calderón-Romero L, Romero-López D, Bravo-Lindoro A. Murine typhus in Mexico City. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000;94:45.
- Duffy PE, Le Guillouzic H, Gass RF, Innis BL. Murine typhus identified as a major cause of febrile illness in a camp for displaced Khmers in Thailand. Am J Trop Med Hyg 1990;43:520-6.
- Ong KY, Tambyah PA, Ooi S, Kumarasinghe G, Chow C. Endemic typhus in Singapore- A re-emerging infectious disease? Singapore Med J 2001; 42:549-52.
- O'Connor LF, Kelly HA, Lubich JM, Lindsey RJ, McComish MJ. A cluster of murine typhus cases in Western Australia. Med J Aust 1996;165:24-6.
- Bernabeu-Wittel M, Pachón J, Alarcón A, López-Cortés LF, Viciana P, Jiménez-Mejías ME, et al. Murine typhus as a common cause of fever of intermediate duration. A 17-year study in the south of Spain. Arch Intern Med 1999;159:872-6.
- Míguez M, Laynez P, Linares M, Hayek M, Abella L, Marañez I. Tifus murino en Tenerife. Estudio clínicoepidemiológico y características clínicas diferenciales con la fiebre Q. Med Clin (Barc) 2003;121:613-5.
- Hernández-Cabrera M, Angel-Moreno A, Santana E, Bolaños M, Francés A, Martín-Sánchez AM, et al. Murine typhus with renal involvement in Canary Islands (Spain). [en prensa]. Emerg Infect Dis 2004.
- Parola P, Vogelaars D, Roure C, Janbon F, Raoult D. Murine typhus in travelers returning from Indonesia. Emerg Infect Dis 1998;4:677-80.
- Groen J, Nur YA, Dolmans W, Ligthelm RJ, Osterhaus AD. Scrub and murine typhus among Dutch travellers. Infection 1999;27:291-2.
- Gray GC, Rodier GR, Matras-Maslin VC, Honein MA, Ismail EA, Botros BA, et al. Serologic evidence of respiratory and rickettsial infections among Somali refugees. Am J Trop Med Hyg 1995;52:349-53.

32. Zavala-Velázquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sánchez-Elias RA, Becerra-Carmona G, Walker DH. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. Lancet 2000;356:1079-80.
33. Oliveira RP, Galvao MA, Mafra CL, Chamone CB, Calic SB, Silva SU, et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. Emerg Infect Dis 2002;8:317-9.
34. Richter J, Fournier PE, Petridou J, Haussinger D, Raoult D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. Emerg Infect Dis 2002;8:207-8.
35. Parola P, Miller RS, McDaniel P, Telford SR, Rolain JM, Wongsrichanalai C, Raoult D. Emerging rickettsioses of the Thai-Myanmar border. Emerg Infect Dis 2003;9:592-5.
36. Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. Ann N Y Acad Sci 2003;990:1-11.
37. Radulovic S, Price PW, Beier MS, Gaywee J, Macaluso A, Azad A. *Rickettsia*-macrophage interactions: host cell responses to *Rickettsia akari* and *Rickettsia typhi*. Infect Immun 2002;70:2576-82.
38. Valbuena G, Feng HM, Walker DH. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. Microbes Infect 2002;4:625-33.
39. Azad AF, Radulovic S. Pathogenic rickettsiae as bioterrorism agents. Ann N Y Acad Sci. 2003;990:734-8.
40. Shaked Y, Shpilberg O, Samra Y. Involvement of the kidneys in Mediterranean spotted fever and murine typhus. Q J Med 1994;87:103-7.
41. Rosenthal T, Michaeli D. Murine typhus and spotted fever in Israel in the seventies. Infection 1977;5:82-4.
42. Whelton A, Douglas JV, Elisberg BI. Acute renal failure complicating rickettsial infection in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient individuals. Ann Intern Med 1968;69:323-8.
43. Silpapojakul K, Mitarnun W, Ovatlarnporn B, Chamroonkul N, Khow-Ean U. Liver involvement in murine typhus. QJM 1996;89:623-9.
44. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. J Clin Microbiol 1997;35:2715-2727.
45. Hersey DF, Colvin MC, Shepard CC. Studies on the serologic diagnosis of murine typhus and Rocky Mountain spotted fever. J Immunol 1957;79:409-5.
46. Fiset P, Ormsbee RA, Silberman R, Peacock M, Spielman MH. A microagglutination technique for detection and measurement of rickettsial antibodies. Acta Virol 1969;13:60-6.
47. Chang RS, Murria ES, Zinder JC. Erythrocyte-sensitizing substances from rickettsiae of the Rocky Mountain spotted fever group. J Immunol 1954;73:8-15.
48. Hechmy KE, Anacker RL, Philip RN, Kleeman KT, MacCormack JN, Sasowski SJ, et al. Detection of Rocky Mountain spotted fever antibodies by a latex agglutination test. J Clin Microbiol 1980;12:144-50.
49. Philip RN, Casper EA, Ormsbee RA, Peacock MG, Burgdorfer W. Microimmunofluorescence test for the serological study of Rocky Mountain spotted fever and typhus. J Clin Microbiol 1976;3:51-61.
50. Halle S, Dasch GA, Weiss E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against typhus rickettsiae, *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi*. J Clin Microbiol 1977;6:101-0.
51. Kelly DJ, Wong PW, Gan E, Lewis GE. Comparative evaluation of the indirect immunoperoxidase test for the serodiagnosis of rickettsial disease. Am J Trop Med Hyg 1988; 38:400-6
52. Kelly DJ, Chan CT, Paxton K, Thompson K, Howard R, Dasch GA. Comparative evaluation of a commercial enzyme immunoassay for the detection of human antibody to *Rickettsia typhi*. Clin Diag Lab Immunol 1995; 2:356-60.
53. Sompolinsky D, Boldur I, Goldwasser RA, Kahana H, Kazak R, Keysary A, et al. Serological cross-reactions between *Rickettsia typhi*, *Proteus vulgaris* OX19, and *Legionella bozemani* in a series of febrile patients. Isr J Med Sci 1986;22:745-52.
54. Vestris G, Rolain JM, Fournier PE, Birg ML, Enea M, Patrice JY, et al. Seven years' experience of isolation of *Rickettsia* sp. from clinical specimens using the shell vial cell culture assay. Ann NY Acad Sci 2003; 990:371-4.
55. Rolain JM, Stuhl L, Maurin M, Raoult D. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2747-5.
56. Rolain JM, Maurin M, Vestris G, Raoult D. *In vitro* susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:1537-41.
57. Laferl H, Fournier PE, Seiberl G, Pichler H, Raoult D. Murine typhus poorly responsive to ciprofloxacin: a case report. J Travel Med 2002;9:103-4.
58. Rolain JM, Maurin M, Bryskier A, Raoult D. *In vitro* activities of telithromycin (HMR 3647) against *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazekii*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, *Bartonella bacilliformis*, and *Ehrlichia chaffeensis*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1391-3.

CONCLUSIONES

- La infección por *Rickettsia felis* y, probablemente por *Rickettsia massiliae*, son responsables de fiebre de duración intermedia en Gran Canaria en un número importante de casos. Sin embargo, no hemos encontrado evidencia de que la infección por *Anaplasma phagocytophilum* desempeñe un papel en este síndrome.

- Se han aislado en muestras humanas y animales silvestres en Gran Canaria tres genotipos diferentes de *Coxiella burnetii* (IV, VII y VIII), todos ellos *adaA* negativos.

- La seroprevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en el archipiélago canario oscila entre el 13,2% (Fuerteventura) y el 32,5% (Lanzarote). Específicamente en Gran Canaria un 23,3% de la población presenta evidencia serológica de esta infección.

- La seroprevalencia de infección por *Rickettsia typhi* en el archipiélago canario oscila entre un 1,5% (Gran Canaria) y 19,2% (La Gomera).

- Existe una elevada prevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en la cabaña ganadera en Gran Canaria afectando a un 60,4% de caprinos, 31,7% de ovinos y 12,2% de vacunos estudiados.

- En Canarias, el ciclo de *Coxiella burnetii* es principalmente peridoméstico, más que silvestre. Por otro lado, los micromamíferos constituyen un importante reservorio de *Rickettsia* spp en nuestra área y las garrapatas desempeñan un papel importante en la transmisión a humanos y animales.

- La detección de material genético mediante PCR de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia* spp en suero es útil en el diagnóstico etiológico precoz en casos de fiebre de duración intermedia.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Nosología del síndrome de fiebre prolongada**
- Figura 2. Matadero de Old Cannon Hill (Brisbane).**
- Figura 3. Autores de la descripción de fiebre Q e identificación de *Coxiella burnetii*.**
- Figura 4. Taxonomía clásica de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia typhi*.**
- Figura 5. Taxonomía actual de *Coxiella burnetii* y *Rickettsia typhi*.**
- Figura 6. Variedades morfológicas de *Coxiella burnetii*.**
- Figura 7. Ciclo doméstico y silvestre de la infección por *Coxiella burnetii*.**
- Figura 8. Formas de transmisión de *Coxiella burnetii* al ser humano.**
- Figura 9. Patrones epidemiológicos de la infección por *Coxiella burnetii*.**
- Figura 10. Provincias españolas con series publicadas de fiebre Q.**
- Figura 11. Provincias españolas con datos seroepidemiológicos de infección por *Coxiella burnetii*.**
- Figura 12. Estudios de infección por *Coxiella burnetii* en animales.**
- Figura 13. Estudios de infección por *Coxiella burnetii* en humanos en África.**
- Figura 14. Estudios de infección por *Coxiella burnetii* en humanos en América.**
- Figura 15. Estudios de infección por *Coxiella burnetii* en humanos en Asia.**
- Figura 16. Afectación histopatológica en la fiebre Q aguda.**
- Figura 17. Afectación histopatológica en la fiebre Q crónica.**
- Figura 18. Entrada de *Coxiella burnetii* en los macrófagos alveolares.**
- Figura 19. Relación entre la patogenia y la evolución de la infección por *Coxiella burnetii*.**
- **Figura 20. Neumonía redonda en un paciente con fiebre Q.**
 - **Figura 21. Lesiones cutáneas en un paciente con fiebre Q.**
 - **Figura 22. Infarto esplénico en un paciente con fiebre Q.**
 - **Figura 23. Patogenia del tifus murino.**
 - **Figura 24. Lesiones clínicas en pacientes con tifus murino.**

INDICE DE TABLAS

- Tabla I.** Diferencias entre fiebre e hipertermia.
- Tabla II.** Series de fiebre de duración intermedia en España.
- Tabla III.** Plásmidos de *Coxiella burnetii*
- Tabla IV.** Grupos genómicos iniciales de *Coxiella burnetii*
- Tabla V.** Grupos genómicos actuales de *Coxiella burnetii*
- Tabla VI.** Serie de casos publicados de fiebre Q en España desde 1980 hasta la actualidad.
- Tabla VII.** Estudios de seroprevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en humanos.
- Tabla VIII.** Estudios de seroprevalencia de infección por *Coxiella burnetii* en mamíferos en España.
- Tabla IX.** Estudios de infección por *Coxiella burnetii* en garrapatas en España.
- Tabla X.** Estudios de infección por *Coxiella burnetii* en humanos en África.
- Tabla XI.** Estudios en cultivos celulares de *Coxiella burnetii*.
- Tabla XII.** Criterios y diagnóstico de endocarditis por fiebre Q.
- Tabla XIII.** Puntos de corte propuestos para el diagnóstico de fiebre Q.
- Tabla XIV.** Estudios seroepidemiológicos de *Rickettsia typhi*
- Tabla XV.** Características epidemiológicas de series de casos de tifus murino.
- Tabla XVI.** Serie de casos de tifus murino en España.
- Tabla XVII.** Manifestaciones clínicas del tifus murino.
- Tabla XVIII.** Datos complementarios de los casos de tifus murino.

