

Informe final 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 (Acrónimo:
VACUCOX)**

INIA (RTA2009-00017) cofinanciado

Contacto Neiker:

Ana L. García-Pérez
agarcia@neiker.net
94 4034312

Contacto Cliente:

INIA
secsgpcp@inia.es
91 3473920

Ref. NEIKER: 72.0237.0

Ejercicio: 2014

Ref. DMAPTAP:

Fecha:

Acrónimo: VACUCOX

Título: 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

Jefe de proyecto: García-Pérez, Ana L.

Email: agarcia@neiker.eus

Clasificación del proyecto:

Unidad de negocio: Innovación Agraria

Departamento: Sanidad Animal

Campos de aplicación: Bioseguridad

Área estratégica: Ganadería

Línea: Epidemiología

Tipo de proyecto: Estratégico cofinanciado con INIA

Origen: NEIKER

Palabras clave:

Objeto: Fiebre Q

Aspecto: Vacunación, PCR, ELISA

Finalidad: Control zoonosis

Objetivo: El **objetivo general** de esta propuesta 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.

Objetivos específicos: OBJETIVO 1. estudio epidemiológico de la fiebre Q en ganado vacuno lechero en la zona norte. OBJETIVO 2. Plan de control de la fiebre Q en ganado bovino lechero. OBJETIVO 3. Muestreo medioambiental para la detección de *C. burnetii* en explotaciones de riesgo

Duración: 3 años y 9 meses (proyecto abierto hasta finales 2014)

Fecha de inicio: 19/10/2009

Fecha final: 31/12/2014

www.neiker.net

1. Equipo participante de NEIKER - Tecnalia

Participantes de NEIKER - Tecnalia

+ Jefe de Proyecto: Dra. ANA L. GARCÍA-PÉREZ

+ Otros participantes:

Dra. ANA HURTADO ESGUEVA

Dr. JESUS FELIX BARANDIKA IZA

Dña. INÉS POVEDANO FERNANDEZ

D. ALVARO PIÑERO SALIDO

Dña. IANIRE ASTOBIZA PÉREZ

Otras entidades participantes o colaboradoras

2. Informe sobre las actividades más destacadas de la investigación en el proyecto y resultados obtenidos

Incluir en este apartado

+ Actividades más destacadas por objetivo

+ Otros resultados obtenidos (si es necesario)

Informe técnico

El **objetivo general** de esta propuesta ha sido valorar la prevalencia de la infección por *Coxiella burnetii* en ganado vacuno de leche, y su potencial importancia como causa de fallo reproductivo. Esta especie, segunda en importancia según los censos de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) no se había estudiado en profundidad ya que siempre se ha asociado la infección a las especies ovina y caprina. En el proyecto se han estudiado todas las explotaciones de Bizkaia mediante un estudio serológico y molecular para el estudio de la presencia de anticuerpos y DNA de *C. burnetii*, respectivamente, en muestras de leches de tanque, y se ha complementado con la toma de muestras de suero a un porcentaje de animales de cada explotación investigada. De esta forma se ha analizado la correspondencia entre la presencia o ausencia de anticuerpos/DNA *C. burnetii* en leche de tanque y el nivel de seroprevalencia en la explotación (**objetivo 1**), lo que nos ha permitido extraer conclusiones a la hora de interpretar los resultados y considerar qué explotaciones podrían tener una infección activa por fiebre Q o no en función de las tasas de seroprevalencia. En una segunda fase, se ha pretendido seleccionar explotaciones candidatas a padecer una infección activa por fiebre Q, con objeto de establecer un plan de control basado en la vacunación. La vacuna utilizada es una vacuna inactivada en fase I y que en el momento de comenzar el estudio no estaba comercializada en España, por lo que se importó previa autorización de la Agencia Española del Medicamento. Antes de establecer la estrategia de vacunación se analizaron 3 explotaciones en su totalidad y solo una mostró problemas reproductivos asociados a positividad de *C. burnetii*. El éxito del plan de control se ha valorado a lo largo de dos años en términos de reducción de la tasa de eliminación bacteriana en la población animal y en el entorno de la explotación (**objetivo 2**). Finalmente, también se ha evaluado el riesgo de contaminación aerógena que supone una explotación positiva a *C. burnetii* para la población humana, analizando la carga bacteriana en los aerosoles generados dentro y en el entorno de las explotaciones positivas a lo largo de dos años de vacunación, así como el riesgo medioambiental asociado a la utilización de los purines generados en la explotación (**objetivo 3**). Otra investigación complementaria planteada en el proyecto era el estudio de los genotipos

de *C. burnetii* presentes en las explotaciones de ganado vacuno lechero y compararlos con los existentes en los pequeños rumiantes, para estudiar así si las cepas de *C. burnetii* presentes en la CAPV son compartidas entre las diferentes especies de rumiantes domésticos. El objetivo final de este proyecto ha sido extraer conclusiones para la toma de posibles medidas de bioseguridad y disminuir los riesgos de infección para la especie humana.

El proyecto se ha desarrollado tal y como se planteó en un inicio, sin cambios de objetivos. La prórroga solicitada de 9 meses ha tenido como motivo el dar cobertura y prolongar la financiación del trabajo de laboratorio del becario predoctoral INIA, Alvaro Piñero Salido, que tiene beca vigente hasta el 1 de septiembre de 2014. Su tesis doctoral ha tenido como base este proyecto, y la ha defendido el 20 de noviembre de 2014 ante el tribunal, en la Facultad de Medicina y Odontología de la EHU-UPV, con calificación Sobresaliente *cum laude*.

OBJETIVO 1. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DE LA FIEBRE Q EN GANADO VACUNO LECHERO EN LA ZONA NORTE

1.1. - Evaluación de la prevalencia de *C. burnetii* en las explotaciones de bovino lechero

Se han analizado muestras de leche de tanque de la totalidad de las explotaciones de ganado vacuno lechero de Bizkaia mediante técnicas moleculares y serológicas. El análisis de este tipo de muestras permite realizar estudios epidemiológicos a gran escala. Se ha seleccionado la provincia de Bizkaia, porque datos recientes de fiebre Q declarados en humana muestran una alta incidencia en este territorio (8 casos por cada 100.000 habitantes).

Las muestras de leche de tanque (LT) son muestras representativas de la explotación que permiten estimar si la infección está presente en la explotación. 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, contabilizando un total de 2692 sueros recogidos. El kit de ELISA (LSI, Francia) utilizado establece el nivel de positividad de la muestra de LT en función del nivel de anticuerpos en suero lácteo (ratio S/P), 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 (S/P ratio x 100) en LT y la seroprevalencia media en la explotación fue positiva y estadísticamente significativa ($R^2=0.18$, $P<0.001$) (**Figura 1.A**). El nivel de anticuerpos en LT presentó una mejor relación con el nivel de seroprevalencia de las hembras adultas, ($R^2=0.21$, $P<0.001$) (**Figura 1.B**).

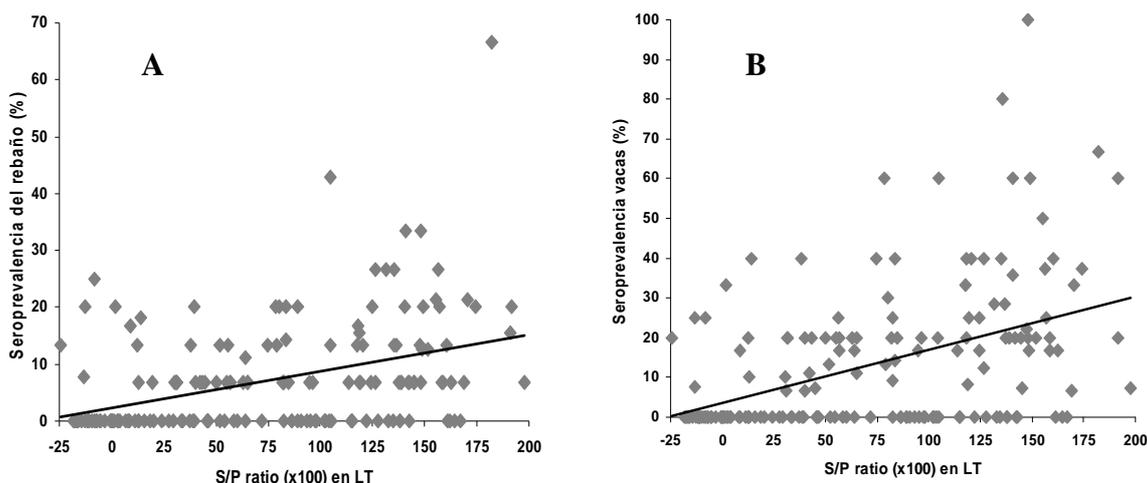


Figura 1. Representación de la correlación observada entre los valores de ELISA en LT y la seroprevalencia media en la explotación (A) y en las vacas adultas (B)

En las explotaciones cuya muestra de LT fue negativa a anticuerpos, la seroprevalencia media en los individuos analizados fue del 2.6%, siendo del 3.5% en las vacas adultas. Las explotaciones con LT positiva (+) mostraron una seroprevalencia media en los animales del

5.8% (11.7% en vacas), y finalmente la seroprevalencia media en animales de las explotaciones positivas (++) fue del 11.6% (22.9% en vacas). En la **Figura 2** se representa gráficamente esta distribución.

Cuando las muestras de LT de bovino lechero 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 ($2.6 \pm 0.8\%$) ($F=16.3$, $df=1$, $P<0.001$).

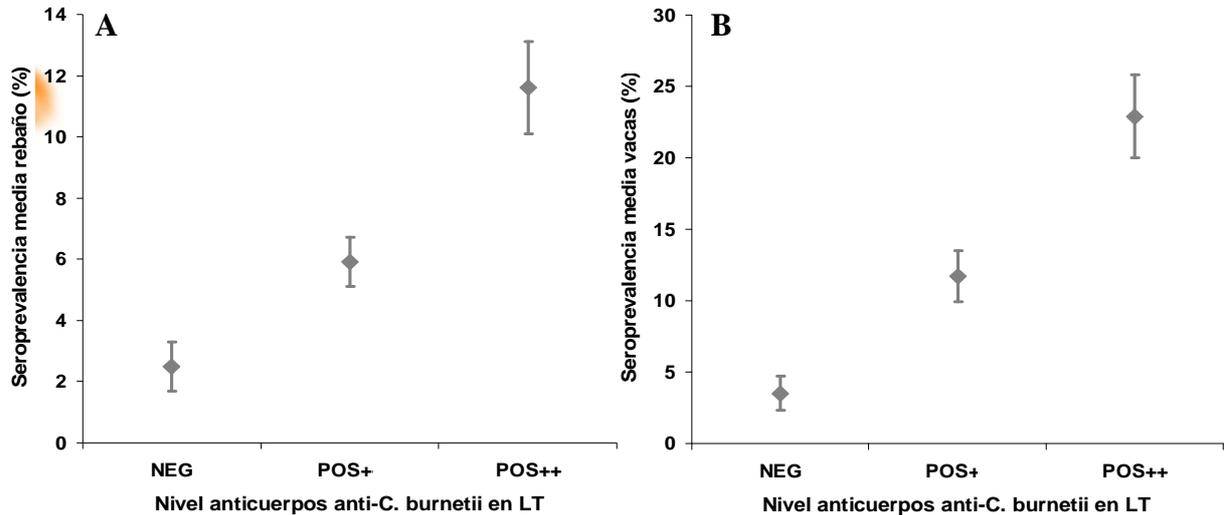


Figura 2. Seroprevalencia media en la explotación (A) y en las vacas adultas (B) en relación con el nivel de positividad obtenido en ELISA de LT

La técnica de PCR a tiempo real permite la cuantificación de la carga bacteriana. Tras una selección de muestras con distintos niveles de positividad con ELISA, se procesaron mediante PCR a tiempo real utilizando un kit comercial (LSI, Francia). La **Figura 3** representa la correlación positiva y significativa observada entre el nivel de anticuerpos en suero de LT de bovino mediante ELISA y la cuantificación bacteriana estimada mediante PCR a tiempo real ($R^2=0.31$, $P<0.0001$).

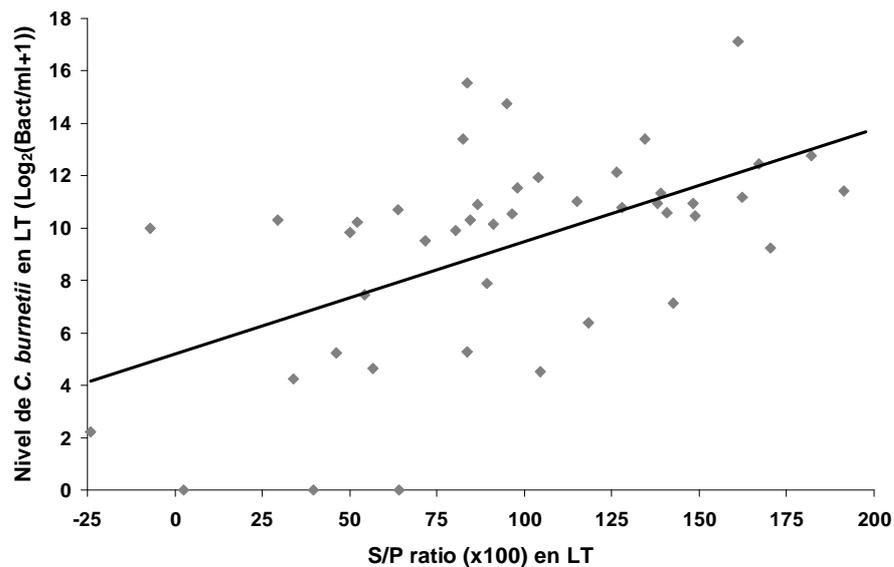


Figura 3. Correlación entre los valores de ELISA en LT y la cuantificación bacteriana estimada mediante PCR a tiempo real

En vista de estos resultados se puede decir que *C. burnetii* está ampliamente distribuida en las

explotaciones de ganado vacuno de leche. El análisis de LT mediante ELISA tiene un gran valor para hacer una primera estimación de la presencia de *C. burnetii* en la explotación, ya que existe una correlación significativa con el nivel de anticuerpos y con la carga bacteriana, si bien debe de considerarse 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.

Con los resultados de esta parte del proyecto hemos realizado la publicación por Astobiza et al., "INDIVIDUAL BACTERIAL SHEDDING AND SEROPREVALENCE IN DAIRY CATTLE HERDS WITH COXIELLA BURNETII POSITIVE BULK-TANK MILK" publicada en *Journal of Dairy Science*, 94: 1632-1638. 2012.

1.2. - Estudiar y valorar el efecto de la coxiellosis en la producción bovina, mediante un análisis retrospectivo de los historiales productivos de las explotaciones estudiadas

Para el desarrollo de esta parte del proyecto se solicitó permiso a los ganaderos incluidos en este estudio para disponer de los datos reproductivos de sus explotaciones, con objeto de comprobar la relación de los resultados reproductivos con la seroprevalencia observada frente a *C. burnetii*. Los trámites se realizaron a través de BIFE (Asociación de ganado frisón de Bizkaia) y de la cooperativa de ganaderos de Karrantza, donde se concentra la mayor parte de explotaciones de Bizkaia. Tanto unos datos como los otros no tenían la suficiente calidad, y el análisis no ha proporcionado resultados y conclusiones dignas de mención. Este hecho junto con el componente multifactorial que tienen los problemas reproductivos en ganado vacuno, hace muy difícil la valoración del efecto de *Coxiella*, sin tener en cuenta otras múltiples variables sanitarias y de manejo.

OBJETIVO 2. VACUNACION

2.1 – Selección de explotaciones

La búsqueda de posibles explotaciones afectadas por *C. burnetii* para llevar a cabo el ensayo de la vacunación se centró en aquellas explotaciones ELISA y PCR positivas en el estudio detallado en el punto 1.1 y además, con altas tasas de seroprevalencia individual. Se realizó una preselección y se realizó una visita a sus propietarios para explicar los objetivos del estudio. En unos casos se obtuvo su negativa a participar debido al desánimo reinante en el sector por la crisis, en otros casos se excluyeron por el tipo de manejo realizado en la cría de las novillas en centros de recría externos (aspecto no deseable para evaluar el efecto de la vacunación), y en otros, los ganaderos se habían acogido al cese para el próximo año.

Así que inicialmente se pudo contar con 2 explotaciones de Bizkaia que se analizaron en su totalidad. Dichas explotaciones (Explotaciones 1 y 2) habían mostrado LT positiva en ELISA (++) y PCR en el estudio anterior, y seroprevalencias entre el 13 y 26%. De cada una de ellas se tomaron de nuevo muestras de LT para su análisis mediante ELISA y PCR, así como leches individuales (de vacas en lactación) y heces de todos los animales, para el estudio de la presencia de DNA de *C. burnetii* mediante PCR, y muestras de sangre (suero) para el estudio de la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii* mediante ELISA. Posteriormente se sumó al estudio una tercera explotación de Cataluña, con 4% de abortos, leche de tanque positiva y presencia de DNA de *C. burnetii* en fluidos vaginales de vacas problemáticas, tomando el mismo tipo de muestras para su análisis.

La extracción de DNA de las muestras individuales de leche y heces, y LT se realizó empleando BioSprint 96 DNA Blood Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. En aquellas muestras cuyo resultado de PCR fue positivo se cuantificó la carga bacteriana empleando un kit comercial de PCR cuantitativa (qPCR) (LSI Taq Vet *Coxiella burnetii*, Lissieu, France), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se trata de una qPCR dúplex que incluye

un par de primers cuya diana es la región repetitiva transposon-like de *C. burnetii*, y una segunda pareja de primers para el gen house-keeping (GADPH), utilizado como control interno de amplificación. Los resultados se expresaron como el logaritmo del número de *coxiellas* por ml (log Cox/ml).

En la **Tabla 1** se observa el resumen de los resultados obtenidos en cada explotación. El análisis de la LT de la explotación 1 en la primera fase del ensayo resultó positivo para PCR y ELISA (POS+++); y se obtuvo un valor en la qPCR de 4,99 (log Cox/ml). En los 15 sueros analizados se observó un 26.7% (4/15) de seroprevalencia. Un año más tarde el resultado de la PCR para la LT seguía siendo positiva y el nivel de anticuerpos determinado por ELISA había aumentado con respecto al año anterior (POS+++). Sin embargo, al llevar a cabo el análisis de todos los animales de la explotación se observó una disminución en la seroprevalencia, con el 10,6% (5/47) de animales seropositivos. La cuantificación de *C.burnetii* en la LT por qPCR fue de 4,85 (log Cox/ml), siendo valores similares a los del año anterior. Estos resultados sugerían que a pesar del elevado ratio S/P obtenido en el ELISA de la LT (+++), la infección no se había extendido por la explotación puesto que la seroprevalencia media disminuyó en un año y la eliminación bacteriana en leche se había mantenido al mismo nivel, indicando que no había un problema activo de fiebre Q, por lo que se descartó su participación en el estudio de vacunación.

Expl	Muestras & análisis	Resultados	
		1er muestreo	2º muestreo
1	Censo al muestreo (V/N) *	50 (44/6)	47 (35/12)
	Fecha muestreo	08/Oct/2009	13/Dic/2010
	BTM PCR	Pos	Pos
	BTM ELISA†	++	+++
	% Seroprevalencia (pos/anal)	26.7 (4/15)	10.6 (5/47)
	% Seroconversion (pos/anal)§	NA	0.0 (0/10)
2	Censo al muestreo (V/N)	120 (70/30)	112 (72/40)
	Fecha muestreo	06/Oct/2009	22/Nov/2010
	BTM PCR	Pos (débil)	Pos
	BTM ELISA†	++	+++
	% Seroprevalencia (pos/anal)	13.3 (2/15)	11.6 (13/112)
	% Seroconversion (pos/anal)	NA	0.0 (0/13)
3	Censo al muestreo (V/N)	253 (170/83)	252 (181/71)
	Fecha muestreo	27/Ene/2011	10/Mar/2011
	BTM PCR	Pos	Pos
	BTM ELISA†	NH	++
	% Seroprevalencia (pos/anal)	23.5 (4/17)	29.0 (73/252)
	% Seroconversion (pos/anal)	NA	11.7% (2/17)

Tabla 1. Evolución de los resultados de ELISA y PCR en leche de tanque, seroprevalencia individual y seroconversión en las 3 explotaciones preseleccionadas para la vacunación.

NA= No aplicable; NH= No hecho; * Número de vacas (V) y novillas (N); † S/P ratios ≤ 30 negativo; ratios > 30 positivo. Resultados de BTM ELISA por categorías según ratios: negativo (-), positivo débil (+), positivo (++) , positivo alto (+++); § Valores respecto al anterior muestreo

La explotación 2 mostró presencia moderada de anticuerpos frente a *C.burnetii* en la LT en la primera fase del ensayo (ELISA, ++). En PCR se obtuvo un resultado positivo débil, y resultados negativos en qPCR. En los 15 sueros analizados se observó 13,3% (2/15) de seroprevalencia. Un año más tarde el nivel de anticuerpos determinado por ELISA había aumentado con respecto a la primera fase (POS+++), pero de nuevo al analizar todos los animales de la explotación se observó una disminución en la seroprevalencia, con sólo un 11,6% (13/112) de animales seropositivos. El resultado de la PCR y de la qPCR (4,41 log

Cox/ml) para la LT fue positivo, lo que sugería una progresión de la infección dentro de la explotación durante el último año. Sin embargo la ausencia de seroconversión y la baja seroprevalencia, hicieron que descartásemos la participación de esta explotación.

En enero de 2011 se detectó un caso de fiebre Q en una explotación de ganado vacuno lechero (explotación 3) de 252 animales, localizada en Cataluña. En los análisis iniciales se observó una seroprevalencia del 23,52% (4/17) en las muestras de suero y resultado positivo en PCR en el 81,82% (9/11) de los hisopos vaginales analizados. Posteriormente se tomaron muestras de la totalidad de animales, suero, heces y leche a los animales en ordeño, así como una muestra de LT. El nivel de anticuerpos en LT determinado por ELISA fue clasificado como positivo moderado (POS++). Al evaluar la situación de todos los animales que integraban la explotación, se observó que la seroprevalencia era similar a la obtenida en la primera estimación, con un 28,97% (73/252) de animales ELISA positivo. El resultado de la PCR convencional para la LT fue positivo y la concentración de bacterias cuantificadas por qPCR fue de 2,52 (log Cox/ml). La seroprevalencia en torno al 30% y la presencia de *C. burnetii* en fluidos vaginales confirmó la presencia de fiebre Q en la explotación y el ganadero accedió a participar en el programa de vacunación.

Para entender mejor lo expuesto con anterioridad, en la **tabla 2** se muestra el patrón de seropositividad por rango de edades, en la totalidad de individuos de las 3 explotaciones. Los análisis individuales realizados en suero y leche se llevaron a cabo mediante ELISA y PCR respectivamente. Se puede comprobar como el estatus de la infección por *C. burnetii* es diferente en cada explotación. Llama la atención que en la explotación 3 hay un 39% de animales de 1-2 años con anticuerpos, lo que confirma la existencia de una infección reciente y activa en la explotación. En las explotaciones 1 y 2 por el contrario, las seroprevalencias más altas se encuentran en los animales con edades comprendidas entre los 4 y los 7 años, siendo los animales jóvenes seronegativos. En el caso de la explotación 1 es el grupo de animales de 6 años el que muestra una seroprevalencia más alta (50.0%). En la explotación 2 se observa en los animales de 7 años (50,0%), aunque también es destacable el caso de los animales de 4 años, con un 46,15%.

Respecto a los animales eliminadores de *C. burnetii* a través de la leche, las tres explotaciones muestran resultados similares. Así, en la explotación 1 el porcentaje de eliminadores fue del 11,5% (3/26), mientras que en las explotaciones 2 y 3 se observó un 9,1% (6/66) y un 8,97% (14/156) respectivamente. Tal y como aparece en la **tabla 2**, resulta llamativo que mientras que en la explotación 1 no hay animales jóvenes (de 1 a 3 años) eliminadores, en las explotaciones 2 y 3 sí que aparecen, sugiriendo que también en la explotación 2 podría haber también una infección reciente y activa, en el momento del segundo muestreo.

La **tabla 3** se centra en más detalle en la respuesta serológica de los 23 animales eliminadores de *C. burnetii* en leche. Se puede observar información detallada de cada uno de ellos: edad, carga bacteriana en leche (en log Cox/ ml) y su resultado de ELISA expresado por el ratio S/Px100. El 52,17% (12/23) muestran un título de anticuerpos elevado. Este hecho, sumado a la tasa de eliminación bacteriana que muestran (>3 log Cox/ ml) les hace sospechosos de ser animales “súper-eliminadores”. La presencia de estos súper-eliminadores puede incrementar el valor S/P de la LT sobreestimando así la posible extensión de la infección por *C. burnetii* en la explotación. Por el contrario, el 26,08% (6/23) de los eliminadores no presentó anticuerpos, lo que podría llevar a la situación opuesta. Por lo tanto, un único análisis de LT por ELISA, o por PCR/ qPCR que tenga un resultado positivo requiere de la toma de diferentes tipos de muestras.

	Edad (años)	ELISA (suero)	PCR (leche)
		%Seroprevalencia (Pos/anal.)	%Eliminadores* (Pos/anal.)
Expl 1	<1.0	0.0 (0/4)	NA
	1.0-2.0	0.0 (0/8)	NA
	2.1-3.0	0.0 (0/5)	0.0 (0/2)
	3.1-4.0	0.0 (0/7)	0.0 (0/7)
	4.1-5.0	16.7 (1/6)	20.0 (1/5)
	5.1-6.0	20.0 (1/5)	50.0 (2/4)
	6.1-7.0	50.0 (2/4)	0.0 (0/4)
	>7.0	0.0 (0/4)	NA
Expl 2	<1.0	0.0 (0/17)	NA
	1.0-2.0	0.0 (0/24)	0.0 (0/3)
	2.1-3.0	0.0 (0/21)	5.9 (1/17)
	3.1-4.0	5.9 (1/17)	11.8 (2/17)
	4.1-5.0	50.0 (6/12)	30.0 (3/10)
	5.1-6.0	26.7 (4/15)	0.0 (0/14)
	6.1-7.0	25.0 (1/4)	0.0 (0/3)
	>7.0	50.0 (1/2)	0.0 (0/2)
Expl 3	<1.0	0.0 (0/22)	NA
	1.0-2.0	33.9 (18/53)	0.0 (0/1)
	2.1-3.0	42.2 (19/45)	6.1 (2/33)
	3.1-4.0	6.3 (2/32)	0.0 (0/30)
	4.1-5.0	25.0 (11/44)	7.5 (3/40)
	5.1-6.0	32.1 (9/28)	11.5 (3/26)
	6.1-7.0	52.6 (10/19)	35.3 (6/17)
	>7.0	44.4 (4/9)	0.0 (0/9)

Tabla 2. Seroprevalencia individual y porcentaje de animales eliminadores a través de la leche por grupos de edad; NA= No aplicable

En resumen, esta parte del estudio previo a la vacunación nos ha permitido concluir que el análisis de la leche de tanque es una herramienta epidemiológica óptima a nivel de población, pero a nivel de explotación es conveniente llevar a cabo otros análisis adicionales, con el fin de evaluar la presencia y distribución real de *C. burnetii*. Así se ha observado que ratios S/P elevados (+++) en LT no se corresponden con seroprevalencias elevadas a nivel de explotación ya que las tres explotaciones han mostrado seroprevalencias de 10,6%; 11,6% y 28,97%, y bajas prevalencias de animales eliminadores de *C. burnetii* en leche, 11,5%; 9,1%; 8,97%. La presencia de los animales súper-eliminadores influye notablemente sobre los resultados de la LT, de manera que la distribución potencial de *C. burnetii* en una explotación podría estar sobreestimada, siendo necesaria la realización de estudios complementarios.

	Animal	Edad	qPCR (log Cox/ml)	ELISA*	
				S/Px100	Interpret
Expl 1	1	4.8	3.81	286.4	POS+++
	2	5.7	4.81	247.6	POS+++
	3	5.9	1.94	-1.2	Neg
Expl 2	4	2.1	1.19	-9.3	Neg
	5	3.4	1.96	-10.2	Neg
	6	3.6	2.75	-17.4	Neg
	7	4.2	4.59	341.8	POS++++
	8	4.2	0.50	168.5	POS++
	9	4.6	4.49	334.2	POS++++
	10	2.3	1.54	25.1	Neg
Expl 3	11	2.7	1.82	130.2	POS++
	12	4.6	1.95	256.1	POS+++
	13	5.0	3.80	207.9	POS+++
	14	5.1	2.35	140.8	POS++
	15	5.2	4.22	271.7	POS+++
	16	5.2	3.33	207.7	POS+++
	17	5.6	<1.00	0.0	Neg
	18	6.6	1.74	88.1	POS+
	19	6.6	4.30	202.8	POS+++
	20	6.9	4.06	195.1	POS++
	21	6.8	4.29	285.7	POS+++
	22	6.8	2.23	212.2	POS+++
	23	6.2	4.09	192.9	POS++

Tabla 3. Resultados individuales de ELISA y PCR de los animales eliminadores de *Coxiella* a través de leche. * S/P ratios según interpretación del fabricante.

Con estos resultados hemos publicado el artículo "INDIVIDUAL BACTERIAL SHEDDING AND SEROPREVALENCE IN DAIRY CATTLE HERDS WITH COXIELLA BURNETII POSITIVE BULK-TANK MILK", por Piñero et al., *Transboundary Emerging Diseases*, 61: 163-168. 2014.

2.1 – Vacunación con la vacuna inactivada en fase I

En la explotación 3 establecimos en mayo de 2011 un plan de vacunación, vacunando y revacunando con Coxovac (Ceva). Se solicitaron los permisos oportunos locales así como a la Agencia Española del Medicamento para vacunar importando las dosis oportunas de la vacuna para un programa de dos años de duración.

Tal y como se ha comentado esta explotación había presentado unas tasas de abortos en 2010 del 4.4% y presencia de DNA de *C. burnetii* en los fluidos vaginales de vacas paridas (9/11). En marzo de 2011 se sangró la totalidad de explotación y se observó una seroprevalencia del 29%, con valores especialmente altos en el grupo de novillas (42%). También se analizó leche

individual de todas las vacas en ordeño, y las heces de todos los animales de la explotación, obteniendo un 9.0% (14/156) y 0.4% (1/252) de animales excretores de *C. burnetii* a través de leche y heces, respectivamente. El análisis de todos estos resultados indicaba la existencia de una infección reciente por *C. burnetii*.

Teniendo en cuenta la edad, el estatus reproductivo y los resultados de los análisis laboratoriales individuales de cada animal, se vacunaron todos aquellos animales mayores de 3 meses no gestantes y no infectados previamente. A partir de ese momento y a lo largo de 24 meses, en cada visita mensual a la explotación se revacunaban los animales vacunados el mes anterior, y se vacunaban los animales que habían cumplido 3 meses, así como las vacas recién paridas. Previamente se les extraía una muestra de suero para conocer el estatus de partida (presencia / ausencia de anticuerpos frente a *C. burnetii*) y, al mismo tiempo, valorar la tasa de seroconversión en relación al sangrado al inicio del estudio. Mensualmente, a todas las vacas recién paridas se les tomaban muestras de fluidos vaginales, para monitorizar la excreción de *C. burnetii*, y con este objetivo también se analizaban muestras de purines. Además se tomaba una muestra de leche de tanque (LT) para estudiar la evolución de la tasa de anticuerpos así como la tasa de excreción de *Coxiella* desde el comienzo de la vacunación. Semestralmente se recogían muestras de leche individual de todas las vacas en ordeño para el estudio de la evolución del porcentaje de animales excretores de *C. burnetii* a través de la leche; se tomaban también muestras de aire en diferentes áreas de la explotación (zona de partos, recría, etc) con un muestreador de aire Sartorius (Air-scan), así como muestras de polvo de superficies (puertas, repisas de ventanas, paredes, etc), para la detección de DNA de *C. burnetii*. La presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii* en las muestras de suero sanguíneo y suero lácteo se investigó mediante ELISA (LSIVET Ruminant Milk/Serum Q Fever kit; Laboratoire Service International, Lissieu, France). Las muestras de leche, hisopos vaginales, y muestras medioambientales fueron sometidas a extracción de DNA y PCR (Berri et al., 2000).

- Evolución de la tasa de anticuerpos y de la excreción bacteriana en leche de tanque (LT)

En la **Figura 4** se observa que la cinética de los anticuerpos en leche de tanque desde el comienzo de la vacunación en abril de 2011. El incremento inicial (abril –septiembre 2011) es probable que se deba a que el grueso de animales fue vacunado y revacunado al comenzar el estudio, por lo tanto hubo un incremento de anticuerpos vacunales en los animales, detectados en el suero lácteo mediante ELISA. A continuación se observó un descenso que podría explicarse por la desaparición progresiva de los anticuerpos vacunales en los animales vacunados inicialmente, hasta que se produce una estabilización en el nivel de anticuerpos que se mantiene hasta el final del estudio.

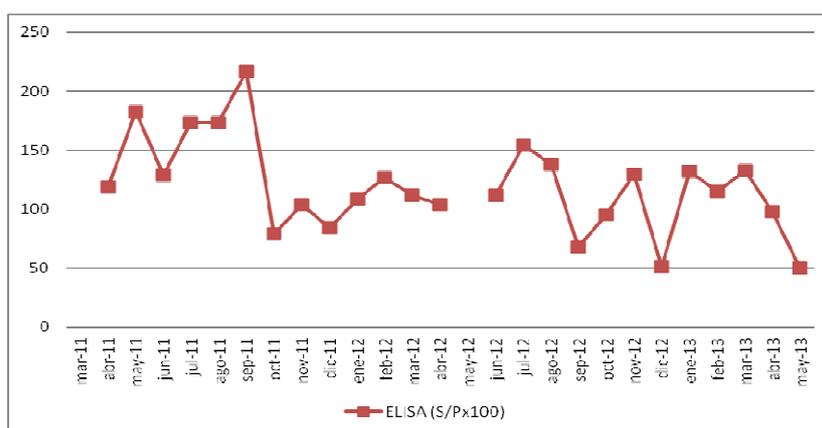


Figura 4. Evolución de las tasas de anticuerpos en LT a lo largo del estudio

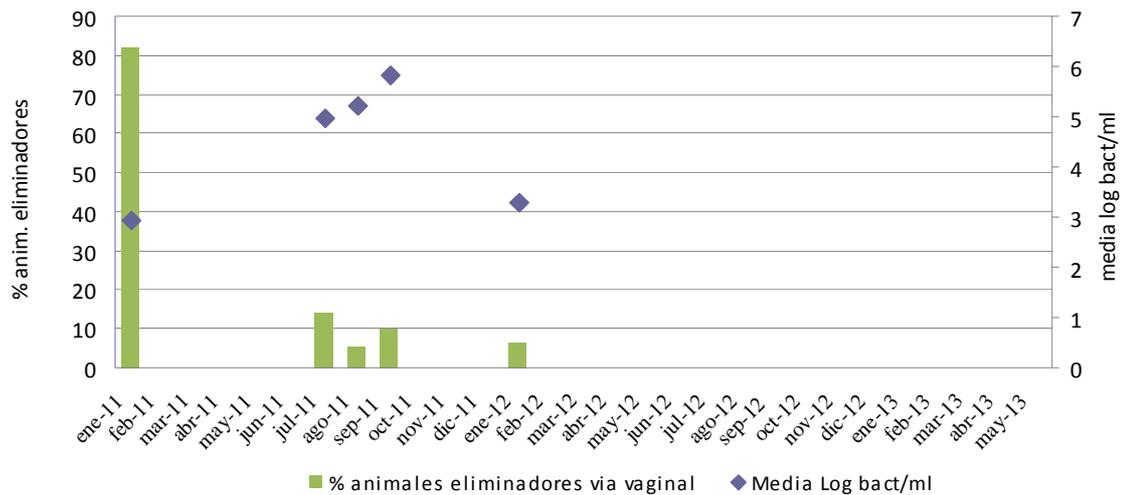


Figura 7. Evolución del porcentaje de vacas eliminadoras de *C. burnetii* por vía vaginal

Grupo de edad	N	% eliminadores vaginal
vacas	147	6 (4,1%)
1er Parto	47	3 (6,4%)
2º Parto	31	2 (6,5%)
>3 Parto	69	1 (1,4%)

Tabla 4. Distribución por edades de las vacas excretoras de *C. burnetii* por vía vaginal

- Evolución de la excreción bacteriana a través de la leche

Se han tomado muestras de leche individual a todos los animales en ordeño cada 6 meses con objeto de evaluar la evolución de los animales secretoras de *C. burnetii* a través de la leche. En el primer muestreo (marzo 2011) se analizaron leches individuales de 156 vacas, y en un 9.0% de animales se detectó DNA de *C. burnetii*. En el segundo muestreo (octubre 2011) se muestrearon 139 animales y un 7.9% de las vacas excretaban la bacteria a través de la leche. En abril de 2012 se observó un descenso, con un 3.5% de animales excretoras, y en octubre de 2012 la tasa aumentó ligeramente (5%). En general, se observa una tendencia descendente en el número de animales excretoras a lo largo del estudio (**Figura 8**), con un total de 20 vacas excretoras, la mayoría vacas de más de 2 partos (**Tabla 5**). En el muestreo de abril de 2013 el porcentaje de excretoras disminuyó considerablemente respecto a los valores iniciales del estudio 2 años antes.

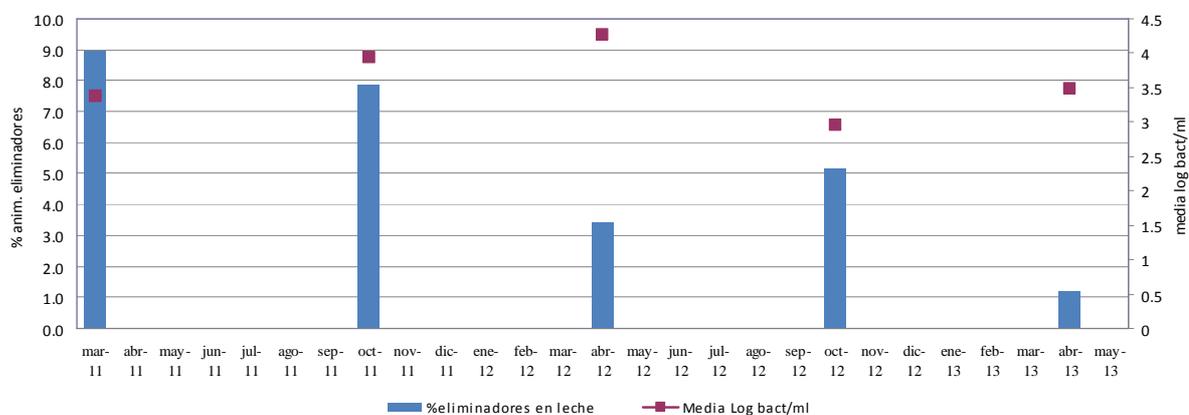


Figura 8. Evolución del porcentaje de vacas excretoras de *C. burnetii* a través de la leche (columna azul) y cuantificación media de bacterias en leche (cuadrado marrón)

Grupo de edad	N	% eliminadores en leche
Vacas	233	20 (8,6%)
1er Parto	69	1 (1,4%)
2º Parto	49	2 (4,1%)
3er Parto	100	17 (17%)

Tabla 5. Distribución de las vacas excretoras de *C. burnetii* en leche, por grupos de edad

- Evolución de la seroconversión en animales no vacunados presentes en la explotación

Antes de vacunar se les tomaba a los animales una muestra de suero para el estudio de anticuerpos y comprobar la tasa de seroconversión (indicador de un contacto reciente con la bacteria) respecto al sangrado inicial. Así, durante el primer año de vacunación se detectó seroconversión en 12 animales que al inicio del estudio eran negativos (8.3%, 12/145) (**Figura 9**). La mayoría de estos animales eran de 1º y 2º parto más susceptibles a la infección que las vacas adultas (**Tabla 6**). Durante el segundo año de vacunación, con casi todo el efectivo de animales vacunado, no se observó seroconversión.

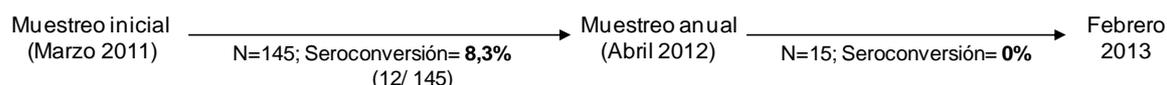


Figura 9. Resumen del número de animales que experimentó seroconversión durante el primer y segundo año del programa de vacunación.

Grupo de edad	N	% Animales que seroconvierten
Vacas	145	12 (8,3%)
1er Parto	48	6 (12,5%)
2º Parto	30	3 (10%)
≥3er Parto	67	3 (4,5%)

Tabla 6. Distribución de las vacas que experimentaron seroconversión, por grupos de edad

- Eficacia de la vacunación en animales susceptibles y no infectados

Para evaluar el papel protector de la vacuna se seleccionaron aquellos animales que en el momento de la primera vacunación eran negativos por ambas técnicas diagnósticas, ELISA (suero) y PCR (leche, heces). Se vacunaron y revacunaron antes de la inseminación y una vez que parieron se tomaron muestras de fluidos vaginales y de leche, y en ningún caso se detectaron animales excretoras (**Tabla 7**), lo que sugiere un papel protector de la vacuna frente a la infección.

Grupo de edad vacunación	%eliminadores via vaginal tras el parto		%eliminadores leche tras el parto	
	N	N	N	N
Terneras	36	0	6	0
novillas	16	0	15	0
vacas	58	0	84	0

Tabla 7. Eficacia de la vacuna: Estudio de la excreción en aquellos animales que se vacunaron estando no infectados (ELISA y PCR negativo)

- Resultados productivos a lo largo del estudio

Se recopilaron los datos productivos de la explotación del periodo 2009 y 2012, y en la **Figura 10** se observa la progresión de diferentes parámetros productivos en dicho periodo, tales como la fertilidad en vacas y novillas, el porcentaje de abortos, el porcentaje de retenciones de placenta y la producción de litros de leche por vaca presente y año. Se observa una tendencia ascendente en la fertilidad y en la producción de leche, y una estabilización del porcentaje de abortos, en torno al 4%. Debido a que en la reproducción intervienen muchos factores, no se puede concluir que la mejora de los parámetros productivos sea consecuencia del programa de vacunación frente a *C. burnetii*. Es necesario hacer más estudios para sacar conclusiones al respecto.

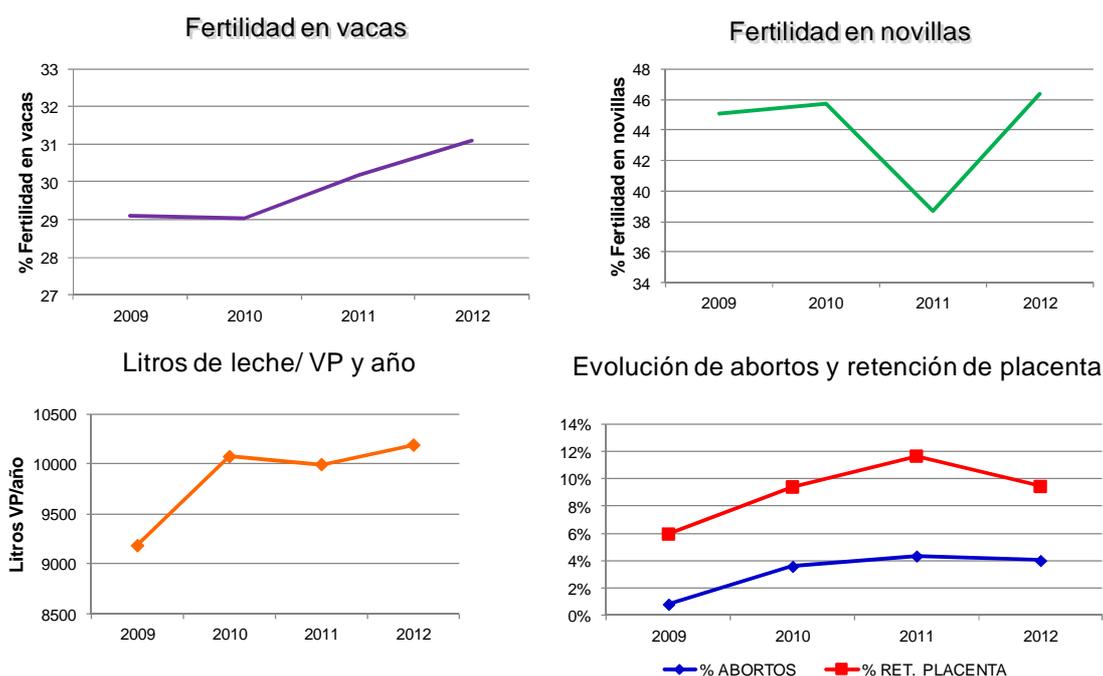


Figura 10. Evolución de los parámetros productivos en el periodo 2009-2012.

En resumen, a partir del segundo año de vacunación, no se detectó seroconversión en animales no vacunados, se observó un descenso del porcentaje de animales secretores, lo que tuvo un efecto directo en el descenso de la excreción bacteriana a través de la leche. Sin embargo, las muestras de purín recogidas entre agosto y noviembre de 2012 fueron positivas a la presencia de DNA de *Coxiella* lo que sugiere que todavía, en ese momento, la bacteria estaba presente en la explotación. Por todo ello, la vacunación de fiebre Q hay que plantearla a medio-largo plazo, haciendo especial hincapié en la vacunación de los animales jóvenes a partir de 3 meses de edad, y aplicando dosis de recuerdo anuales. Tal y como se ha detallado, la vacunación cuando se aplica a animales no infectados previamente, parece ofrecer una buena protección, ya que las terneras, novillas y vacas que se vacunaron en estas condiciones, y tras el parto, no se observó excreción bacteriana ni por vía vaginal ni a través de la leche en ninguno de estos animales.

Con estos resultados se ha elaborado el manuscrito "PROGRESSION OF *COXIELLA BURNETII* INFECTION AFTER IMPLEMENTING A TWO-YEAR VACCINATION PROGRAM IN A NATURALLY INFECTED DAIRY CATTLE HERD " por Piñero et al., que se ha publicado en *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56: 47. 2014

2.3 - Caracterización molecular de las cepas bovinas

Para diferenciar y caracterizar los aislados de *C. burnetii* se han utilizado dos métodos que no precisan cultivar la muestra previamente: la técnica MST (multispacer sequence typing) y el método MLVA (Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis). La técnica MST está basada en la secuenciación de diferentes regiones intergénicas que permite separar los aislados según los diferentes tipos de secuencias que muestran en las diferentes regiones. Así Glazunova et al. (2005) tras seleccionar las 10 regiones intergénicas que mostraron más variabilidad entre las 68 regiones analizadas, observaron que los 173 aislados analizados mostraban 30 genotipos diferentes y que se podían agrupar en 3 grandes grupos.

El método MLVA permite la detección de los polimorfismos en las secuencias repetidas en tándem en el ADN. Se han descrito un total de 17 marcadores diferentes para las repeticiones de minisatélites y microsatélites. Con estos marcadores se han podido diferenciar varios genotipos diferentes de *C. burnetii*. Esta técnica está siendo la más usada actualmente como método de tipificación. A pesar de que tanto la técnica MST como la MLVA tienen un alto poder discriminatorio, la técnica MLVA es superior al MST (Arricau-Bouvery y cols. 2006) y menos laboriosa ya que no es necesario secuenciar, haciendo que esta técnica sea más robusta, simple y que el intercambio de datos sea más fácil y sin errores. Debido a estas razones se eligieron estas dos técnicas para genotipar diferentes tipos de muestras de diferente origen, ganado bovino, caprino y ovino, de la Comunidad Autónoma Vasca y de otras procedencias geográficas para observar los diferentes genotipos que se pueden encontrar en la Península Ibérica entre los rumiantes domésticos. En la **Tabla 8** se detallan las diferentes muestras analizadas: Se analizaron un total de 45 muestras por MLVA, que se llevó a cabo siguiendo las pautas descritas previamente, analizando 6 de los 17 loci descritos previamente por Arricau-Bouvery et al. (2006). Para la técnica de MST, se analizaron un total de 15 muestras analizando 8 regiones diferentes del genoma de *C. burnetii* descritos por Glazunova et al., 2005.

Expto*	Localiz	Año	Problemas reproductivos	Tipo de muestra
C1	AL	2010	Aborto	1 Placenta
C2	BI	2010	Aborto	1 Placenta
C3	TO	2010	Aborto	1 Placenta
C4	ZA	2005	Aborto	1 Placenta
V1	GI	2011	infertilidad, Aborto	3 fluido vaginal, 2 leches individuales, 1 aerosol
V2	BI	2010	infertilidad	1 LT, 2 leches individuales
V3	BI	2010	infertilidad	2 leches individuales
V4	BI	2011	Aborto, infertilidad	1 fluido vaginal
V5	NA	2011	infertilidad	1 leche individual
V6	CA	2011	Metritis, infertilidad	1 LT
V7	LU	2011	Aborto, infertilidad	1 leche individual
V8	BI	2009	No	1 LT
V9	BI	2009	No	1 LT
V10	BI	2010	No	1 LT
V11	BI	2009	No	1 LT
V12	BI	2009	Metritis	1 LT
O1	AL	2004	Aborto	1 Placenta
O2	SS	2007-09	Aborto	1 fluido vaginal, 1 leche individual, 2 heces, 2 aerosoles
O3	SS	2008-11	Aborto	3 fluidos vaginales, 1 placenta, 1 aerosol
O4	SS	2008-11	Aborto	2 fluidos vaginales, 1 aerosol, 2 muestras de polvo
O5	SS	2008-11	Aborto	1 fluido vaginal, 1 heces, 1 aerosol, 1 muestra polvo

Tabla 8. Selección de muestras analizadas mediante las técnicas MST y MLVA. * C=caprino, O=ovino; V=vacuno; LT= leche de tanque

El número de genotipos obtenidos con la técnica de MLVA se muestra en la **Tabla 9**. Se obtuvieron genotipos que no habían sido descritos previamente tanto en las muestras de cabras como en las de vacas y ovejas. Se pudo observar que dependiendo la región geográfica se obtenía, en la mayoría de los casos, un genotipo diferente. En cuanto a los genotipos encontrados en cabras, de las 4 muestras analizadas, se obtuvieron 3 genotipos diferentes, indicando una alta variabilidad de genotipos entre el ganado caprino, si se comparaba con los resultados obtenidos en el ganado vacuno y ovino. Además, los genotipos encontrados entre el ganado caprino eran diferentes a los encontrados en los brotes de fiebre Q de Holanda. En relación a los genotipos encontrados en el ganado vacuno, se observó que existían 2 genotipos predominantes que diferían entre ellos en un locus. Así, comparando estos genotipos a los descritos previamente en leches bovinas recogidas por toda Europa (Tilburg et al., 2011), se observaba que los genotipos detectados en este estudio, estaban extendido por toda Europa. Entre los encontrados para el ganado ovino, se observaban 2 genotipos diferentes. Uno de ellos presente en un único rebaño, correspondía a un nuevo genotipo, y el otro estaba presente en 3 rebaños diferentes. Así, el genotipo identificado en un único rebaño, podría corresponder con un genotipo de mayor virulencia, ya que los animales del rebaño presentaban unas tasas de eliminación de *C. burnetii* mayor que los de los otros tres rebaños. Además, tendría una mayor similitud con uno de los genotipos encontrados en una de las muestras caprinas. Sin embargo, estas hipótesis han de ser contrastadas en futuros estudios.

Por otra parte, en los rebaños ovinos se analizaron muestras de aerosoles y muestras medioambientales (polvo) para comprobar que el genotipo encontrado en los animales y en el ambiente era el mismo, y así se confirmó. También se comprobaron las posibles variaciones interanuales en los genotipos. En tres de los rebaños, todos los genotipos se mantuvieron año tras otro, a excepción de uno de los rebaños, en el que sí se observaron cambios.

Explo	Tipo muestra	Origen	Año	Ct	MLVA	MLVA-6					
						Ms23	Ms24	Ms27	Ms28	Ms33	Ms34
C1	placenta	Alava	2010	8.9	S	1	11	2	3	2	3
C2	placenta	Bizkaia	2010	5.4	AE	4	9	3	3	3	4
C3	placenta	Toledo	2010	10.1	T	3	9	4	5	2	2
C4	placenta	Zamora	2005	11.2	S	1	11	2	3	2	3
V1	fluido vaginal	Girona	2011	18.3	I	6	13	2	7	4	9
V1	fluido vaginal	Girona	2011	25.5	I	6	13	2	7	4	9
V1	fluido vaginal	Girona	2011	14.8	I	6	13	2	7	4	9
V1	Leche individual	Girona	2011	23.9	I	6	13	2	7	4	9
V1	Leche individual	Girona	2011	22.3	I	6	13	2	7	4	9
V1	Aerosol	Girona	2011	30.4	-	0 ³	0	0	0	0	0
V2	Leche individual	Bizkaia	2010	24.2	J	6	13	2	7	4	10
V2	Leche individual	Bizkaia	2010	31.7	Mezcla ⁴	6	? ⁵	2	?	2	?
V2	LT ²	Bizkaia	2010	26.9	J	6	13	2	7	4	10
V3	Leche individual	Bizkaia	2010	28.0	J	6	13	2	7	4	10
V3	Leche individual	Bizkaia	2010	23.4	J	6	13	2	7	4	10
V4	fluido vaginal	Bizkaia	2011	34.2	Parcial	0	13	0	0	0	3
V5	Leche individual	Navarra	2011	27.7	I	6	13	2	7	4	9
V6	LT	Cantabria	2011	25.9	AC	6	15	2	7	4	12
V7	Leche individual	Lugo	2011	31.7	AD	6	11	2	3	4	3
V8	LT	Bizkaia	2009	25.2	S	1	11	2	3	2	3
V9	LT	Bizkaia	2009	26.1	AB	6	13	2	7	4	12
V10	LT	Bizkaia	2010	23.7	-	0	0	0	0	0	0
V11	LT	Bizkaia	2009	27.3	I	6	13	2	7	4	9
V12	LT	Bizkaia	2009	28.6	M	6	13	2	7	4	11
Sh1	placenta	Alava	2004	6.4	T	3	9	4	5	2	2
O2	fluido vaginal	Gipuzkoa	2007	10.8	AA	3	9	5	5	2	2
O2	Faeces	Gipuzkoa	2007	16.0	AA	3	9	5	5	2	2
O2	Faeces	Gipuzkoa	2007	27.0	AA	3	9	5	5	2	2
O2	Leche individual	Gipuzkoa	2007	28.8	AA	3	9	5	5	2	2
O2	Aerosol	Gipuzkoa	2008	31.6	Z	1	11	2	3	2	2
O2	Aerosol	Gipuzkoa	2009	30.0	Parcial	9	0	5	3	0	4
O3	fluido vaginal	Gipuzkoa	2008	6.3	S	1	11	2	3	2	3
O3	fluido vaginal	Gipuzkoa	2008	10.8	S	1	11	2	3	2	3
O3	fluido vaginal	Gipuzkoa	2009	27.9	S	1	11	2	3	2	3

O3	Placenta	Gipuzkoa	2010	30.0	S	1	11	2	3	2	3
O3	Aerosol	Gipuzkoa	2011	32.8	S	1	11	2	3	2	3
O4	fluido vaginal	Gipuzkoa	2008	12.6	S	1	11	2	3	2	3
O4	fluido vaginal	Gipuzkoa	2008	25.0	Parcial	4	11	0	3	0	0
O4	Aerosol	Gipuzkoa	2008	28.2	S	1	11	2	3	2	3
O4	Polvo	Gipuzkoa	2011	32.6	S	1	11	2	3	2	3
O4	Polvo	Gipuzkoa	2011	30.9	-	0	0	0	0	0	0
O5	fluido vaginal	Gipuzkoa	2008	7.1	-	0	0	0	0	0	0
O5	Heces	Gipuzkoa	2008	28.5	S	1	11	2	3	2	3
O5	Aerosol	Gipuzkoa	2010	32.9	Parcial	0	11	0	0	0	0
O5	Polvo	Gipuzkoa	2011	29.7	Parcial	0	0	0	3	0	4

Tabla 9. Resultados de genotipado con la técnica MLVA (¹ C1-4=caprino; V1-12= vacuno de leche; O1-5= ovino.; ² LT= Leche de tanque; ³ 0= Sin resultados; ⁴ Mixed = 2 o más genotipos; ⁵ ? = Múltiples alelos por locus).

Observando los resultados obtenidos con la técnica MST (**Tabla 10**) se observó que se encontraron un total de 4 genotipos diferentes que ya habían sido escritos previamente. Así, el genotipo 13 se había descrito previamente en muestras de Francia, el genotipo 18 en Francia, Italia, Rumania, Grecia, Eslovaquia y Alemania, el genotipo 8 en Francia, España y Estados Unidos y, por último, el genotipo 20 se ha descrito en Francia, Alemania, Estados Unidos y Holanda. Este método parece tener menos poder discriminatorio, ya que mientras la técnica de MLVA ha diferenciado 11 genotipos diferentes, la técnica MST solamente ha diferenciado 4. Mediante la técnica MST se han descrito 3 genotipos diferentes para el ganado caprino (8,13 y 18), 2 para el ganado vacuno (13 y 20) y 2 para el ovino (8,13). Según estos resultados se observa que hay cepas que son compartidas por las 3 especies de rumiantes domésticos.

MST

Expt**	Muestra	Origen	Año	Ct	MLVA	MST	COX2	COX5	COX18	COX22	COX37	COX51	COX56	COX61
C1	placenta	VI	2010	8.9	S	13	3	5	1	5	4	5	5	2
C2	placenta	BI	2010	5.4	AE	18	3	8	1	3	4	7	- ¹	3
C3	placenta	TO	2010	10.1	T	8	5	4	2	1	5	3	3	4
C4	placenta	ZA	2005	11.2	S	13	3	5	1	5	4	5	5	2
V1	Leche ind	GI	2011	23.9	I	20	3	2	6	5	4	4	10	5
V2	Leche ind	BI	2010	24.2	J	20	3	2	6	5	4	4	10	5
V2	LT	BI	2010	26.9	J	20	3	2	6	5	4	4	10	5
V5	Leche ind	NA	2011	27.7	I	20*	3	2	6	5	4	4	-	5
V6	LT	S	2011	25.9	AC	20	3	2	6	5	4	4	10	5
V7	Leche ind	LU	2011	31.7	AD	13	3	5	1	5	4	5	5	2
V8	LT	BI	2009	25.2	S	13*	3	5	1	5	4	5	-	2
O1	placenta	VI	2004	6.4	T	8*	5	4	2	1	5	-	3	4
O2	Heces	SS	2007	16.0	AA	8*	5	4	2	1	5	3	-	4
O3	Moco vag	SS	2009	27.9	S	13	3	5	1	5	4	5	5	2
O4	Moco vag	SS	2008	25.0	Partial	13	3	5	1	5	4	5	5	2

Tabla 10. Genotipos de rumiantes analizados mediante dos técnicas MST y MLVA. ¹ = Sin resultado; * perfil estimado; ** C=caprino, O=ovino; V=vacuno

Con estos resultados se ha publicado el artículo "GENOTYPING OF *COXIELLA BURNETII* FROM DOMESTIC RUMINANTS IN NORTHERN SPAIN", publicado en *BMC Veterinary Research*, 8: 241.2012.

Posteriormente se han genotipado mediante MLVA un mayor número de muestras procedentes de explotaciones bovinas para tener una visión más completa de los genotipos bovinos, y de la posible evolución de éstos en una misma explotación a lo largo de 2 años. Se identificó un grupo de genotipos que afectan casi exclusivamente a esta especie, presentando algunos de ellos una elevada prevalencia (genotipos I y J), pero también genotipos relacionados con otros aislados de infecciones humanas. Así mismo se observó que generalmente en las explotaciones bovinas existía un único genotipo que se mantuvo durante el periodo de estudio. Con estos resultados se la elaborado el artículo por Piñero et al., GENETIC DIVERSITY AND

OBJETIVO 3. MUESTREO MEDIOAMBIENTAL PARA LA DETECCIÓN DE *C. BURNETII* EN EXPLOTACIONES DE RIESGO

3.1 - Además de estudiar la cinética de la infección a nivel individual en los animales vacunados y no vacunados (punto 2), y también a nivel de la explotación mediante el análisis de leche de tanque a lo largo de los años que dure el proyecto, se cuantificará la carga bacteriana ambiental en el entorno de la explotación y en los purines y/o estiércol generados.

En el punto anterior, ya se han desarrollado los resultados de la vacunación y se ha mostrado el descenso de la contaminación ambiental y de la infección en los animales tras 2 años de control.

Además, para ahondar en el estudio de la presencia de *C. burnetii* en el entorno de la explotación, se ha realizado el seguimiento de 94 explotaciones, que habían sido positivas/negativas en ELISA y PCR de LT en el estudio inicial (punto 1.1), con el objetivo de comprobar la evolución de la infección en un periodo de 2 años. En cada explotación se tomó una nueva muestra de LT para su análisis serológico y molecular, así como sueros de 15 animales para su estudio serológico, procurando tomar muestras del máximo número posible de animales muestreados en el estudio anterior. Además, en cada explotación se tomaron 5 muestras de polvo de diversas superficies y una muestra de purín con objeto de evaluar la presencia de *C. burnetii* en el medio ambiente. Para que los resultados fueran comparables, se llevó a cabo la misma metodología laboral utilizada en el estudio 1. Así, la presencia de anticuerpos frente a *C. burnetii* en muestras de suero sanguíneo y suero lácteo se investigó mediante ELISA (LSIVET Ruminant Milk/Serum Q Fever kit; Laboratoire Service International, Lissieu, France). Las muestras de LT y muestras medioambientales fueron sometidas a extracción de DNA y PCR.

A fin de estudiar la evolución de las explotaciones a lo largo de los dos muestreos se llevó a cabo una clasificación de las mismas atendiendo a los resultados del estudio 1.1. Aquellas explotaciones con un resultado positivo en LT (ELISA y PCR) y con al menos un animal seropositivo fueron clasificadas como A (Cat A). En la categoría B (Cat B) se incluyeron las explotaciones con resultado positivo en LT por ELISA o PCR, o bien tenían al menos un animal seropositivo. Las explotaciones con un resultado negativo en LT (ELISA y PCR) y todos los animales seronegativos se incluyeron en la categoría C (Cat C).

En el estudio 2 (2011/12) se detectaron anticuerpos frente *C. burnetii* en LT en el 48.9% de las explotaciones (46/94), lo que supone un descenso significativo en la seroprevalencia con respecto a los valores obtenidos dos años antes (estudio 1, 2009/10) (60.6%; 57/94) ($P < 0.05$). En el caso de la presencia de DNA de *C. burnetii* en LT se observó la misma tendencia, ya que fue detectado en un 42.5% (40/94) de las explotaciones, mientras que en el estudio 1 fue significativamente más elevada 59.6% (56/94) ($P < 0.05$). A pesar de la evidente bajada en la prevalencia de *C. burnetii* a lo largo de los dos años, ésta sigue manteniendo unos niveles elevados y similares a los registrados en otros estudios similares realizados en otros países.

La evolución del estatus de *C. burnetii* en las explotaciones de acuerdo con las categorías descritas (**Tabla 11**), indica el descenso en la prevalencia, ya mencionado, con un total de 34, 25 y 35 explotaciones incluidas en las categorías A, B y C respectivamente, comparado con las 46, 17 y 31 del estudio inicial.

Estudio 1 (2009/10)			Estudio 2 (2011/12)				
Cat.	N	Seroprev media	Cat.	N	Seroprev media	Explot. con seroconv	Explot. con muestras medioamb pos.
A	46	13.0	A	29	19.1	14	9
			B	10	11.1	3	0
			C	7	0.0	-	1
B	17	4.2	A	4	8.4	4	2
			B	7	5.8	3	0
			C	6	0.0	-	1
C	31	0.0	A	1	6.7	1	0
			B	8	5.8	7	0
			C	22	0.0	-	0

Tabla 11. Evolución del estatus de *C. burnetii* en las 94 explotaciones a lo largo del estudio.

La **figura 11** muestra la evolución de la seroprevalencia por grupos de edad. Los animales menores de dos años mostraron una seroprevalencia más baja que la registrada en novillas y vacas, probablemente debido al contacto creciente con la bacteria con la edad, tal y como se describe en otros estudios. Del total de 1366 animales correspondientes al estudio 2, 656 ya fueron analizados dos años antes. De estos 656 animales, 53 seroconvirtieron (8.1%).

Tras llevar a cabo el estudio medioambiental pudo detectarse DNA de *C. burnetii* en purín o polvo de 13 de las 94 explotaciones (13.8 %) (**tabla 11**). Cabe resaltar que las explotaciones incluidas en la cat A presentaron un porcentaje significativamente mayor de muestras ambientales positivas (9.1% en cat A vs. 1.1% en cat C, $P=0.0314$) (Tabla 11). Se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de muestras ambientales positivas a *C. burnetii* y el nivel de anticuerpos en LT ($r=0.36$, $P=0.0004$), así como con la seroprevalencia media de la explotación ($r=0.30$, $P<0.0001$). El descubrimiento de DNA de *C. burnetii* en el ambiente es de suma importancia desde el punto de vista epidemiológico. En relación con los brotes recientes de Fiebre Q, la presencia de *C. burnetii* en muestras medioambientales representa una fuente de infección para el resto de los animales de la propia explotación, para animales de otras explotaciones y para los seres humanos. La **tabla 12** detalla los resultados obtenidos en las 13 explotaciones con muestras medioambientales positivas.

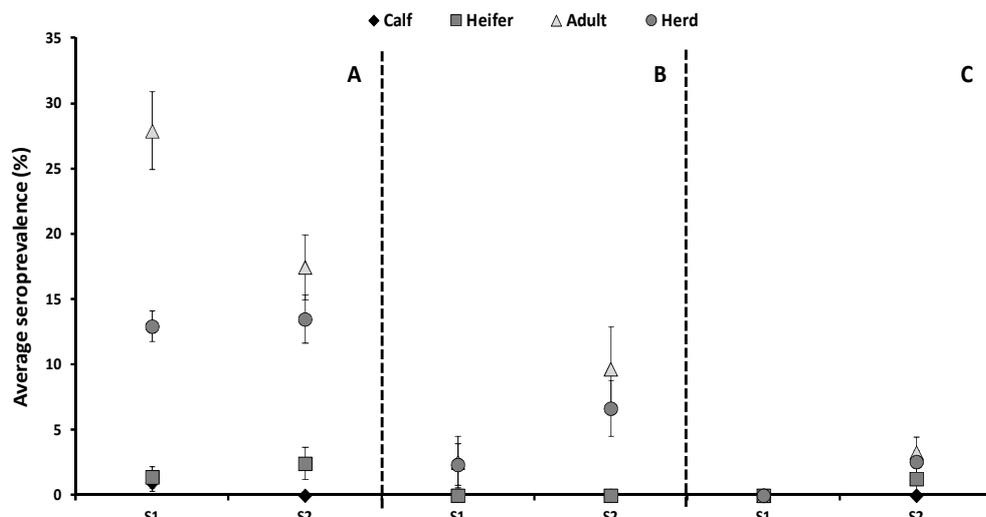


Figura 11. Evolución de la seroprevalencia con la edad a lo largo de dos años.

3. Información científica generada

Publicaciones Científicas Internacionales

Autores (p.o. de firma): I. Astobiza, F. Ruiz-Fons, A. Piñero, J. F. Barandika, A. Hurtado, and A. L. García-Pérez

Título: Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples

Ref. Revista Journal of Dairy Science Libro

Clave: Volumen: 95 Páginas, inicial: 1632 final: 1638 Fecha: 2012

Autores (p.o. de firma): Piñero, A., Barandika, JF, Hurtado, A., García-Pérez, AL

Título: Evaluation of *Coxiella burnetii* status in dairy cattle herds with bulk-tank milk positive by ELISA and PCR

Ref. Revista: Transboundary & Emerging Diseases Libro

Clave: Volumen: 61 Páginas, inicial: 163 final: 168 Fecha: 2014

Autores (p.o. de firma): Astobiza, I., Tilburg, JHC, Piñero, A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W.

Título: Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain

Ref. Revista: BMC Veterinary Research Libro

Clave: Volumen: 8 Páginas, inicial: 241 final: Fecha: 2012

Autores (p.o. de firma): Piñero A, Ruiz-Fons JF, Hurtado A, Barandika JF, Atxaerandio R, García-Pérez AL

Título: Changes in the dynamics of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle: an approach to match field data with the epidemiological cycle of *C. burnetii* in endemic herds

Ref. Revista: Journal of Dairy Science Libro

Clave: Volumen: 97 Páginas, inicial: final: 2718-2730 Fecha: 2014

Autores (p.o. de firma): Piñero Alvaro, Barandika F Jesús, Hurtado Ana, García-Pérez Ana L.

Título: Progression of *Coxiella burnetii* infection after implementing a two-year vaccination program in a naturally infected dairy cattle herd

Ref. Revista: Acta Veterinaria Scandinavica Libro

Clave: Volumen: 56 Páginas, inicial: final: 47 Fecha: 2014

Autores (p.o. de firma): Piñero,A., Barandika, JF., García-Pérez, AL., Hurtado, A.

Título: Genetic diversity and variation over time of *Coxiella burnetii* genotypes in dairy cattle and the farm environment

Ref. Revista Infection, Genetics and Evolution Libro

Clave: Volumen: 31 Páginas, inicial: 231 final: 235 Fecha: 2015

+ Publicaciones Científicas Nacionales
+ Comunicaciones a Congresos, Reuniones, Simposios

Autores: A.L. GARCIA PEREZ, F. RUIZ FONTS, J. ASTOBIZA, J.F. BARANDIKA, A. HURTADO, R.A. JUSTE

Título: Epidemiología y control de la Fiebre Q

Tipo de participación: PONENCIA INVITADA

Congreso: XV Congreso Internacional de Medicina Bovina (ANEMBE)

Lugar celebración: Granada

10-11 Junio 2010

Autores: AL García-Pérez, I Astobiza, JF Barandika, A Hurtado, RA Juste

Título: Fiebre Q: Estudios de campo, diagnóstico de laboratorio y control

Tipo de participación: Ponencia invitada

Congreso: XV Simposio Anual de AVEDILA

Lugar celebración: Zaragoza, Hotel Palafox

18-19 Noviembre 2010

Autores: AL García-Pérez, I Astobiza, JF Barandika, A Hurtado, RA Juste

Título: Fiebre Q, una enfermedad desconocida en el campo

Tipo de participación: Ponencia invitada

Congreso: I Congreso Nacional de Veterinarios de ADGS Rumiantes

Lugar celebración: Oviedo, Palacio de Congresos 24-25 Noviembre 2010

Autores: ASTOBIZA, I., RUIZ-FONS, F., PIÑERO A., POVEDANO I. BARANDIKA, J.F., JUSTE, R.A., HURTADO, A., GARCÍA-PÉREZ, A.L.

Título: OCCURENCE OF *COXIELLA BURNETII* IN DAIRY CATTLE IN INTENSIVE SYSTEMS IN NORTHERN SPAIN

Tipo de participación: POSTER

Congreso: 6TH INTERNATIONAL MEETING ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES

Lugar de celebración: HERAKLION, Creta
2011.

Fecha: 5-7 JUNIO

Autores: PIÑERO, A., ASTOBIZA, I., BARANDIKA, J.F., JUSTE, R.A., HURTADO, A., GARCÍA-PÉREZ, A.L.

Título: INDIVIDUAL BACTERIAL SHEDDING AND SEROPREVALENCE IN DAIRY CATTLE HERDS WITH *COXIELLA BURNETII* POSITIVE BULK-TANK MILK

Tipo de participación: POSTER

Congreso: 6TH INTERNATIONAL MEETING ON RICKETTSIAE AND RICKETTSIAL DISEASES

Lugar de celebración: HERAKLION, Creta
2011.

Fecha: 5-7 JUNIO

Autores: J.F. BARANDIKA; A. PIÑERO; I. ASTOBIZA; R.A. JUSTE;; R. ATXAERANDIO; A. HURTADO; A.L. GARCÍA-PÉREZ

Título: ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE *COXIELLA BURNETII* EN GANADO VACUNO LECHERO EN REGIMEN INTENSIVO. ¿ES EL ANÁLISIS DE LA LECHE DE TANQUE UN BUEN INDICADOR DEL ESTATUS DE *C. BURNETII* EN LA EXPLOTACIÓN?

Tipo de participación: COMUNICACIÓN ORAL

Congreso: XVI CONGRESO INTERNACIONAL ANEMBE DE MEDICINA BOVINA

Lugar de celebración: ÁVILA

Fecha: 11-13 MAYO

2011.

Autores: A. PIÑERO, I. ASTOBIZA; J. F. BARANDIKA; A. HURTADO; R. A. JUSTE A. L. GARCÍA-PÉREZ

Título: ESTUDIO SEROLOGICO Y MOLECULAR EN TRES EXPLOTACIONES DE GANADO VACUNO LECHERO CON LECHE DE TANQUE POSITIVA A *COXIELLA BURNETII* (FIEBRE Q)

Tipo de participación: POSTER

Congreso: XVI Simposio Anual de AVEDILA

Lugar de celebración: TENERIFE

Fecha: 24-25

Noviembre 2011.

Autores: I Astobiza, JJHC Tilburg, A Piñero, A Hurtado, AL García-Pérez, MH. Nabuurs-Franssen, CHW Klaassen

Título: Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in Northern Spain

Tipo de participación: POSTER

Congreso: 22nd ECCMID. European Society of Clinical Microbiology & Infectious Diseases

Lugar celebración: London, UK

Fechas: 30 Mar-3 Apr 2012

Autores: Piñero, A., Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., García-Pérez, A.L.

Título: Evolución de la prevalencia de *Coxiella burnetii* en explotaciones de bovino lechero en un periodo de 2 años.

Tipo de participación: COMUNICACION ORAL

Congreso: XVII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina

Lugar celebración: Santander

Fechas: 18-20 Abr 2012

Autores: Piñero, A.; García-Torres, D.; Barandika, JF; Atxaerandio, R; Hurtado, A.; García-Pérez, AL

Título: Evolución de la infección por *Coxiella burnetii* en una explotación de ganado vacuno lechero tras la vacunación.

Tipo de participación: COMUNICACION ORAL

Congreso: XVIII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina

Lugar celebración: Lleida

Fechas: 24-26 abril 2013

Autores: A. Piñero; R. A. Juste; J. F. Barandika; A. Hurtado; A. L. García-Pérez

Título: Investigación sobre la presencia de *Coxiella burnetii* en quesos elaborados con leche cruda de oveja

Tipo de participación: COMUNICACION ORAL

Congreso: XVIII Simposio Anual AVEDILA

Lugar celebración: Madrid, Spain

14-15 noviembre 2013

+ Artículos de Divulgación

Autores: Garcia-Perez, AL y Astobiza I

Título: La fiebre Q, una zoonosis de actualidad

Ref. Revista: Albeitar Libro

Clave: Volumen: 161 Páginas, inicial: 24 final: 25 Fecha: 2012

Autores: García-Pérez, AL; Barandika, JF; Astobiza I.

Título: Zoonosis: Fiebre Q

Ref. Revista: Albeitar Libro

Clave: Volumen: 173 Páginas, inicial: 6 final: 8 Fecha: 2014

- + Monografías
- + Informes Técnicos

4. Actividades de formación y transferencia realizadas

Alvaro Piñero es becario predoctoral de INIA y se incorporó el 1 de septiembre de 2010. Ha presentado y defendido su tesis doctoral el 20 de noviembre de 2014.

Durante el curso 2010/2011, realizó el Máster "Microbiología y Salud" la UPV/EHU (Universidad del País Vasco).

Las asignaturas cursadas fueron las siguientes:

- Acreditación y normalización de los laboratorios y control del riesgo biológico.
- Antimicrobianos.
- Avances en Bacteriología Médica.
- Avances en Micología Médica.
- Biorremediación de suelos contaminados.
- Gestión y comunicación de la información científica en Microbiología.
- Infección e inmunidad.
- Métodos básicos y avanzados en Microbiología.
- Microbiología clínica: enfermedades tropicales importadas.
- Supervivencia bacteriana.
- Vacunas.
- Virología ambiental.
- Proyecto Fin de Máster.

El Proyecto fin de Máster "Eliminación de *Coxiella burnetii* a escala individual en explotaciones de ganado bovino lechero con leche de tanque positiva" fue presentado el pasado día 28 de Septiembre de 2011 y fue valorado con 9.5 puntos sobre 10. La totalidad de créditos del máster fueron superados con una nota media de 9,22 (2,90 Nota media MEC), motivo por el cual se realizaron todos los trámites pertinentes para la obtención del título. Además tras la consecución del título de Máster, se ha tramitado la documentación pertinente para la admisión e inscripción de la tesis doctoral en la UPV/EHU.

Como parte de su formación, Alvaro Piñero ha asistido a congresos nacionales e internacionales relacionados con el tema del proyecto, donde ha presentado pósters y comunicaciones orales, tal y como se detalla en el apartado correspondiente.

Ha participado en todos los seminarios de formación que se realizan en el Dpto de Sanidad Animal de NEIKER periódicamente.

También ha asistido a otros cursos de formación:

“*Current and future diagnostic methodologies in animal health*”. Celebrado en Zaragoza (España) desde el 14 al 18 de Enero de 2013 (30 horas). Organizado por centro internacional de estudios agronómicos avanzados del mediterráneo (CIHEAM), a través de Instituto agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ), FAO, a través de la división de producción y salud animal y la organización mundial de la salud animal (OIE).

“*Secuenciación y genotipado de DNA: marcadores, aplicaciones, metodologías y análisis de datos*”. Organizado por la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) (Bizkaia, España) desde el 14 al 17 de Mayo de 2013 (20 horas) a través de la unidad de secuenciación y genotipado de la facultad de ciencia y tecnología.

Desde enero a marzo de 2014 ha realizado una estancia de formación en el Center of Disease Control (CDC) de Atlanta (USA) para formarse en técnicas de cultivo, viabilidad y tipado de *Coxiella*.

5. Desviaciones con respecto a la memoria del proyecto

Incluir en este apartado sólo las relativas al plan de trabajo

Ninguna