



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Detección de *Coxiella burnetii* mediante PCR, en borregas
que presentaron aborto”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
M.V.Z. OLIVER SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

TUTORA: DRA. ERIKA GABRIELA PALOMARES RESENDIZ - INIFAP

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO – HOSPITAL GEA GONZÁLEZ
DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO - INIFAP



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

La tesis fue parcialmente financiada por el proyecto SAGARPA-CONACYT 2017-2-291311: “Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia* spp, *Brucella melitensis*, *Leptospira* spp. y *Coxiella burnetii*, en ovinos y caprinos”.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar los estudios de posgrado, en el Programa de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, en la FMVZ-UNAM.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
III. JUSTIFICACIÓN	11
IV. HIPÓTESIS	12
V. OBJETIVOS	13
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	14
VII. RESULTADOS	19
VIII. DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN	27
IX. REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Amplificación del fragmento de 605 pb de la IS1111 de <i>Coxiella burnetii</i> en muestras de exudado vaginal de borregas que presentaron aborto.	19
Figura 2. Productos de amplificación del fragmento de 605 pb de la IS1111 de <i>Coxiella burnetii</i> extraídos mediante el corte del gel agarosa.	22
Figura 3. Fragmentos purificados de <i>Coxiella burnetii</i> a partir de muestras de exudado vaginal	22
Figura 4. Clonación directa del producto de amplificación de la IS1111 de <i>Coxiella burnetii</i> en el plásmido pGEM-T Easy	24
Figura 5. Perfil plasmídico de colonias blancas generadas por la clonación del producto de amplificación de la IS1111 de <i>Coxiella burnetii</i> en el plásmido pGEM-T Easy	25
Figura 6. Análisis de restricción de plásmidos de colonias blancas	25
Figura 7. Límite de detección de <i>Coxiella burnetii</i> mediante la amplificación de un producto de 605 pb de la IS1111 clonado en el plásmido pGEM-T Easy.	26

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Número total de borregas muestreadas por estado y total de resultados positivos y negativos para la detección de ADN de <i>C. burnetii</i> mediante la técnica de PCR.	20
Tabla 2. Identidad de secuencias disponibles en el GenBank con la secuencia del fragmento de la IS1111 de <i>C. burnetii</i> , utilizando BLAST de NCBI en muestras de exudado vaginal de borregas que presentaron aborto.	23

RESUMEN

SANCHEZ RODRIGUEZ OLIVER. Detección de *Coxiella burnetii* mediante PCR, en borregas que presentaron aborto. (Bajo la asesoría de la Dra. Erika Gabriela Palomares Resendiz, Dr. Rigoberto Hernández Castro y Dr. Efrén Díaz Aparicio).

Coxiella burnetii es una bacteria intracelular responsable de la fiebre Q en humanos y coxielosis en mamíferos domésticos y salvajes, una de las causas de aborto en ovinos que genera pérdidas económicas en la industria pecuaria a nivel mundial. Actualmente la coxielosis es considerada una enfermedad exótica en México, por lo cual los métodos para su diagnóstico clínico no se encuentran disponibles. Sin embargo, existen evidencias serológicas y clínicas que sugieren la presencia del agente causal en algunos rebaños ovinos. El objetivo del presente estudio, fue demostrar la presencia de ADN de *C. burnetii* en borregas que presentaron aborto, mediante la estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. Se obtuvieron un total de 180 muestras de exudado vaginal de borregas que abortaron provenientes de cinco estados de la República Mexicana. Se realizó la prueba de PCR que amplificó un fragmento de 605 pb de la secuencia de inserción IS1111 de *C. burnetii*. Los productos de amplificación fueron secuenciados y comparados con la base de datos del GenBank para determinar su identidad. La PCR mostró un 61.1% (110/180) de las muestras positivas, en donde los estados de Querétaro y Morelos mostraron los porcentajes más altos 89.47% (17/19) y 83.33% (50/60), respectivamente. En el Estado de México, Aguascalientes y Chiapas también se presentaron casos positivos con el 52.94% (27/51), 33.33% (15/45) y 20% (1/5), respectivamente. Los análisis de la secuencia de los productos de amplificación, mostraron una identidad de más del 99.2% con la IS1111 de diferentes cepas de *C. burnetii*. En conclusión, demostramos la presencia de ADN de *C. burnetii* en borregas que presentaron aborto en México mediante la estandarización de un método de PCR sensible y rápido que puede ser utilizado por diferentes laboratorios regionales de nuestro país.

Palabras claves: fiebre Q, coxielosis, *Coxiella burnetii*, PCR, IS1111, ovinos, aborto.

ABSTRACT

Coxiella burnetii is an intracellular zoonotic pathogen responsible for Q fever in humans and coxiellosis in domestic and wild mammals. It is one of the causes of abortion in ewes and *C. burnetii* infection can cause economic losses in flocks. Currently coxiellosis is classified as an exotic disease in Mexico, and for coxiellosis this signifies the categorical absence of clinical diagnostic methods in our country. However, there is increasing evidence of its presence. The objective of the present study was to demonstrate the presence of *C. burnetii* DNA from cases of ovine abortion, by standardizing the end-point polymerase chain reaction (PCR) technique. A total of 180 samples of vaginal swabs were obtained from ewes from five states of Mexico. The PCR assay used a pair of primers that target the gene IS1111 transposase elements in the genome of *C. burnetii*. The amplified products were sequenced and compared to the GenBank database to determine identity. The PCR showed 61.1% (110/180) of positive samples. The states of Queretaro and Morelos registered the highest percentages 89.47% (17/19) and 83.33% (50/60), respectively. In the states of Mexico, Aguascalientes and Chiapas there are also positive cases with 52.94% (27/51), 33.33% (15/45) and 20% (1/5), respectively. The sequencing analysis of the amplified products showed more than 99.2% identity with the IS1111 of different *C. burnetii* strains. In conclusion, we demonstrate the presence of *C. burnetii* DNA in cases of ovine abortion in Mexico by standardizing a sensitive and rapid PCR method that can be used by different regional laboratories in our country.

Keywords: Q fever, coxiellosis, *Coxiella burnetii*, PCR, IS1111, sheep, abortion.

I. INTRODUCCIÓN

Coxiella burnetii es una bacteria intracelular obligada distribuida en todo el mundo que causa fiebre Q en los humanos y coxielosis en los animales. Se han descrito a diversas especies de animales como portadores de la enfermedad, la presencia de este patógeno dentro de los rebaños, no solo compromete la eficiencia productiva de los animales, sino que representa un riesgo de contagio latente hacia las personas asociadas a la producción animal. Aunque la coxielosis es considerada una enfermedad exótica dentro del territorio nacional, existen evidencias serológicas y clínicas que sugieren la presencia del agente causal en algunas unidades de producción ovinas, caprinas y bovinas del país, así como también en los humanos, en donde la fiebre Q se considera una enfermedad sub diagnosticada. El objetivo del presente estudio fue demostrar la presencia de ADN de *C. burnetii* en borregas que presentaron aborto.

II. ANTECEDENTES

Coxiella burnetii se ha descrito en una amplia gama de especies hospedadoras incluida el hombre, siendo los pequeños rumiantes los más frecuentemente involucrados (Brom et al. 2015) en quienes causa coxielosis. Las principales manifestaciones clínicas en los rumiantes son los abortos, los mortinatos y el nacimiento de crías débiles, lo que lleva a pérdidas económicas significativas (Bouvery and Rodolakis. 2005).

Etiología

La fiebre Q o coxielosis es causada por *C. burnetii*, una bacteria de 0.2-0.4 μm de ancho, 0.4-1.0 μm de largo, que presenta una pared celular similar a la de las bacterias Gram negativas. Sin embargo, este cocobacilo no es teñible con la técnica de Gram. *C. burnetii* se clasifica en la familia *Coxiellaceae*, en el orden *Legionellales* de la subdivisión *gamma* de las *Proteobacterias*. El tiempo de duplicación estimado de la bacteria es de 20 y 45 h en cultivo celular (Angelakis and Raoult. 2010). Es un patógeno intracelular obligado que se replica en células eucariotas. Se pueden observar dos formas de este microorganismo, correspondientes a un ciclo de desarrollo bifásico. La variante de células grandes (LCV) de la bacteria es la forma de replicación, mientras que la variante de células pequeñas (SCV) es una forma estacionaria no replicante. Las SCV son pequeños bastoncillos de 0.2 a 0.5 μm de largo caracterizadas por tener una cromatina condensada, una envoltura celular gruesa y un sistema de membrana interna inusual. Las LCV tienen un tamaño más largo de $>0.5\mu$, una cromatina dispersa y una envoltura similar a la de las bacterias Gram negativas (Sandoz et al. 2016).

La bacteria sufre dos tipos de variación de fase en respuesta a sus cambios ambientales. Primero es una fase virulenta observada en animales de laboratorio y en la naturaleza, que se asocia con una respuesta retardada de IgG. La segunda es una fase avirulenta a través de alteraciones en el lipopolisacárido capsular, observada en medios de cultivo después de pasajes repetidos (McCaul and Williams. 1981).

Transmisión

Los pequeños rumiantes son los principales reservorios de *C. burnetii* y la excreción del organismo ocurre principalmente en productos del parto y aborto como líquido amniótico y placenta, pero también en la leche, las heces y orina. Las principales rutas de introducción de *C. burnetii* a una granja es por la inhalación de polvo y aerosoles contaminados transportados por el viento y la introducción de un animal infectado (Nusinovici et al. 2017).

La infección también se puede producir por ingestión de pastos, heno y paja contaminados. Es probable que el estiércol contaminado con *C. burnetii* juegue un papel en el mantenimiento de la infección en poblaciones animales (EFSA, 2010).

El patógeno ha sido aislado en varias especies de garrapatas. Las garrapatas juegan un papel importante en los ciclos de transmisión en regiones endémicas, ya que transmiten el agente a través de la mordedura o heces a los rumiantes, las aves y los roedores. El principal género de garrapatas que sirve como reservorio para la diseminación de *C. burnetii* es *Amblyomma* spp., ya que tiene la capacidad para mantener a la bacteria en las heces, saliva y fluido coxal. Una fuerte correlación ha sido reportada entre la seropositividad y la infestación de garrapatas en animales (Psaroulaki et al. 2006). *C. burnetii* se ha detectado en el semen de carneros (Ruiz et al. 2014), por lo que es probable que esta vía pueda desempeñar un papel importante en la transmisión de la infección.

El mantenimiento de la infección de *C. burnetti* en las poblaciones animales puede ser afectada también por otros factores como el manejo, almacenamiento, tratamiento y utilización del estiércol, características de la granja como densidad de rebaño y sus condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) (EFSA, 2010).

Patogenia

Aunque *C. burnetii* puede infectar a muchas especies animales, las infecciones generalmente permanecen asintomáticas (Yohannes and Shallom. 2018). En las vacas, las borregas y las cabras, la coxielosis se ha asociado fundamentalmente a trastornos reproductivos, como abortos, partos prematuros, nacidos muertos o débiles (EFSA, 2010). En el ganado, la infertilidad es la principal manifestación clínica (Roest et al. 2013), también pueden presentar retención placentaria y mastitis subclínica (Barlow et al. 2008).

En pequeños rumiantes durante la fase aguda, se puede demostrar la presencia del organismo en la sangre, los pulmones, el bazo y el hígado (Maurin and Raoult 1999). En hembras gestantes las presentaciones clínicas más importantes por la infección con *C. burnetii* son el aborto y la muerte fetal. El aborto ocurre con mayor frecuencia en el último tercio de la gestación sin signos clínicos previos (Bouvery et al. 2005). En la temporada que sigue a una tormenta de abortos, los problemas reproductivos son a menudo menos sobresalientes. Las borregas infectadas por *C. burnetii* durante la gestación generalmente manifiestan un solo aborto (Berri et al. 2002), y no todas las infecciones de ovejas y cabras gestantes terminan en aborto (Martinov et al. 1989).

Se ha estudiado la infección aguda en borregas gestantes inoculadas por vía intravenosa o intraperitoneal con una cepa de *C. burnetii* aislada de una borrega que abortó. Las borregas desarrollaron fiebre hasta 40.9°C durante 2 a 3 días después de la exposición, seguida de la reaparición de una fiebre leve a los 12 días posteriores a la inoculación. La fiebre estuvo acompañada de depresión, salivación, rinitis, conjuntivitis y taquipnea (neumonía intersticial). Varios días antes del parto, el estado general de los animales se deterioró y parieron corderos muertos, prematuros o débiles a término, la placenta se observó necrótica e inflamada (Martinov et al. 1989). En animales no gestantes, la infección por *C. burnetii* es asintomática (Brom et al. 2015).

En el aborto asociado a la infección por *C. burnetii*, los fetos parecen normales, aunque ocasionalmente autolíticos. Macroscópicamente, la placentitis puede estar presente, generalmente caracterizada por la presencia de un exudado purulento amarillo parduzco, que cubre principalmente las áreas intercotiledonarias severamente engrosadas. Microscópicamente, en casi todos los casos, se ven afectados los trofoblastos del alantocorion intercotiledonario y la base de las vellosidades cotiledonarias. La gravedad de la inflamación varía desde infiltración mononuclear leve hasta necrosis severa con exudado purulento. Las células epiteliales coriónicas, especialmente en la base de las vellosidades cotiledonarias, a menudo tienen un citoplasma espumoso y contienen granulación basofílica intracitoplasmática, hallazgos altamente sugestivos de infección de *C. burnetii* (Brom et al. 2015).

Zoonosis

La mayoría de las infecciones en humanos se producen después de la inhalación de aerosoles contaminados con *C. burnetii*. La infección puede ocurrir después de la exposición directa con animales infectados y sus productos (placenta, productos de aborto, pieles, lana, estiércol, etc.), especialmente en el momento del parto o el sacrificio (Angelakis and Raoult. 2010). La infección por *C. burnetii* en el 60% de los casos suele ser asintomática (Raoult et al. 2005). El periodo de incubación es aproximadamente de dos a tres semanas y los síntomas pueden ser diferentes entre pacientes y manifestarse en una forma aguda o crónica (Maurin and Raoult. 1999).

La fiebre Q aguda es la presentación clínica más común, es una enfermedad febril inespecífica, los síntomas frecuentes son fiebre alta entre 39-40°C, fatiga, escalofríos y dolor de cabeza severo (Maurin and Raoult. 1999). Otros síntomas como tos, náuseas, vómitos, dolor abdominal y mialgia también han sido reportados (Terheggen and Leggat. 2007). La neumonía es una importante manifestación clínica de la fiebre Q aguda y *C. burnetii* puede ser una causa subestimada de neumonía adquirida en la comunidad. Suele aparecer cuatro o cinco días después de los primeros signos de la enfermedad, aunque también puede presentarse en pacientes asintomáticos. Se manifiesta con una tos seca, dolor retro-orbital, mialgia

y sudoración. La hepatitis es otra manifestación de la fiebre Q aguda, generalmente se expresa como una hepatitis granulomatosa, con fiebre y dolor abdominal (Angelakis and Raoult. 2010). El tratamiento para la fiebre Q aguda es doxiciclina 100 mg por vía oral dos veces al día durante 14 días (Patil and Regunath. 2020).

La fiebre Q crónica es poco usual y puede desarrollarse después de una infección aguda o asintomática. Aproximadamente el 5% de los pacientes desarrollan fiebre Q crónica y la tasa de mortalidad varía de 5 a 60% (Landais et al. 2007). El órgano principalmente afectado es el corazón, aunque también las arterias, el hígado y los huesos. La endocarditis es la manifestación clínica más importante de la fiebre Q crónica y ocurre en el 60-70% de los casos, puede ser totalmente asintomática, tanto clínica como histológicamente y más de la mitad de los casos presentan hemocultivos negativos. Además, otras manifestaciones como hepatitis crónica, osteomielitis, artritis séptica, enfermedad pulmonar intersticial o síndrome de fatiga crónica también pueden presentarse (Terheggen and Leggat. 2007). Para la fiebre Q crónica, el régimen terapéutico incluye doxiciclina e hidroxiquina, administrados durante 18 a 24 meses (Patil and Regunath. 2020).

Diagnóstico

El diagnóstico de *C. burnetii* no se puede realizar mediante técnicas en medios de cultivo convencionales, lo que hace necesario utilizar el cultivo celular, las células más usadas para su aislamiento son fibroblastos de ratón L929 (Gouriet et al. 2005). También se puede utilizar el cultivo axénico que ha sido desarrollado para facilitar la manipulación de la bacteria (Omsland et al. 2009). En 2015 se reportó el primer aislamiento de *C. burnetii* en medio axénico de muestras clínicas usando el medio 2 citrato cisteína acidificado (ACCM2). Una muestra de válvula de corazón de un paciente con endocarditis por *C. burnetii* fue incubada en 20 ml de ACCM2 y su crecimiento fue observado de 6 a 8 días de incubación. La inoculación de una placa de agar ACCM2 con una muestra del líquido del cultivo positivo produjo varias colonias al día 5 (Boden et al. 2015). El cultivo puede ser realizado por laboratorios de referencia ya que se requiere de un laboratorio de bioseguridad nivel 3 para su aislamiento.

La bacteria se puede visualizar mediante tinción en tejidos, o en flujo vaginal mediante un microscopio con objetivo de inmersión. Debido a que es resistente a los ácidos, la bacteria se puede teñir por diversos métodos: el de Stamp, el método modificado de Ziehl Neelsen, el de Giménez, el método de Giemsa, y el método de Koster modificado. Dada la falta de especificidad, un resultado positivo podría indicar que hay fiebre Q, en cuyo caso deben llevarse a cabo pruebas de confirmación (OIE. 2018).

Debido a estos inconvenientes la serología sigue siendo el método más utilizado para evaluar la infección por *C. burnetii*. El método de referencia es el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA), también se utilizan la prueba de fijación del complemento (CFT) y la técnica de ELISA. Un inconveniente de estas técnicas es que el diagnóstico se retrasa porque los anticuerpos específicos contra *C. burnetii* aparecen varias semanas después de la infección, aunque pueden detectarse meses después de una infección (Bruin et al. 2011).

Diferentes métodos moleculares incluyendo PCR punto final, PCR tiempo real, PCR anidada y PCR multiplex, se han convertido en la herramienta de elección para demostrar la presencia de ADN de *C. burnetii* en diferentes muestras como leche, sangre, fluido vaginal, heces. Los primeros sistemas de PCR utilizaban secuencias de diferentes tipos de plásmidos, el ARN 16S-23S, el gen de la superóxido dismutasa y la Secuencia de Inserción (IS, por sus siglas en inglés) 1111 en muestras humanas o animales es la más común para el diagnóstico ya que, está presente con hasta 20 copias dentro del genoma de *C. burnetii* (Denison et al. 2007; Eldin et al. 2017).

Control y prevención

Durante un brote, deben aplicarse algunas medidas sanitarias para reducir la transmisión de la enfermedad. El tratamiento antibiótico con oxitetraciclina (20mg/kg) durante los últimos meses de gestación ha sido propuesto para reducir la tasa de abortos y excreción de *C. burnetii* en animales gestantes (Berri et al. 2007). Los fetos abortados, las placentas y las camas contaminadas deben ser retirados y destruidos; los corrales donde hayan abortado deben limpiarse y desinfectarse. A medida que avanza la época de partos se hace necesaria la vigilancia continua para garantizar la detección y el aislamiento rápido de todos los animales afectados.

En México no hay ninguna vacuna disponible, sin embargo, en algunos países en donde la enfermedad es endémica se aplica. Se ha demostrado que las vacunas reducen el aborto, la excreción de *C. burnetii* y la aparición de infecciones en animales. La vacuna inactivada Coxevac fase I, la cual es una bacterina ha sido efectiva en la reducción de la tasa de abortos y carga bacteriana en el moco vaginal, heces y leche (Bouvery et al. 2005). La vacunación debe ser administrada en rumiantes no infectados antes de su primera gestación (Hogerwerf et al. 2011). Cuando los animales ya están infectados la vacunación no previene el aborto (Guatteo et al. 2008).

Epidemiología

La coxielosis tiene una distribución mundial, excepto en Nueva Zelanda y la Antártida (Bouvery and Rodolakis. 2005).

De los 29 brotes de fiebre Q humana notificados en cuatro países de Europa (Bulgaria, Francia, Alemania, Países Bajos) entre 1982 y 2010, 17 se asociaron con borregas, mientras que solo tres con cabras, incluidos los brotes grandes en los Países Bajos (Georgiev et al. 2013). Todos estos países tienen una población más grande de borregas que de cabras.

En Pakistán, Ullah et al., en 2019 mediante la técnica de ELISA reportaron una seroprevalencia de *C. burnetii* del 15.6% y 15% en ovejas y cabras, respectivamente. Mientras en un estudio realizado en borregas en Jordania utilizando la misma técnica, Lafi et al. en 2020 reportaron una seroprevalencia del 27%.

Gangoliya et al., en 2019 en un estudio realizado en la India en borregas y cabras mediante PCR anidada para la detección de *C. burnetii* obtuvieron 9/123 borregas positivas, en las 29 muestras de hisopo vaginal de cabras no se detectó a la bacteria. En Australia los brotes en mataderos han continuado ocurriendo y uno de los últimos brotes de fiebre Q se correlacionó con asistir a un mercado ganadero al que se movilizaron 20000 borregas (Connor et al. 2015). En Ghana, Johnson et al. en 2019 mediante la prueba ELISA indirecta determinaron una prevalencia de 28.4% (45/158) para borregas y 10% (10/100) para cabras. En todas las granjas muestreadas había problemas de aborto. En Canadá, *C. burnetii* se identificó por PCR en tiempo real en el 69% (113/163) de las muestras de borregas que habían abortado (Hazlett et al. 2013).

Situación de la fiebre Q en México

La coxielosis es considerada exótica en México y se encuentra incluida dentro del grupo 1 de enfermedades de notificación inmediata obligatoria, por su rápida diseminación e impacto económico para los animales y para la salud pública (SAGARPA, 2018). Sin embargo, se han reportado dos estudios de seroprevalencias en los rumiantes que sugieren la presencia del microorganismo en el territorio nacional. En el estado de Nuevo León, empleando la técnica de ELISA indirecta se reportó una seroprevalencia de anticuerpos contra *C. burnetii* en el 40% de las borregas, 35% en cabras, 28% en ganado lechero y 10% en ganado de carne (Salinas et al. 2002). En otro estudio serológico se obtuvo una prevalencia aparente a nivel rebaño en ovinos de los estados de Sonora (63.8%), Chiapas (35.1%), Hidalgo (28.2%), Querétaro (28.1%), Tlaxcala (27.7%), Chihuahua (27%) y Estado de México (10.9%) (Mejía et al., 2012; Mejía et al., 2013).

También se han reportado casos en humanos con evidencia serológica contra *C. burnetii*, dos casos de hepatitis granulomatosa en hombres de 35 y 49 años (Olivos et al. 2013; Canudas et al. 1997), un caso de endocarditis en una niña (Sánchez et al. 1998), así como reportes con evidencia serológica contra *C. burnetii* en personas que han tenido contacto con animales domésticos o con signos sugestivos de la enfermedad (Meléndez et al. 2012; Santamaría. 2009).

III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que existen indicios que sugieren que el agente causal de la fiebre Q y coxielosis está circulando desde hace varios años en el territorio nacional, el considerar a la enfermedad como exótica limita la adopción de herramientas diagnósticas como el aislamiento mediante cultivo celular o incluso, la compra de pruebas diagnósticas de tipo serológico. Esta situación impide la detección de animales infectados y facilita la posibilidad de establecer diagnósticos erróneos con otras enfermedades con manifestaciones clínicas similares. Se han realizado estudios de seroprevalencia de *C. burnetii* en México, pero no existe un estudio que demuestre su presencia directa en el ganado ovino. En nuestro país es necesario demostrar la presencia de este agente patógeno en casos de abortos, para de este modo implementar y estandarizar pruebas de diagnóstico rutinarias para *C. burnetii*.

IV. HIPÓTESIS

Coxiella burnetii está presente en rebaños ovinos de los estados de Aguascalientes, Querétaro, Estado de México, Morelos y Chiapas.

V. OBJETIVOS

General.

- Determinar, la presencia de ADN de *Coxiella burnetii* en casos de abortos en rebaños ovinos de los estados de Aguascalientes, Querétaro, Estado de México, Morelos y Chiapas.

Específicos.

- Estandarizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final para la detección de *C. burnetii*.
- Identificación de ADN de *C. burnetii* por medio de la PCR punto final amplificando un fragmento de la IS1111, en muestras de ovinos que han presentado aborto.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio y tamaño de la muestra

El presente estudio es de tipo observacional, descriptivo, y transversal (Ducoing, 2016). Para este estudio se utilizó el muestreo por conveniencia. Se trabajó con 180 muestras de exudado vaginal de borregas de hasta tres semanas posteriores al aborto, provenientes de rebaños con historial de abortos, las muestras con las que se trabajó fueron colectadas en los estados de Aguascalientes, Querétaro, México, Morelos y Chiapas. Los exudados se colectaron mediante hisopos estériles, los cuales se colocaron en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml con medio de conservación SPG (Sacarosa-Fosfato-Glutamina): sacarosa (74,6 g/litro); KH_2PO_4 (0,512 g/litro); K_2HPO_4 (1,27 g/litro); ácido L-glutámico (10 g/litro) y suero fetal bovino (1 g/litro). A esto se le agregó la estreptomycinina (100 $\mu\text{g/ml}$) y la gentamicina (50 $\mu\text{g/ml}$).

Extracción de ADN y estandarización de la PCR

La extracción de ADN a partir de hisopo vaginal se realizó con el kit comercial DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante. Primero se homogeneizaron los exudados vaginales y se colectaron 300 μL del medio SPG. Se añadieron 20 μL de proteinasa K y 200 μL de amortiguador AL seguido de una incubación a 56 °C por toda la noche. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 μL de etanol al 96% y se mezcló. La mezcla resultante se colocó en la columna de afinidad y se centrifugó a 6,164 x g por un minuto. A continuación, se adicionaron 500 μL de amortiguador AW1, se centrifugó a 6,164 x g por un min, después se agregaron 500 μL de amortiguador AW2 y se centrifugó a 17,554 x g por 4 min. Finalmente, para eluir el ADN se agregaron 90 μL de buffer AE, las columnas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto, y posteriormente se centrifugaron a 6,164 x g por 1 min. El ADN obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría en un NanoDrop™ One^C (Thermo Scientific™), se observó su integridad en geles de agarosa al 1%. Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

PCR

Para la detección de *C. burnetii* se utilizaron los iniciadores IS1trg-f (5'-AGAATTTCTATTTTCAAAAAAGGAGAAG-3') e IS1trg-r (5'-CGGTTCAACAATTCGGTATACAAACAA-3'), que amplifican un producto de 605 pb de la IS1111 (Bruin et al., 2011). Estos iniciadores fueron usados para la reacción de PCR usando 10 µl de ADN de cada una de las muestras (300 ng), 5 µl de solución Q, 20 µl de TopTaq Master Mix (QIAGEN) más 2.5 u de GoTaq Polymerase (PROMEGA) y 0.5 µM de cada iniciador para una reacción final de 37.5 µl. El programa que se utilizó para la amplificación del fragmento de la IS1111 de *C. burnetii* fue el siguiente: Después de un periodo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, se realizaron 33 ciclos con una desnaturalización a 94°C por 30 seg, una alineación a 57°C por 40 seg y una extensión a 72° C por 45 seg, y una extensión final a 70° C por 10 min.

Los productos de la PCR fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg) y corridos en geles de agarosa al 1% en TBE 1x y sometidos a electroforesis por 50 min a 100 V. Posteriormente fueron visualizados en un fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream). Como control positivo para la estandarización de la PCR se utilizó ADN de *C. burnetii* donado por el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia, España.

Secuenciación de muestras positivas

De las reacciones de PCR positivas a la amplificación de la IS1111 (605 pb), fueron elegidas diez de las muestras de exudado vaginal y se purificaron a partir de gel utilizando el kit comercial QIAquick® Gel Extracción (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se depositaron 90 µL de reacción de la PCR en geles de agarosa al 1 % teñidos con 4 µL de bromuro de etidio (10 mg), y fueron sometidos a electroforesis a 90 V durante 55 min. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV y se cortó la banda obtenida, la cual fue colocada en tubos de 1.5 mL, se añadieron 500 µL de buffer QG y se incubó a baño maría a 56°C por ~15 min, hasta que la agarosa se disolvió. El producto resultante se colocó en la columna de afinidad y se centrifugó a 16,278 x g por un min. A continuación, se adicionaron 750 µL de buffer PE y se

centrifugó a 16,278 x g por 2 min. Finalmente, se añadieron 35 µL de agua libre de nucleasas para eluir el ADN con una centrifugación a 16, 278 x g por 1 min. El ADN obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría en un NanoDrop™ One^C (Thermo Scientific™), y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Las muestras fueron enviadas a secuenciar a la unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizó 100 ng de ADN más 10 pmol de primer forward y reverso de manera independiente. Los productos fueron secuenciados en ambos sentidos.

Análisis de electroferogramas

Las secuencias fueron editadas en el programa BioEdit y se generó una secuencia consenso, para después ser ingresadas en la base de datos GenBank del NCBI, utilizando Blast nucleotide para buscar homologías. Se determinó la secuencia que presentó un mayor porcentaje de identidad, menor valor E y mayor porcentaje de cobertura, en ese orden de prioridad. Posteriormente cada secuencia fue sometida al servidor del GenBank para obtener números de acceso de cada secuencia y dejarlas disponibles en la base de datos.

Desarrollo del control positivo

Dos de los productos de PCR secuenciados y positivos a la IS1111 (*C. burnetii*) fueron utilizados para ser clonados y utilizados como controles positivos para la PCR punto final.

Transformación

Los dos productos de amplificación purificados de la IS1111 de ovejas fueron utilizados y clonados directamente en el plásmido pGEM-T Easy de acuerdo a las condiciones del fabricante. La reacción de ligación se realizó en un tubo de 0.6 ml en donde se depositaron 5 µl del Buffer 2x Rapid Ligation, 1 µl del vector pGEM-T Easy (10 ng), 3 µl del fragmento de la IS1111 purificado (100 ng) y 2 µl de T4 ligasa. La reacción se incubó una hora a temperatura ambiente. Finalizada la reacción de ligación se mezclaron con 100 µl de las células competentes *Escherichia coli* DH5-α. La reacción se incubó en hielo por 30 min, y la transformación se realizó mediante choque térmico en baño María a 42°C por 1 min, inmediatamente después la reacción se colocó en hielo por 2 min, después se le agregó 500 µl de medio BHI y se incubó a 37°C a 200 rpm por 1:30 h. Para la selección de clonas recombinantes se realizó mediante selección con ampicilina 100 µg/ml y selección de colonias blanco/azul. Se sembraron 50, 100 y 150 µl en cajas de agar LB con ampicilina, IPTG 100 mM y X-gal (20 µg/ml).

Extracción de plásmido

Se seleccionaron colonias blancas y azules (control negativo) y se sembraron en tubos con 10 ml de BHI con ampicilina (100 µg/µl) y se dejaron incubando a 37° C toda la noche a 200 rpm. Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 1,828 x g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y se realizó la extracción del plásmido mediante el método de lisis alcalina con el kit *PrepEase® Quick MiniSpin Plasmid Kit* (USB), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

La pastilla bacteriana fue resuspendida en 250 µL de la solución uno y se colocó en tubos de 1.5 mL. Se añadieron 250 µL de la solución de lisis y se mezcló por inversión. Finalmente se adicionaron 300 µL de la solución neutralizadora y nuevamente se mezcló por inversión. Los tubos se centrifugaron a 12,961 x g durante 5 min y el sobrenadante se colocó en las columnas de afinidad. A continuación, se centrifugaron las columnas a 12,961 x g por 1 min. Se añadieron 450 µL de solución de lavado y se centrifugaron a 12,961 x g por 4 min. Finalmente, se añadieron 50 µL de agua libre de nucleasas para eluir el ADN.

Para confirmar el tamaño aproximado del plásmido correspondiente en colonias positivas y negativas, se visualizaron los perfiles en geles de agarosa al 1% teñidos con 4 μ L de bromuro de etidio (10 mg), y fueron sometidos a electroforesis a 100 V durante 50 min. Finalmente fueron visualizados en un fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream).

Análisis de restricción

Para liberar el fragmento clonado se llevó a cabo un análisis de restricción del ADN plasmídico utilizando los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*. La reacción de digestión se incubó durante 1 h a 37°C para después ser visualizada en geles de agarosa al 1% teñidos con 4 μ L de bromuro de etidio a (10 mg), y fueron sometidos a electroforesis a 100 V durante 50 min. Posteriormente fueron visualizados en un fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream).

Secuenciación de plásmidos

Para corroborar la inserción de nuestro fragmento de interés en los plásmidos, estos también fueron enviados para su secuenciación. Se utilizó 400 ng de ADN de plásmido, y los oligonucleótidos m13/pUC reverse y T7 primer. Los productos fueron secuenciados en ambos sentidos.

Sensibilidad de la PCR

Para conocer el límite de detección de la técnica de PCR utilizando los plásmidos con el fragmento clonado de la IS1111 de oveja, el ADN plasmídico se diluyó comenzando con 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg y 10 fg. Las diluciones del plásmido fueron visualizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v).

VII. RESULTADOS

Tamaño de muestra

Se colectaron un total de 180 muestras de exudado vaginal procedentes de los estados de Morelos 60, Estado de México 51, Aguascalientes 45, Querétaro 19 y Chiapas 5 de borregas que habían presentado aborto.

Extracción de ADN y estandarización de la PCR para la detección de *C. burnetii*

Se realizó la extracción de ADN proveniente de 180 muestras obtenidas de exudado vaginal y se cuantificó para posteriormente realizar la PCR punto final. La PCR se realizó en las 180 extracciones de ADN.

Por medio de esta técnica se detectó el ADN de *C. burnetii* en el 61.1% (110/180) de las muestras de exudado vaginal (Figura 1), en donde las provenientes de los estados de Querétaro y Morelos mostraron los porcentajes más altos de 89.47% y 83.33%, respectivamente. Así mismo, en el Estado de México, Aguascalientes y Chiapas se presentaron casos positivos con el 52.94%, 33.33% y 20%, respectivamente. (Tabla 1).

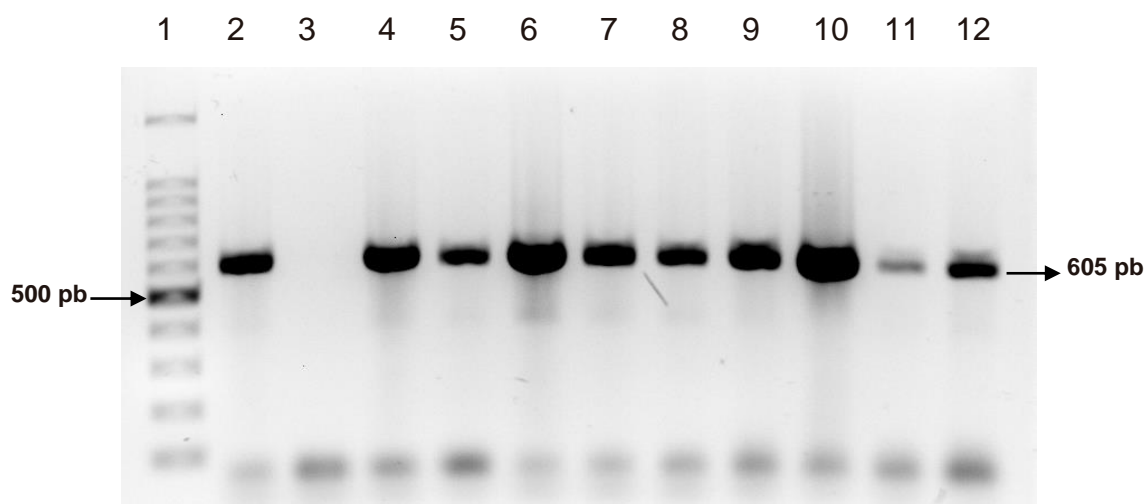


Figura 1. Amplificación del fragmento de 605 pb de la IS1111 de *C. burnetii* en muestras de exudado vaginal de borregas que presentaron aborto. Gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1) Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; 2) Control positivo *C. burnetii*; 3): Control negativo; 4-12) muestras del estado de Querétaro positivas a *C. burnetii*.

Tabla 1.- Número total de borregas muestreadas por estado y total de resultados positivos y negativos para la detección de ADN de *C. burnetii* mediante la técnica de PCR.

Estado	No. de animales	Positivos a PCR	Porcentaje de positivos	Negativos
Morelos	60	50	83.33 %	10
México	51	27	52.94 %	24
Aguascalientes	45	15	33.33 %	30
Querétaro	19	17	89.47 %	2
Chiapas	5	1	20 %	4
Total	180	110		70

Secuenciación y análisis de electroferogramas

Se purificaron 10 reacciones de PCR positivas a la IS1111 de *C. burnetii* (Figura 2 y 3), tomando en cuenta la cantidad de ADN purificado de cada una de estas reacciones se enviaron a secuenciar 6 en ambos sentidos. Las secuencias consenso fueron sometidas a la base de datos del GenBank y mediante la búsqueda de homologías con el programa BLAST nucleotide del NCBI, en tres muestras provenientes de los estados de Morelos, Querétaro y Estado de México se observó una identidad del 99.83%, 99.29% y 99.82% respectivamente con la IS1111 de una cepa de *C. burnetii* de Australia y Países Bajos aisladas de humanos, dos muestras provenientes de Morelos y Querétaro presentaron una identidad del 99.82% y 99.46% respectivamente, con una cepa de Alemania y Países bajos aisladas de cabras, otra muestra de Morelos mostró 100% con una cepa de Estados Unidos, aislada de garrapatas. Tres secuencias del estado de Morelos, dos de Querétaro y una del Estado de México procedentes de las muestras de exudado vaginal fueron registradas en el GenBank (Tabla 2).

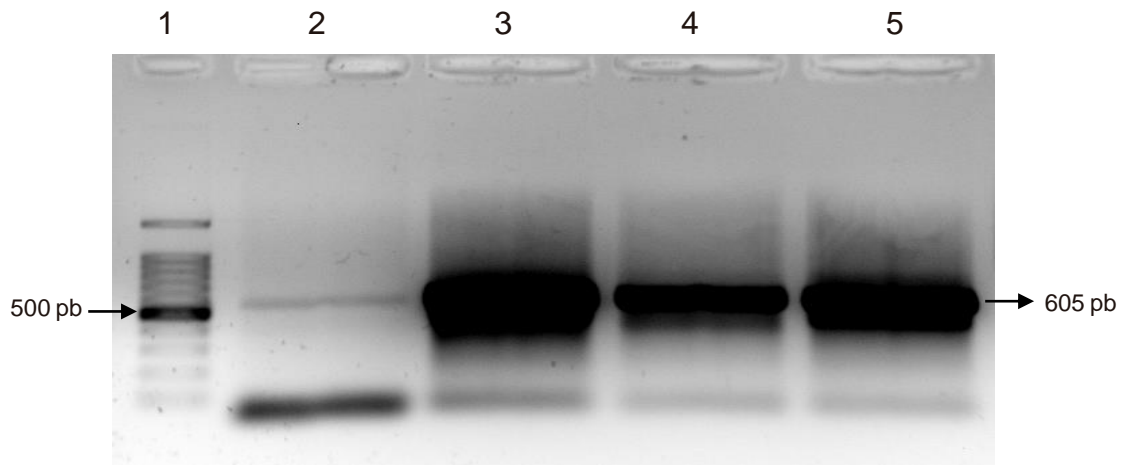


Figura 2. Productos de amplificación del fragmento de 605 pb de la IS1111 de *C. burnetii* extraídos mediante el corte del gel agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Carriles 1) Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; 2-5) Muestras positivas a *C. burnetii* para purificar.

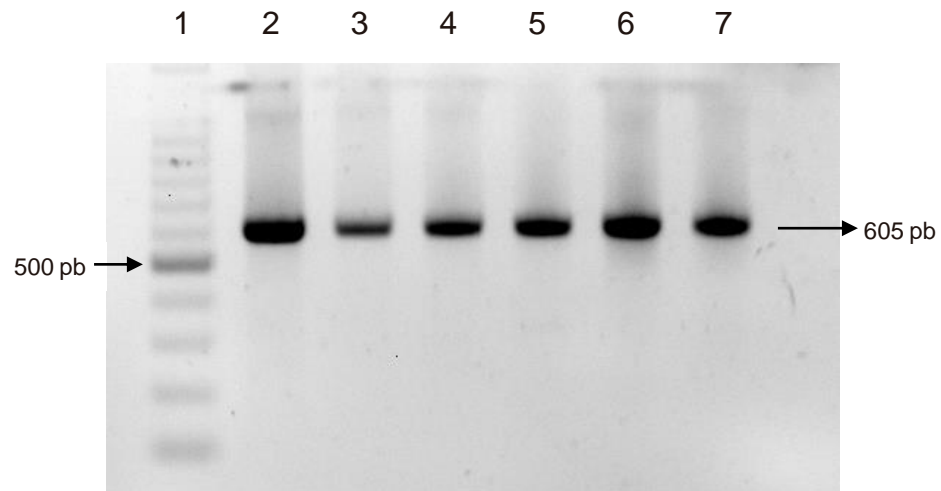


Figura 3. Fragmentos purificados de *C. burnetii* a partir de muestras de exudado vaginal. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1) Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; 2-7) Muestras positivas a *C. burnetii* purificadas.

Tabla 2. Identidad de secuencias disponibles en el GenBank con la secuencia del fragmento de la IS1111 de *C. burnetii*, utilizando BLAST de NCBI en muestras de exudado vaginal de borregas que presentaron aborto.

Secuencias de la IS1111 en borregas			Cepa de referencia		
Estado de procedencia	Número de acceso	Porcentaje identidad	GenBank	Hospedero	País
Morelos	MT070965	99.83	KT954146	Humano	Australia
Morelos	MT536351	99.82	CP018150	Cabra	Alemania
Morelos	MT536352	100	CP040059	Garrapata	EUA
Querétaro	MT536354	99.46	CP014549	Cabra	Países Bajos
Querétaro	MT536355	99.29	CP014565	Humano	Países Bajos
Estado de México	MT536356	99.82	KT954146	Humano	Australia

Desarrollo del control positivo

Una vez obtenido el producto de 605 pb correspondiente a la IS 1111 de *C. burnetii*, éste se insertó en el sitio de clonación del vector pGEM-T Easy (Figura 4) y posteriormente, se realizó la transformación de las células *E. coli*, para identificar las colonias bacterianas portadoras del plásmido con el inserto, se seleccionaron varias colonias blancas, que en primera instancia son el primer paso en la identificación de la clonación. Posteriormente se realizó la extracción de plásmidos (Figura 5), para corroborar la presencia del inserto, mediante el análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *NotI* se identificaron varias clonas con el perfil plasmídico con el producto de amplificación clonado (Figura 6).

Las clonas seleccionadas fueron cultivadas en caldo BHI con ampicilina 100 µg/ml durante 18 h a 37°C. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 1,828 x g durante 10 min, la pastilla bacteriana fue resuspendida en 3 ml de caldo BHI con ampicilina 100 µg/ml y 40% de glicerol. Se realizaron alícuotas de 1 ml y se almacenaron en criotubos a -70°C.

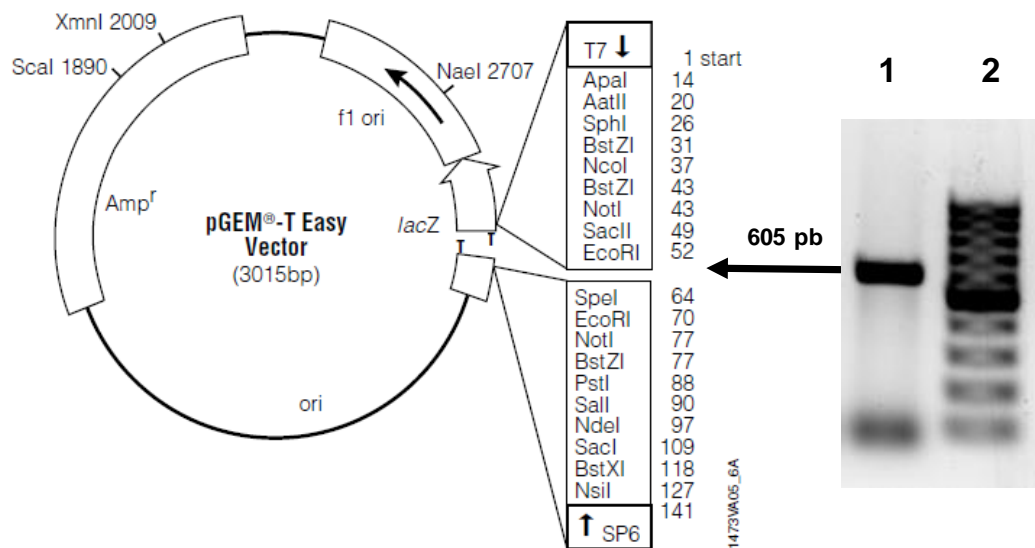


Figura 4. Clonación directa del producto de amplificación de la IS 1111 de *C. burnetii* en el plásmido pGEM-T Easy. Carril 1) Producto clonado; Carril 2) Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder.

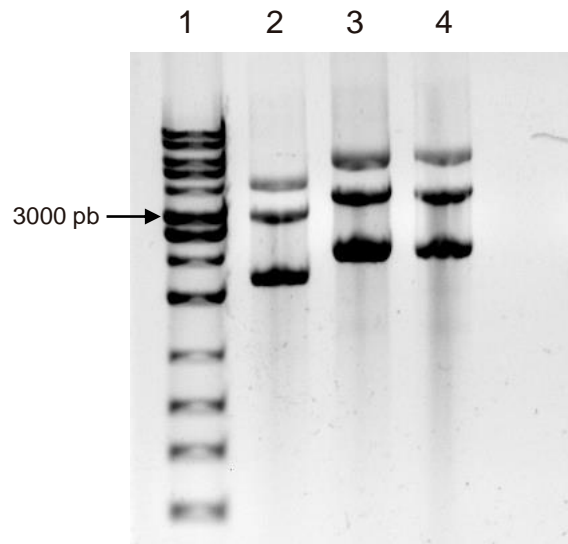


Figura 5. Perfil plasmídico de colonias blancas generadas por la clonación del producto de amplificación de la IS1111 de *C. burnetii* en el plásmido pGEM-T Easy. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1) Marcador de peso molecular 1kb DNA ladder; 2) Perfil plasmídico de una colonia azul (control negativo); 3 y 4) Perfil plasmídico de colonias blancas con el producto de amplificación clonado.

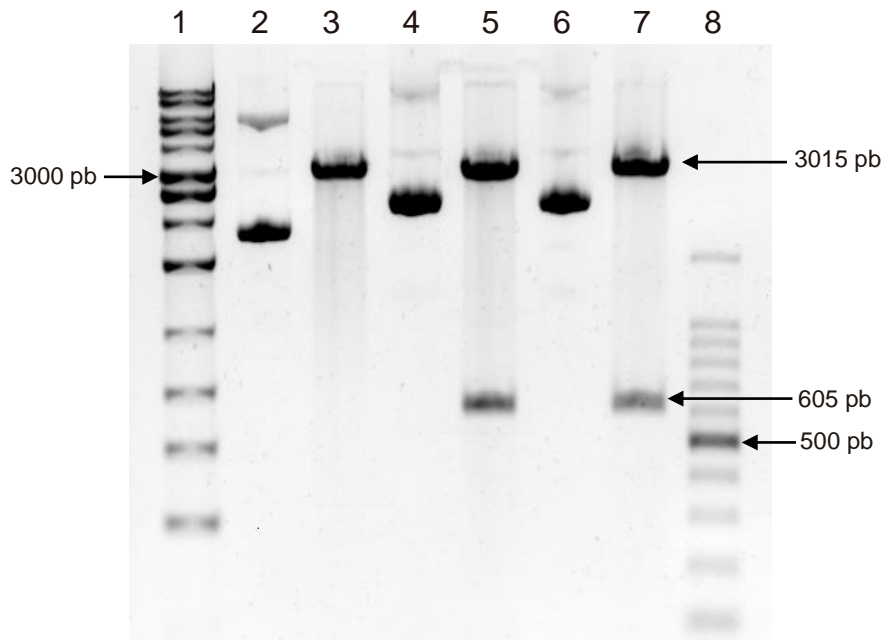


Figura 6. Análisis de restricción de plásmidos de colonias blancas. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1) Marcador de peso molecular 1 kb DNA ladder; 2) Perfil plasmídico de una colonia azul sin digerir (control negativo); 3) Plásmido de colonia azul digerido con *EcoRI*; 4) Plásmido de colonia blanca sin digerir; 5) Plásmido de colonia blanca digerido con *EcoRI*; 6) Plásmido de colonia blanca sin digerir; 7) Plásmido de colonia blanca digerido con *NotI*; 8) Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder.

Secuenciación de plásmido

Para comprobar que la secuencia en el ADN plasmídico extraído corresponde a la IS1111, se llevó a cabo su secuenciación. El análisis BLAST de las secuencias de los plásmidos reveló un 99.83% de identidad con cepas de *C. burnetii* de cabra en Alemania (GenBank: CP018150) y de sangre de humano en Australia (KT954146).

Sensibilidad de la PCR

Para determinar el límite de detección se realizó la PCR utilizando el plásmido control comenzando con 100 ng de ADN, y como concentración ideal la de 100 fg, sin embargo, la PCR logró detectar hasta 10 fg (Figura 7).

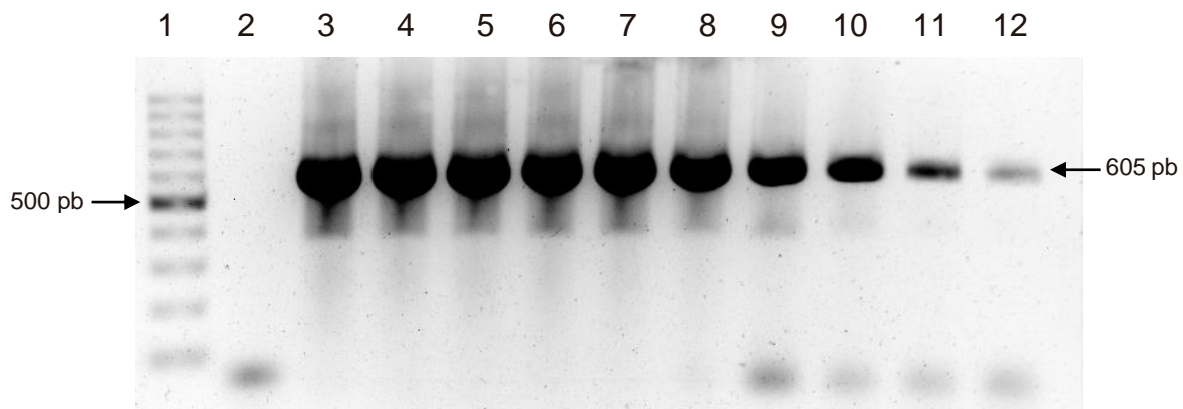


Figura 7. Límite de detección de *Coxiella burnetii* mediante la amplificación de un producto de 605 pb de la IS1111 clonado en el plásmido pGEM-T Easy. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1) Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; 2) Control negativo; 3) PCR con 100 ng de plásmido; 4) 50 ng; 5) 25 ng; 6) 10 ng; 7) 1 ng; 8) 100 pg; 9) 10 pg; 10) 1 pg; 11) 100 fg; 12) 10 fg.

VIII. DISCUSIÓN y CONCLUSIÓN

La coxielosis es un problema zoonótico en muchos países que causa pérdidas económicas significativas en las unidades de producción debido a que puede afectar el rendimiento productivo de los animales (Pexara et al. 2018). Además, existe un riesgo asociado de infección humana a través de varias vías de transmisión y las personas dedicadas a la cría de animales son particularmente vulnerables (Eldin et al. 2017).

Actualmente, el diagnóstico de *C. burnetii* tanto en humanos como en animales se determina principalmente mediante pruebas serológicas como la técnica de ELISA, CFT e IFA (Brom et al. 2015). Esta última no está disponible comercialmente para ruminantes. Estos métodos de diagnóstico que utilizan como antígenos el LPS y proteínas de superficie de *C. burnetii* (Ghaoui et al. 2019) han mostrado una sensibilidad diagnóstica del 70.1%, 29.8% y 94.8% y una especificidad del 96.2%, 96.8% y 92.5% respectivamente (Muleme et al. 2016; Wood et al. 2019).

Estos métodos tienen los inconvenientes de ser pruebas indirectas y no son capaces de diagnosticar la enfermedad en las primeras semanas de la infección además de presentar reacción cruzada con otros microorganismos (Melenotte et al. 2019). El cultivo celular requiere mucho tiempo y un laboratorio de bioseguridad nivel 3. Por otro lado, el diagnóstico clínico de *C. burnetii* en animales es complicado debido a que, solamente las hembras gestantes pueden desarrollar un cuadro clínico (Brom et al. 2015).

Los métodos basados en la PCR se dirigen especialmente a marcadores genéticos como las secuencias de los plásmidos QpH1 o QpRS, del gen isocitratodeshidrogenasa (*icd*), el gen codificador de proteínas de membrana externa *com1*, el gen superóxido dismutasa (*sod*) o la IS1111. En este estudio se eligió este último marcador genético ya que varios trabajos han demostrado que además de ser específico es el más sensible por estar presente en múltiples copias dentro del genoma de la bacteria (Willems et al. 1994; Berri et al. 2000; Bruin et al. 2011).

En México el diagnóstico de *C. burnetii* en rumiantes domésticos se ha realizado mediante la técnica serológica de ELISA indirecta (Salinas et al. 2002; Mejía et al. 2012; Mejía et al. 2013). Esta situación nos impulsó a estandarizar la técnica de la PCR, ya que se ha convertido en una herramienta útil para detectar directamente ADN de *C. burnetii* en muestras biológicas (Berri et al. 2000; Ruiz et al. 2014).

De manera adicional en este trabajo se enviaron a secuenciar los productos positivos de la PCR punto final para confirmar la presencia de *C. burnetii* y descartar los posibles falsos positivos, que se han informado se pueden presentar por el uso de iniciadores que amplifican para la IS1111 de esta bacteria (Duron. 2015).

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA. 2018) publicó el acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de los animales de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos, en dicho acuerdo la coxielosis se encuentra en la lista de enfermedades exóticas en México, lo que limita el diagnóstico y la investigación, no obstante los resultados del presente trabajo junto con los reportes previos reafirman la necesidad de reevaluar el estatus sanitario de la coxielosis, clasificarla como enfermedad endémica podría permitir la introducción de pruebas diagnósticas rutinarias como la PCR estandarizada en este trabajo. Los resultados obtenidos de muestras de exudado vaginal de borregas que presentaron aborto demostraron la presencia de *C. burnetii* en nuestro país.

En otros países, han utilizado la PCR que utiliza la IS1111 como marcador por su alta sensibilidad y especificidad (Berri et al. 2000) y se ha convertido en la herramienta de elección para demostrar la presencia de ADN de *C. burnetii* en diferentes muestras clínicas. Mediante PCR punto final, en Alemania se detectó a *C. burnetii* en el 6 % (36/600) de las muestras de leche de vaca (Lorenz et al. 1998), en Francia en el 33.33 % (6/18) de las muestras de exudado vaginal, en el 38.88 % (7/18) de las muestras de leche y en el 27% (5/18) de muestras de heces de borregas (Berri et al. 2000) y en Turquía en el 4.3 % (6/138) de las muestras de suero de bovino (Kirkan et al. 2008). Mediante PCR anidada, en Italia se detectó a *C. burnetii* en el 11.6% (16/138) y 21.5% (81/376) de los fetos abortados de bovinos y borregas, respectivamente (Parisi et al. 2006), en Portugal en tejidos de fetos o

animales adultos en el 23.53% (12/51) de cabras, 20.83% (5/24) de bovinos, 10.53% (8/76) de borregas, 11.11% (5/45) de mangostas egipcias, 12.5% (2/16) de antílopes y en la única muestra de una jirafa (Cumbassá et al. 2015), en Brasil se detectó en perros en el 5.26% (1/19) de muestras de suero y en el 12.5% (1/8) de muestras de sangre, en el 14.28% (1/7) de hisopos fecales de gato, en el 6.75% (5/74) de tejidos de roedores, en el 85.71% (6/7) de muestras de leche de cabra y en la única muestra de tejido de borrega, mientras que en las cinco muestras de exudado vaginal de cabras y en las cinco de perros no se detectó a la bacteria (Mares et al. 2018), en la India en el 7.3% (9/123) de hisopos vaginales de borregas, mientras que en las 29 muestras de hisopos vaginales de cabras no se detectó a la bacteria (Gangoliya et al. 2019).

En los Países Bajos implementando una qPCR multiplex se detectó a *C. burnetii* en el 47% (173/368) de los exudados vaginales de borregas, cabras y vacas (Bruin et al. 2011). Utilizando la qPCR, en Chile se detectó a *C. burnetii* en el 2.1 % (2/105) de las muestras de leche de vaca (Cornejo et al. 2020), en Argelia no se detectó en 184 muestras de suero de camello, mientras que en el 11.66% (7/60) de sus garrapatas estaba presente la bacteria (Bellabidi et al. 2020). La PCR punto final de este estudio detectó a *C. burnetii* amplificando un fragmento de la IS1111 en el 61.1% de las muestras de exudado vaginal de borregas que presentaron aborto.

Es probable que se detectó un porcentaje mayor de muestras positivas debido a que utilizamos muestras de exudado vaginal de borregas que presentaron aborto en quienes se ha reportado ser la vía principal de excreción, en comparación con las vacas y cabras en quienes la ruta principal de excreción es la leche (Berri et al. 2007). Además de esto los hisopos se colectaron dentro de los 20 días después del aborto en los que la bacteria se excreta en grandes cantidades (Brom et al. 2015). Por otro lado estos resultados son muy similares a los obtenidos mediante una qPCR en donde el 69% (113/163) de las muestras de fetos de borregas que presentaron aborto fueron positivas (Hazlett et al. 2013).

En México al considerarse la coxielosis una enfermedad exótica, no se cuenta con aislamientos que nos permitan tener controles positivos para nuestras pruebas diagnósticas por lo que surgió la necesidad de preparar un control positivo a través

de la clonación de la secuencia parcial de la IS1111, lo que nos permite contar con este tipo de control, evitando la dependencia tecnológica de otros países para la adquisición de controles y minimizando la ejecución de procedimientos laboriosos para obtener cepas de *C. burnetii* como controles que además deben llevarse a cabo en laboratorios de bioseguridad nivel 3 . La sensibilidad de esta PCR con el plásmido control es de 10 fg, superior a la PCR punto final validada recientemente en Ucrania para el diagnóstico de *C. burnetii*, quien mostró una sensibilidad de 370 fg de la cepa control (Marushchak et al. 2020).

En este trabajo se detectó ADN de *C. burnetii* en muestras clínicas de borregos, considerados una fuente principal de contagio de fiebre Q humana (Brom et al. 2015). En México, en el Estado de Hidalgo, segundo estado con el mayor inventario de borregos después del Estado de México (SIAP. 2018) se han reportado casos de fiebre Q diagnosticados mediante técnicas serológicas (Santamaría, 2009; Meléndez et al. 2012). El tener animales positivos a *C. burnetii* es un factor de riesgo principalmente para las personas que están en contacto estrecho con los animales y sus productos como criadores, médicos veterinarios, personal de rastros, barbacoyeros y también para personas que no tienen contacto con los pequeños rumiantes ha sido reportado, esto debido a su capacidad de propagación por el aire a grandes distancias (Ghaoui et al. 2019).

Los resultados de este trabajo de investigación confirman que *C. burnetii* está presente en México. Sin embargo, al ser considerada la coxielosis como una enfermedad exótica, no se dispone de pruebas diagnósticas validadas y aprobadas en el país que puedan ser utilizadas por los diferentes laboratorios de diagnóstico para su uso rutinario, lo que impide la detección y control de su agente etiológico.

Es una necesidad el estudio de la distribución de *C. burnetii* en el territorio nacional, ya que es probable que al estar presente en nuestro país tenga consecuencias similares a las reportadas por otros autores, de modo que, al no contar con las herramientas necesarias para su detección, las consecuencias de su introducción en México no han sido determinadas.

Este reporte confirma la presencia de *C. burnetii* en muestras clínicas de borregas que presentaron aborto en México. En conclusión, demostramos la presencia de ADN de *C. burnetii* en borregas que presentaron aborto en México mediante la estandarización de un método de PCR sensible y rápido que puede ser utilizado por diferentes laboratorios regionales de nuestro país.

Referencias:

- Angelakis, E. and Raoult, D. (2010). Q Fever. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4): 297–309.
- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim S., Dubovi, E., Schukken, Y.(2008). Association between *Coxiella burnetii* Shedding in Milk and Subclinical Mastitis in Dairy Cattle. *Veterinary Research*, 39(3): 2-9.
- Bellabidi, M., Benaissac, H., Bouafiaa, B., Harrat, B., Brahmidi, K., Kernif, T. (2020). *Coxiella burnetii* in Camels (*Camelus Dromedarius*) from Algeria: Seroprevalence, Molecular Characterization, and Ticks (Acari: Ixodidae) Vectors. *Acta Tropica*, 206: 1-7.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J., Russo, P., Rodolakis, A. (2007). Goats May Experience Reproductive Failures and Shed *Coxiella burnetii* at Two Successive Parturitions after a Q Fever Infection. *Research in Veterinary Science*, 83(1): 47–52.
- 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. *Veterinary Microbiology*, 72(3–4): 285–93.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A. (2002). Shedding of *Coxiella burnetii* in Ewes in Two Pregnancies Following an Episode of *Coxiella* Abortion in a Sheep Flock. *Veterinary Microbiology*, 85(1): 55–60.
- Boden, K., Wolf, K., Hermann, B., Frangoulidis, D. (2015). First Isolation of *Coxiella burnetii* from Clinical Material by Cell-Free Medium (ACCM2). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(5): 1017–1022.
- Bouvery, N., and Rodolakis, A. (2005). Is Q Fever an Emerging or Re-Emerging Zoonosis?. *Veterinary Research*, 36(3): 327–349.
- Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A. (2005). Effect of Vaccination with Phase I and Phase II *Coxiella burnetii* Vaccines in Pregnant Goats. *Vaccine*, 23(35): 4392–4402.
- Brom, V., Engelen, E., Roest, J., Hoek, W., Vallema, P. (2015). *Coxiella burnetii* Infections in Sheep or Goats: An Opinionated Review. *Veterinary Microbiology*, 181(1–2): 119–129.
- Bruin, A., Groot, A., Heer, L., Bok, J., Wielinga, P., Hamans, M., Rottedarm, B., Janse, I. (2011). Detection of *Coxiella burnetii* in Complex Matrices by Using Multiplex Quantitative PCR during a Major Q Fever Outbreak in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(18): 6516–6523.
- Canudas, G., Vega, R., Nellen, H., Lisker, H., Fernando, L., Laredo, S. (1997). Granulomatous Hepatitis Caused by Q Fever. *Gaceta medica de Mexico*,

133(5): 475–477

- Cornejo, J., Araya, P., Ibáñez, D., Hormazabal, J., Retamal, P., Fresno, M., Herve, L., Lapierre, L. (2020). Identification of *Coxiella burnetii* in Tank Raw Cow Milk: First Findings from Chile. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(3): 228–230.
- Connor, B., Tribe, I., Givney, R. (2015). A Windy Day in a Sheep Saleyard: An Outbreak of Q Fever in Rural South Australia. *Epidemiology and Infection*, 143(2): 391–398.
- Cumbassá, A., Barahonaa, J., Cunhaa, V., Azórin, B., Fonseca, C., Rosalino, L., Tilburge, J., Hagene, F., Santos, S., Botelho, A. (2015). *Coxiella burnetii* DNA Detected in Domestic Ruminants and Wildlife from Portugal. *Veterinary Microbiology*, 180(1–2): 136–141.
- Denison, A., Thompson, H., Massung, R. (2007). IS1111 Insertion Sequences of *Coxiella burnetii*: Characterization and Use for Repetitive Element PCR-Based Differentiation of *Coxiella burnetii* Isolates. *BMC Microbiology*, 7(91): 1-8.
- Ducoing, W. (2016): *Estadística para veterinarios y zootecnistas*, edit. Newton edición y tecnología educativa, 548 pg.
- Duron O. (2015) The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. *FEMS Microbiol Lett.* 362 (17), 1-8.
- EFSA. (European Food Safety Authority) (2010). Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Q Fever EFSA Journal, 8(5):1595.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J., Maurin, M., Raoult, D. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection a paradigm Change. *Clinical microbiology reviews*, 30(1): 115-190.
- Gangoliya, S., Kumar, S., Alam, S., Sharma, H., Singh, M., Kotwal, S., Berri, M., Kamboj, D. (2019). First Molecular and Serological Evidence of *Coxiella burnetii* Infection among Sheep and Goats of Jammu Province of India. *Microbial Pathogenesis* 130(February): 100–103.
- Georgiev, M., Alfonso, A., Neubauer, H., Needham, H., Thiery, R., Rodolakis, A., Roest, H., Stark, K., Stegeman, J., Vellema, P., Hoek, W., More, S. (2013). Q Fever in Humans and Farm Animals in Four European Countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill*, 18(8): 1-13.
- Ghaoui H., Achour N., Saad A., Smai A., Temim S., Bitam I. (2019). Between Livestock's and Humans, Q Fever Disease is Emerging at Low Noise. *Acta Scientific Microbiology*, 10(2): 104-132.
- Gouriet, F., Fenollar, F., Patrice, J., Drancourt, M., Raoult, D. (2005). Use of Shell-Vial Cell Culture Assay for Isolation of Bacteria from Clinical Specimens: 13 Years of Experience. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10): 4993–5002.

- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F. (2008). Prevention of *Coxiella burnetii* Shedding in Infected Dairy Herds Using a Phase I C. Burnetii Inactivated Vaccine. *Vaccine*, 26(34): 4320–4328.
- Hazlett, J., McDowall, R., DeLay, J., Stalker, M., McEwen, B., Dreumel, T., Spinato, M., Binnington, B., Slavic, D., Carman, S., Cai, H. (2013). A Prospective Study of Sheep and Goat Abortion Using Real-Time Polymerase Chain Reaction and Cut Point Estimation Shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* Infection Concurrently with Other Major Pathogens. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(3): 359–368.
- Hogerwerf, L., Brom, R., Roest, H., Bouma, A., Bellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D., Nielen, M. (2011). Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of Goats and Sheep, The Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 17(3): 379–386.
- Johnson, S., Kaneene, J., Dompok, K., Tasiame, W., Mensah, I., Afakye, K., Simpson, S., Addo, k. (2019) Seroprevalence of Q fever in cattle, sheep and goats in the volta region of ghana. *Veterinary medicine and science*, 5(3): 402-411.
- Kirkan, S., Osman, K., Tekbiyik, S., Parin, U. (2008). Detection of *Coxiella burnetii* in Cattle by PCR, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32(3): 215-220.
- Landais, C., Fenollar, F., Thuny, F., Raoult, D. (2007). From Acute Q Fever to Endocarditis: Serological Follow-Up Strategy. *Clinical Infectious Diseases*, 44(10): 1337–1340.
- Lafi, S., Talafha, A., Dalbough, M., Hailat, R., Khalifeh, M. (2020). Seroprevalence and associated risk factors of *Coxiella burnetii* (Q fever) in goats and sheep in northern Jordan. *Tropical animal health and production*, 52(4): 1553-1559.
- Lorenz, H., Jäger, C., Willems, H., Baljer, G. (1998). PCR Detection of *Coxiella burnetii* from Different Clinical Specimens, Especially Bovine Milk, on the Basis of DNA Preparation with a Silica Matrix. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11): 4234–4237.
- Mares, M., Guterres, A., Rozental, T., Ferreira, S., Lemos, R. (2018). Clinical and Epidemiological Use of Nested PCR Targeting the Repetitive Element IS 1111 Associated with the Transposase Gene from *Coxiella burnetii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1): 138–143.
- Martinov, S., Neikov, P., Popov, G. (1989). Experimental Q Fever in Sheep. *European Journal of Epidemiology*, 5(4): 428–431.
- Marushchak, V., Deriabin, N., Dedok, L., Volosyanko, E., Garcavenko, T. (2020). Development of a PCR Kit for Detection of *Coxiella burnetii* in Ukraine. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 20(2): 100–106.

- Maurin, M., and Raoult, D. (1999). Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 518.
- Mejía, S., Diaz, A., Aguilar, R., Favila, H., Palomares, R., Castañeda, R., Santillán, F., Jiménez, S., Cordova, L., Córtes, P. (2012). Estado epidemiológico de las principales enfermedades emergentes y reemergentes que afectan la producción en los estados de Querétaro y Chihuahua. *Epidemiología*. XXXVI Congreso Nacional de Buiatría. Mérida, Yucatán, México.
- Mejía, S., Diaz, A., Aguilar, R., Palomares, R., Santillán, M., Morales, P., Sánchez, P., Reyes, G., Peralta, L., Córtes, P. (2013). Enfermedades Infecciosas que afectan la producción ovina en los estados de Sonora y Chiapas. *Epidemiología*. XLIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz, México.
- Meléndez, J., Osornio, J., Del Valle, J., Cruz, A., Angeles, O., Gonzalez, J., León, A., Palacios, G., Almeida, M. (2012). What Do We Know about Q Fever in Mexico? *Revista de Investigacion Clinica*, 64(6): 541–545.
- Melenotte, C., Million M., Raoult, D. (2019): New insights in *Coxiella burnetii* infection: diagnosis and therapeutic update, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 18(1): 75-86.
- McCaul, T., and Williams, J. (1981). Developmental Cycle of *Coxiella burnetii*: Structure and Morphogenesis of Vegetative and Sporogenic Differentiations. *Journal of Bacteriology*, 147(3): 1063–1076.
- Muleme J., Stenos J., Vincent G., Wilks C., Devlin J., Nguyen C., Stevenson M., Wilks C., Firestone S. (2016). Bayesian validation of the indirect immunofluorescence assay and its superior to the enzyme-linked immunosorbent assay and the complement fixation test for detecting antibodies against *Coxiella burnetii* in goat serum. *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(3): 507-514.
- Nusinovici, S., Hoch, T., Brahim, L., Joly, A., Beaudeau, F. (2017). The Effect of Wind on *Coxiella burnetii* Transmission Between Cattle Herds: A Mechanistic Approach. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(2): 585–592.
- OIE. (2018). Manual terrestres de la OIE. Fiebre Q, 1-20. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.16_Q-fever.pdf (junio de 2020).
- Olivos, A., Manzano, R., Gutierrez, G., Chablé, L., Albores, S., Lopez, N. (2013). Granulomatous Hepatitis Caused by Q Fever: A Differential Diagnosis of Fever of Unknown Origin. *Annals of Hepatology*, 12(1): 138–141.
- Omsland, A., Crockrell, D., Howe, D., Ficher, E., Virtaneva, K., Sturdevant, D. (2009). Host Cell-Free Growth of the Q Fever Bacterium *Coxiella burnetii*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(11): 4430–34.

- Parisi, A., Fracalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Copuano, F., Sottili, R. (2006). Diagnosis of *Coxiella burnetii* Related Abortion in Italian Domestic Ruminants Using Single-Tube Nested PCR. *Veterinary Microbiology*, 118(1–2): 101–106.
- Patil, S. and Regunath, H. (2020). Q Fever. Treasure Island, StatPearls Publishing.
- Pexara, A., Solomakos, N., Govaris, A. (2018). Q Fever and Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Domestic Ruminants. *Veterinaria italiana*, 54(4): 265–279.
- Psaroulaki, A., Hadjichristodoulou, C., Loukaidis, F., Soteriades, E., Konstantinidis, A., Papastergiou, P., Ioannidou, M.C., Tselentis, Y. (2006). Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 25 (9): 576–586.
- Raoult, D., Marrie, T., Mege, J. (2005). Natural History and Pathophysiology of Q Fever. *Lancet Infectious Diseases*, 5(4): 219–226.
- Roest, H., Bossers, A., Zijderveld, F., Rebel, J., (2013). Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. *The Veterinary Quarterly*, 33 (3): 148–160.
- Ruiz, F., Gonzalez, B., Aguilar, R., Soler, J., Julian, G., Gortazar, C., Fernandez, S. (2014). Infectious Pathogens Potentially Transmitted by Semen of the Black Variety of the Manchega Sheep Breed: Health Constraints for Conservation Purposes. *Animal Reproduction Science*, 149(3–4): 152–157.
- SAGARPA (Secretaria De Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentacion) (2018). Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos. *Diario Oficial, México*. 1-13 pg.
- Salinas, M., Ramírez, A., Valdez, R., Garza, K., Durazo, F., (2002). Serologic Survey in Animals of 'Q' Fever in Nuevo Leon. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 44(2): 75–78.
- Sánchez, G., Lemus, L., Gonzalez, C., Reyes, P., Ramirez, S., Buendía, A. (1998). *Coxiella burnetii* Endocarditis. A Report of the First Case Diagnosed in Mexico. *Archivos del Instituto de Cardiología de México*, 68(4): 322–327.
- Sandoz, K., Popham, D., Bear, P., Sturdevant, D., Hansen, B., Nair, V., Heinzen, A. (2016). Transcriptional Profiling of *Coxiella burnetii* Reveals Extensive Cell Wall Remodeling in the Small Cell Variant Developmental Form. *PLoS ONE* 11(2).

- Santamaría, V. (2009). Fiebre Q En El Estado de Hidalgo, México. Reporte de Caso. *Perinatología y Reproducción Humana*, 23(1): 34–37.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2019). https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/564337/Inventario_2019_ovino.pdf. (julio de 2020).
- Terheggen, U. and Leggat, A. (2007). Clinical Manifestations of Q Fever in Adults and Children. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(3): 159–164.
- Ullah, Q., Adawy, H., Jamil, T., Jamil, H., Qureshi, Z., Saqib, M., Ullah, S., Shah, M., Khan, A., Zubair, M., Khan, I., Mertensscholz, K., Henning, K., Neubauer, H. (2019). Serological and Molecular Investigation of *Coxiella burnetii* in Small Ruminants and Ticks in Punjab, Pakistan. *International journal of environmental research and public health*, 16(21): 4271.
- Willems, H., Thiele, R., Ritter, R., Krauss, H. (1994). Detection of *Coxiella burnetii* in Cow's Milk using the Polymerase Chain Reaction (PCR). *Journal of Veterinary Medicine B*, 41: 580-587.
- Wood ,C., Muleme, M., Tan, T., Bosward, K., Gibson, J., Alawneh, J., McGowan, M., Barnes, T., Stenos, J., Perkins, N., Firestone, S., Tozer, S. (2019). Validation of an indirect immunofluorescence assay (IFA) for the detection of IgG antibodies against *Coxiella burnetii* in serum. *Preventive Veterinary Medicine*, 169: 1-8.
- Yohannes, G., Shallom, M. (2018). Review on Q Fever in Small Ruminants and Its Public Health Importance. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research* 9(1): 6914-6922.