

Informe anual Proyecto I+D y T

ESTUDIO DE LA INFECCION POR *COXIELLA BURNETII* EN
EXPLOTACIONES DE VACUNO LECHERO. EFECTO DE LA
VACUNACION EN LA REDUCCION DE LA ELIMINACION
BACTERIANA Y EN LA DISMINUCION DE LA CONTAMINACION
AMBIENTAL

Cliente: Dirección de Innovación e
Industrias Alimentarias. DMAPTAP.
Gobierno Vasco

Contacto Neiker:	Contacto Cliente:
Ana L. García-Pérez agarcia@neiker.net 94 4034312	Luis Javier Tellería lj-telleria@ej-gv.es 94 501 63 14

Estudio de la infección por *Coxiella burnetii* en explotaciones de vacuno lechero. Efecto de la vacunación en la reducción de la eliminación bacteriana y en la disminución de la contaminación ambiental

El **objetivo general** del proyecto es valorar la importancia, prevalencia y distribución de la infección por *Coxiella burnetii* en ganado vacuno de leche, y los efectos que ocasiona en la producción. La importancia de la fiebre Q en la especie bovina no se había estudiado en profundidad hasta el momento de comenzar este proyecto ya que siempre se ha asociado la infección por *C. burnetii* en la CAPV con las especies ovina y caprina.

OBJETIVO 1. Estudio epidemiológico para conocer la distribución de la fiebre Q en ganado vacuno lechero en la zona norte, mediante el análisis de muestras de leche de tanque

Se ha estudiado la totalidad de las explotaciones de ganado vacuno lechero de Bizkaia. Se han tomado muestras de leche de tanque (LT) y se han analizado mediante técnicas moleculares y serológicas. Son muestras representativas de la explotación y permiten estimar si la infección puede estar presente en la explotación bovina. Se ha seleccionado el territorio de Bizkaia, porque datos recientes de casos de enfermedad declarados en humana muestran una alta incidencia (8 casos por cada 100.000 habitantes). Se visitaron un total 178 explotaciones de ganado bovino lechero entre los meses de septiembre 2009 y marzo de 2010, y se tomó una muestra de 100ml de LT y 15 sueros de animales tomados al azar: 5 animales >6 meses y <1 año, 5 animales de 1-2 años y 5 animales >2 años, haciendo un total de 2692 sueros. Para el estudio de la presencia de anticuerpos en LT, se ha utilizado el kit de ELISA (LSI, Francia) que establece diferentes niveles de positividad en función del nivel de anticuerpos en suero lácteo, clasificando las muestras en negativas y en 3 clases de positividad (+, ++ y +++). En general se detectaron anticuerpos en el suero lácteo en el 66.9% de explotaciones, estando el 31.5% valoradas como positivas + y el 35.4% como positivas ++. Ninguna de estas explotaciones mostró el máximo de positividad (+++) que detecta el kit. Tras analizar las muestras de suero mediante ELISA, la relación entre los valores del ELISA en LT y la seroprevalencia media en los animales de la explotación fue positiva y estadísticamente significativa ($R^2=0.21$, $P<0.001$) (Figura 1).

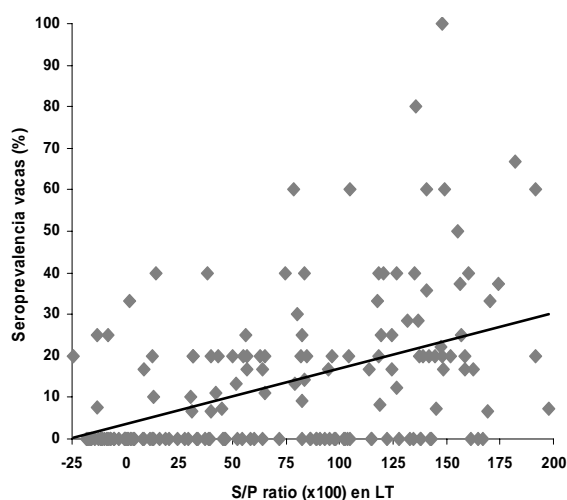


Figura 1. Representación de la correlación observada entre los valores de ELISA en LT y la seroprevalencia media en las vacas adultas

En las explotaciones cuya muestra de LT fue negativa a anticuerpos, la seroprevalencia media en los individuos analizados fue del 3.5%. Las explotaciones con LT positiva (+) mostraron una seroprevalencia media en los animales del 11.7% y finalmente la seroprevalencia media en animales de las explotaciones positivas (++) fue del 22.9%. En la Figura 2 se representa gráficamente esta distribución.

Cuando las muestras de LT se analizaron mediante PCR se detectó DNA de *C. burnetii* en el 51.4% de las muestras. Las explotaciones con muestras de LT PCR positivo y ELISA positivo mostraron un nivel medio de seroprevalencia significativamente más elevado ($9.1 \pm 1.1\%$) que las explotaciones con LT negativas a ambas técnicas ($2.6 \pm 0.8\%$) ($F=16.3$, $df=1$, $P<0.001$).

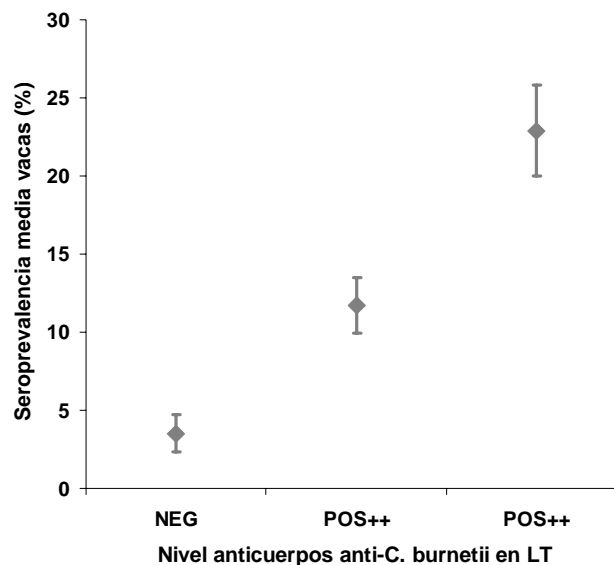


Figura 2. Seroprevalencia media en en las vacas adultas en relación con el nivel de positividad obtenido en ELISA de LT

Los resultados de este objetivo han demostrado que *C. burnetii* está ampliamente distribuida en las explotaciones de ganado vacuno de leche de Bizkaia. Además se ha comprobado que el análisis de leche de tanque (LT) mediante ELISA tiene un gran valor para hacer una primera estimación de la presencia de *C. burnetii* a nivel de población. A nivel de explotación individual se ha observado una correlación significativa pero baja con el nivel de seroprevalencia en los animales. Una de las pegas del análisis del análisis serológico a partir de LT es que las infecciones introducidas recientemente en la explotación pueden no ser detectadas en LT por ELISA debido a la baja prevalencia de animales infectados. Sin embargo, el ELISA aplicado a leches de tanque es un método económico, y que puede ser aplicado en estudios epidemiológicos para conocer la situación en una determinada zona o región, o incluso para plantear programas de erradicación en ganado lechero, tal y como se han venido planteando los programas de erradicación de BVD en algunos países nórdicos.

Para más información, los resultados de esta parte del proyecto se han publicado en: Astobiza et al., 2012. INDIVIDUAL BACTERIAL SHEDDING AND SEROPREVALENCE IN DAIRY CATTLE HERDS WITH *COXIELLA BURNETII* POSITIVE BULK-TANK MILK. Journal of Dairy Science, 65: 1632-1638.

OBJETIVO 2. Vacunación frente la fiebre Q en explotaciones infectadas naturalmente

Para realizar el ensayo del efecto de la vacunación se solicitaron los permisos oportunos tanto al Servicio de Ganadería de la Diputación Foral de Bizkaia para vacunar un máximo de 4 explotaciones bovinas, así como a la Agencia Española del Medicamento para importar las dosis oportunas de la vacuna Coxevac, que en el momento de comenzar el estudio no estaba comercializada en España. La búsqueda de posibles explotaciones afectadas se centró en aquellas explotaciones del estudio anterior que tuvieron positividad en LT por PCR y ELISA y una alta seroprevalencia en animales. Finalmente se ha trabajado con 3 explotaciones, que se analizaron en su totalidad y al final solo se confirmó la infección activa por fiebre Q en una de las 3 explotaciones. La explotación incluida en el plan de vacunación tiene un total de 300 cabezas. En mayo de 2011 comenzamos el plan de vacunación que consistió en aplicar la vacuna en fase I Coxevac (Ceva) a todos los animales mayores de 3 meses no gestantes. Como muchas de las vacas estaban gestantes al comienzo del estudio y no pudieron ser vacunadas por estar gestantes, el protocolo ha consistido en acudir cada mes a la explotación y vacunar y revacunar los animales que cumplían con los requisitos anteriormente mencionados, es decir, los terneros que habían cumplido los 3 meses de edad, y las vacas recién paridas, que eran vacunadas antes de una nueva inseminación. El efecto de la vacunación se ha valorado a través de la realización de muestreos mensuales evaluando la aparición de nuevas infecciones en los animales, y analizando el índice de seroconversión (animales que pasaban de seronegativos a seropositivos), mediante la toma de fluidos vaginales de animales recién paridos y de sueros, respectivamente. Tras un año de vacunación se ha detectado que entre un 5.6% y 14% de vacas y/o novillas eran excretoras de *C. burnetii* en el momento del parto a través de los fluidos vaginales. Esta positividad se ha mantenido hasta febrero de 2012, momento en el cual los resultados se han negativizado. En este periodo se ha observado también seroconversión en el 11% de los animales que eran seronegativos antes de la vacunación. Todavía es pronto para evaluar el efecto de la vacunación, ya que tal y como hemos podido comprobar en los estudios de vacunación realizados en la especie ovina, los efectos de la vacunación frente a fiebre Q se obtienen a medio-largo plazo, por ello pretendemos mantener el programa de vacunación en la explotación bovina seleccionada durante un mínimo de 2 años.

OBJETIVO 3. Caracterización molecular de las cepas bovinas, y comparación con las cepas obtenidas en el ganado ovino y caprino de la CAPV.

Se seleccionaron 45 muestras de diferente origen, bovino, ovino y caprino, que habían resultado positivas a la presencia de DNA de *C. burnetii* para su genotipado mediante las técnicas MLVA y MST. Los análisis se analizaron en el Canisius Wilhelmina Hospital de Nijmegen (Holanda), en colaboración con los Dres. Tilburg y Klaassen. En total, se han detectado 11 genotipos de *C. burnetii* diferentes mediante el uso de la técnica MLVA, siendo de interés el hecho de que algunos de estos genotipos no habían sido descritos previamente en estas especies en Europa. Se pudieron observar diferencias de genotipos entre zonas geográficas, y diferencias entre especies animales, si bien algunos genotipos identificados fueron comunes en las 3 especies de rumiantes investigadas. En el ganado vacuno presentó la mayor variabilidad, ya que se identificaron 8 genotipos diferentes. Comparando estos genotipos con los descritos previamente en un estudio de genotipado de leches bovinas recogidas por toda Europa, se observó que algunos de los genotipos detectados en la CAPV ya se habían detectado previamente en otros países europeos, pero otros eran nuevas descripciones. En cabras se

identificaron 3 genotipos. Fue interesante comprobar que estos genotipos eran diferentes a los encontrados en el gran brote de fiebre Q de Holanda (2007-2010), en el que el ganado caprino fue la principal especie implicada en el origen del brote. Entre los genotipos identificados en el ganado ovino, se observaron 4 genotipos predominantes. Uno de los genotipos correspondía a un genotipo nuevo.

Con la técnica MST se encontraron un total de 4 genotipos diferentes que ya habían sido escritos previamente en Europa, 3 genotipos en muestras caprinas, 2 en muestras bovinas y 2 en muestras ovinas. Uno de los genotipos, el genotipo MST-13, se detectó en las tres especies animales. Este método de genotipado parece tener menos poder discriminatorio que la técnica MLVA que ha diferenciado 11 genotipos diferentes.

En resumen se ha comprobado que existe una gran variabilidad en los genotipos de las cepas de *Coxiella* presentes en la CAPV. Hay que analizar un mayor número de muestras y compararlas con las cepas detectadas en humana, para poder confirmar cuales son las especies animales reservorios de la infección.

OBJETIVO 4. Muestreo medioambiental para la detección de *C. burnetii* en explotaciones de riesgo

En la explotación vacunada se han tomado muestras de purín mensualmente, y algunos de los meses en los que se ha detectado la presencia de *C. burnetii* en fluidos vaginales de vacas recién paridas la muestra de purín también ha sido positiva. En el momento del inicio del plan de vacunación también detectamos aerosoles positivos en la zona de la paridera, y también se detectó la presencia de *C. burnetii* en diferentes superficies de la explotación. Una vez transcurrido un año de vacunación, los resultados de las muestras medioambientales son negativos. Son resultados preliminares muy interesantes, que indican un descenso de la contaminación ambiental tras el inicio del plan de control de fiebre Q. Paralelamente, se está siguiendo la contaminación ambiental en 97 explotaciones analizadas en el Objetivo 1, y se detectado la presencia de DNA de *C. burnetii* en el polvo de las superficies en el 22% de las explotaciones.