



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**Identificación de *Coxiella burnetii*, bacteria exótica en México, mediante PCR,
en caprinos y bovinos que presentaron aborto**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Carlos Fernando Flores Pérez

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Efrén Díaz Aparicio, INIFAP

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Erika Gabriela Palomares Resendiz, INIFAP

Dr. Rigoberto Hernández Castro, SSA

Ciudad Universitaria Cd. Mx. Noviembre de 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

“Life has taught me só uma coisa...

Das Leben geht immer weiter”

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Rossy Flores y Javier Flores, mis hermanos Javier, Héctor, Marco y mi sobrina Sophia. Gracias al esfuerzo, los consejos, el apoyo y el amor incondicional de estas personas soy la mejor versión de mi. Los amo mucho, sé que están orgullosos de mi pero en realidad soy yo el que se siente orgulloso de tenerlos como familia. Todos mis logros siempre llevarán una parte de ustedes en ellos.

El presente trabajo también lleva impregnado el nombre de José Gorgonio, gracias por ser la persona que me acompaña y me ayuda a sobrellevar los baches de este camino llamado vida. Gracias por todos tus consejos, tus sugerencias, tu cariño y todo ese ánimo que me das con el objetivo de sacar siempre lo mejor de mi. Siempre nos decimos que todo pasa por algo pero ahora creo que podemos entender de una manera más específica el significado de esta frase, así que no nos queda más que disfrutar nuestro “hoy” y ser felices.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco al Dr. Efrén Díaz Aparicio por darme la oportunidad de trabajar a su lado desde mis primeros encuentros con la investigación, por compartir parte del gran conocimiento del que es acreedor y sobre todo por brindarme la confianza para llevar a cabo el presente trabajo.

Al Dr Rigoberto Hernández Castro por la paciencia, su disponibilidad para transmitir su vasto conocimiento, los cuestionamientos que me hacían dudar tanto y por el sinfín de historias que tiene para contar.

A la Dra Erika Gabriela Palomares Resendiz por haber estado siempre en la mayor disposición de ayudar, aclarar mis dudas y sacarme siempre una sonrisa con su humor tan característico.

A la MC Magda Limón por su infinita ayuda profesional, por siempre estar al pendiente.

Al Dr Miguel de la Rosa por su disponibilidad y paciencia para aclararme hasta la duda más sencilla.

Por último pero no por eso menos importante, agradezco a mi amiga MC Adriana Noriega por todo su apoyo profesional y personal. Gracias por todas aquellas ocasiones donde me jalaste las riendas y los consejos sabios que me dabas en cada paso de este hermoso camino.

La tesis fue realizada con el financiamiento del 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”. También agradezco a CONACyT por la beca que me asignó durante los cuatro semestres del posgrado.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	2
2.1. Historia	2
2.2. Agente etiológico.	2
2.3. Salud pública.....	4
2.4. Epidemiología	5
2.4.1. En el mundo.....	5
2.4.2. En México	5
2.5. Patogenia.....	8
2.6. Respuesta inmune	11
2.7. Cuadro clínico	11
2.8. Transmisión.....	12
2.9. Diagnóstico	13
2.10. Tratamiento	15
2.11. Prevención y control.....	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
IV. HIPÓTESIS.....	18
V. OBJETIVOS.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1. Tipo de estudio.....	20
6.2. Localización geográfica	20
6.3. Tamaño de la muestra	20
6.4. Obtención de las muestras	20
6.5. Extracción de ADN.....	21
6.6. PCR.....	21
6.7. Secuenciación de productos de amplificación IS1111.....	26
6.8. Clonación de productos de amplificación IS1111	26
VII. RESULTADOS.....	31
7.1. Tamaño de muestra.....	31
7.2. Clonación y desarrollo de controles positivos	31

7.3. Detección de la IS1111 de <i>C. burnetii</i> mediante PCR	38
7.4. Secuenciación de muestras positivas	38
VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	46
X. LITERATURA CITADA	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores empleados para la detección de <i>C. burnetii</i> por PCR.....	23
Cuadro 2. Componentes de la reacción de amplificación por PCR para <i>C. burnetii</i>	24
Cuadro 3. Condiciones de amplificación por PCR de <i>C. burnetii</i>	25
Cuadro 4. Componentes de la reacción de ligación del fragmento de ADN purificado con el plásmido pGEM-T.....	29
Cuadro 5. Componentes de la digestión enzimática.....	30
Cuadro 6. Número de muestras de bovinos por entidad federativa de la República Mexicana.....	32
Cuadro 7. Número de muestra de caprinos por entidad federativa de la República Mexicana.....	33
Cuadro 8. Listado de secuencias sometidas al GenBank del elemento IS1111 de <i>C. burnetii</i> obtenidas a partir de muestras vaginales positivas mediante PCR de bovinos y caprinos de la República Mexicana.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clonación directa del producto de amplificación de la secuencia de inserción IS1111 de <i>C. burnetii</i> en el plásmido pGem-T Easy.....	34
Figura 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el ADN plasmídico purificado a partir de células <i>E. coli</i> transformadas.....	35
Figura 3. Análisis con enzimas de restricción de los plásmidos derivados de colonias blancas generadas por transformación con el producto purificado y ligado a el plásmido pGEM-T Easy de un fragmento de 605 pb de la secuencia IS1111 de <i>C. burnetii</i>	36
Figura 4. Determinación del límite de detección por PCR de <i>C. burnetii</i> mediante la amplificación de un inserto de 605 pb de la IS1111 utilizando un plásmido con el inserto clonado.	37
Figura 5. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el producto de amplificación de 605 pb de la secuencia de Inserción IS1111 de <i>C. burnetii</i>	39
Figura 6. Detección de <i>C. burnetii</i> mediante PCR a partir de muestras vaginales de bovinos en la República Mexicana.....	40
Figura 7. Detección de <i>C. burnetii</i> mediante PCR a partir de muestras vaginales de bovinos en diferentes entidades federativas de la República Mexicana.....	41
Figura 8. Detección de <i>C. burnetii</i> mediante PCR a partir de muestras vaginales de caprinos en la República Mexicana.....	42
Figura 9. Detección de <i>C. burnetii</i> mediante PCR a partir de muestras vaginales de caprinos en diferentes entidades federativas de la República Mexicana.....	43
Figura 10. Purificación de productos de amplificación del fragmento de 605 pb de la secuencia de inserción IS1111 de <i>C. burnetii</i>	44

RESUMEN

La fiebre Q es una enfermedad infectocontagiosa y zoonótica considerada un problema de salud pública, que a pesar de su distribución mundial es categorizada como exótica en la República Mexicana. El agente causal de esta enfermedad es *Coxiella burnetii*, una bacteria intracelular obligada que infecta animales sin la necesidad de que desarrollen cuadro clínico exceptuando a hembras gestantes, en las cuales puede causar problemas reproductivos como abortos y mortinatos. En México, los reportes epidemiológicos son pocos; existen principalmente estudios serológicos en animales y humanos, y al menos tres casos de fiebre Q en humanos han sido reportados. Sin embargo, hasta el momento no hay estudios moleculares que demuestren que este patógeno está presente en nuestro país. El objetivo de este estudio fue identificar la presencia de *C. burnetii* en caprinos y bovinos que presentaron aborto. Se obtuvieron 323 muestras, 153 de bovinos y 170 de caprino provenientes de 15 Estados de la República. Se extrajo ADN genómico y se identificó mediante PCR punto final la secuencia de inserción IS1111 de *C. burnetii* en 33.33% (51/153) y 82.35% (149/170) de hisopados vaginales de bovinos y caprinos, respectivamente. Se lograron obtener 6 secuencias nucleotídicas que permitieron confirmar el material genético de *C. burnetii* y la especificidad de la técnica de PCR. Estos datos contribuyen a elucidar el panorama epidemiológico actual de nuestro país y son la primera evidencia molecular de que bovinos y caprinos de nuestro país pueden ser reservorios de *C. burnetii*.

Palabras claves: Fiebre Q, *Coxiella burnetii*, hisopados vaginales, PCR, IS1111, bovinos, caprinos, México, aborto.

ABSTRACT

Q fever is an infectious, contagious and zoonotic disease that is considered a public health problem, but despite its worldwide distribution it is considered as exotic in the Mexican Republic. Q fever is caused by *C. burnetii*, an obligate intracellular bacterium that infects animals that not always develop clinical signs except for pregnant females, in which reproductive failures such as abortions and stillbirths can be presented. There are a few studies in Mexico in both animal and human population that demonstrate serological evidence against *C. burnetii* and at least three human cases have been reported, but until now there is not any molecular evidence that demonstrates that this pathogen exists in our country. The aim of this study was to exhibit the presence of *C. burnetii* in goats and cattle that presented abortion. A total of 323 samples were obtained, 153 from cattle and 170 from goats coming from 15 states of the republic. Genomic DNA was extracted and the *C. burnetii* IS1111 insertion sequence was identified by endpoint PCR in 33.33% (51/153) and 82.35% (149/170) of cattle and goat vaginal swabs, respectively. It was possible to obtain 6 nucleotide sequences that allowed us to confirm the genetic material of *C. burnetii* and the specificity of the PCR. Our results contribute to elucidate the current epidemiological panorama of our country and they are the first molecular evidence that cattle and goats in our country may be reservoirs of *C. burnetii*.

Keywords: Q fever, *Coxiella burnetii*, vaginal swabs; PCR, IS1111, cattle, goats, Mexico, abortion.

I. INTRODUCCIÓN

La fiebre Q es una enfermedad causada por *Coxiella burnetii*, de distribución mundial y con características de zoonosis (González-Canudas y *col.*, 1997; Salinas-Meléndez y *col.*, 2002; Hartzell y *col.*, 2008; Mares-Guía y *col.*, 2018). Tiene como hospederos a un número importante de especies animales, tanto domésticas: vacas, ovejas, cabras, perros, gatos, conejos; como salvajes: pequeños roedores, zorros (Santamaría, 2009; Mares-Guía y *col.*, 2018); siendo el ganado bovino, ovino y caprino los principales reservorios (Araujo-Meléndez y *col.*, 2012; Van Schaik y *col.*, 2013). La mayoría de estos animales son portadores crónicos y no sufren la enfermedad, pero excretan una gran cantidad de bacterias a través de orina, heces, leche y productos del parto como líquido amniótico, placenta y abortos. Estas secreciones forman aerosoles que transmiten al microorganismo por vía aérea a la población susceptible (Santamaría, 2009; Mares-Guía y *col.* 2018). Las secreciones relacionadas con productos derivados del parto contienen alrededor de 10^9 bacterias por gramo (Salinas-Meléndez y *col.*, 2002; Araujo-Meléndez y *col.*, 2012; Roest y *col.*, 2013; Mares-Guía y *col.* 2018; Pechstein y *col.*, 2018), siendo la dosis infectante solamente una sola bacteria (Hartzell y *col.*, 2008).

Del 40% al 50% de los humanos infectados desarrollan síntomas (Hartzell y *col.*, 2008; Salinas-Meléndez y *col.*, 2012), hasta el momento se han descrito más de treinta cuadros clínicos (Hartzell y *col.*, 2008) que van desde sintomatología similar a una gripe común hasta problemas cardiacos como endocarditis (Glazunova y *col.*, 2005; Hartzell y *col.*, 2008). Al ser una enfermedad zoonótica, los casos en humanos reflejan que la bacteria circula entre la población animal (Eldin y *col.*, 2017). Debido a esto es de suma importancia diagnosticar oportunamente a los animales que pueden fungir como reservorios para determinar un estado epidemiológico más preciso de *C. burnetii*, y así tomar medidas de control y prevención en la población animal, influyendo de esta manera en mitigar los contagios a humanos.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Historia

La fiebre Q fue descrita por primera vez en 1973 por Derrick en Queensland, Australia (Hartzell y col., 2008; Eldin y col., 2016) y desde entonces ha sido encontrada alrededor del mundo (Salinas-Meléndez y col., 2002). Su nombre proviene del inglés “*Query fever*” que traducido al español significa “Fiebre de origen dudoso” (Eldin y col., 2016).

El agente causal de esta enfermedad, fue descubierto simultáneamente en Montana, EE. UU. y en Queensland, Australia, alrededor de los años treinta. Una infección en el laboratorio relacionó ambos descubrimientos. Los doctores Davis y Cox aislaron al agente etiológico de garrapatas *Dermacentor andersoni* colectadas en el arroyo Nine Mile en Montana, EE. UU.; mientras que en Australia, el Dr. Derrick fue asignado para investigar los casos de fiebre en los trabajadores del rastro de Brisbane, Queensland. Posteriormente el Dr. Cox realizó trabajos para el aislamiento de esta bacteria, que él consideraba que era un virus. El Dr. Dyer, quien era director de los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU., decidió trabajar con el agente descrito por Cox, se contagió y presentó un cuadro similar al que manifestaban los trabajadores de rastros en Australia. Debido a esto se estableció la relación y se concluyó que estos dos nuevos agentes eran el mismo y que causaban la fiebre Q (Roest y col., 2013). El nombre de *Coxiella burnetii* se determinó en honor a las investigaciones desarrolladas por el Dr. Cox (EE.UU.) y el Dr. Burnet (Australia). El Dr Cox logró cultivar al agente infeccioso en huevos embrionados y el Dr. Burnet logró aislar a la bacteria a partir de bazos de cobayos inoculados (Madariaga y col., 2003).

2.2. Agente etiológico

C. burnetii es una bacteria intracelular obligada (Van Schaik y col., 2013), aunque también es posible cultivarla en medios axénicos artificiales (Qiu y Qing, 2017; Pechstein y col., 2018). Es un bacilo muy corto de 0.2 a 0.4 μm por 0.04 a 1 μm (Eldin y col., 2017), pertenece a la subdivisión de las Gammaproteobacterias,

familia *Coxiellaceae*, orden *Legionellales* (Glazunova y col., 2005; Menadi y col., 2019) y a pesar de ser una bacteria Gram negativa (Hartzell y col., 2008) no se puede teñir con la técnica de Gram (Eldin y col., 2017).

Una propiedad notable de *C. burnetii* es su habilidad para permanecer latente durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente, incluso en condiciones extremas. Este microorganismo es resistente a la temperatura, la desecación, el choque osmótico, la luz ultravioleta y los desinfectantes químicos (Samuel, 2010; Araujo-Meléndez y col., 2012), lo que permite que sea transportado por el viento y sea capaz de producir brotes en sitios alejados del foco infeccioso inicial (Santamaría, 2009). En sangre seca puede permanecer latente hasta por 6 meses, en heces de garrapatas hasta por 19 meses (Samuel, 2010), en lana de 7 a 10 meses, en carne 1 mes, en leche hasta 40 meses y en tejidos fijados con formaldehído puede ser viable hasta por 5 meses (Eldin y col., 2017). La estabilidad de este microorganismo reside en su habilidad de transitar entre los distintos estadios de su crecimiento. La variante celular pequeña (SCV), de 0.2 a 0.5 μm de largo, es el estado que le confiere su extrema resistencia; es metabólicamente inactiva y se caracteriza por tener su cromatina condensada y una pequeña envoltura (Eldin y col., 2017). Después de la invasión a la célula hospedera ocurre el cambio de SCV a la variante celular grande (LCV), las cuales miden $>0.5 \mu\text{m}$, tienen cromatina relajada y una membrana con características de bacteria Gram negativa (Eldin y col., 2017). Dicha transformación es posible gracias a la acidificación del fagosoma, que ayuda a que *C. burnetii* se active metabólicamente (Van Schaik y col., 2013; Pechstein y col., 2018). *C. burnetii* tiene la capacidad de sobrevivir en el ambiente intracelular, lo cual es esencial para su patogenicidad (Millar, 2017). Debido a las características anteriores y su baja dosis infectiva es considerada por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) dentro de la categoría de agentes infecciosos tipo B y un agente con potencial para ser usado en bioterrorismo (Van Schaik y col., 2013).

Uno de los factores de virulencia más conocidos de *C. burnetii* es el lipopolisacárido (LPS), el cual es $\sim 1,000$ veces menos endotóxico que el de

especies entéricas como *Escherichia coli* (Roest y col., 2013; Van Schaik y col., 2013) y fue identificado después de que el microorganismo perdiera su virulencia a través de varios países. La variante lisa es virulenta y contiene el LPS completo, con antígeno O que se conoce como fase I, mientras que la variante rugosa carece del antígeno O en su LPS y se conoce como fase II (Van Schaik y col., 2013). La fase I de *Coxiella* es altamente virulenta y tiene la capacidad de replicarse en células inmunocompetentes del hospedero; por el contrario, la fase II es avirulenta y no tiene la capacidad de replicarse en este tipo de células (Roest y col., 2013). Hasta hoy no se ha podido aislar la fase II de los hospederos (Van den Brom y col., 2015). Además, *C. burnetii* cuenta con un sistema de secreción tipo 4 (SST4) denominado Dot/Icm, el cual ha sido recientemente como factor de virulencia. El sistema Dot/Icm transloca efectores del citosol bacteriano directamente al citosol de la célula hospedera, está altamente involucrado en la patogénesis de esta bacteria (Van Schaik y col., 2013) y es necesario para el desarrollo de la CCV, para la replicación intracelular y para evitar la apoptosis (Newton y Roy, 2011; Qiu y Qing Luo, 2017).

La primera secuencia del genoma de *C. burnetii* fue el de la cepa original aislada por Cox en 1938 (conocida como Nine Mile), que cuenta con 1,995,275 pares de bases. Se identificaron 29 secuencias de inserción (IS) distribuidas en el cromosoma, 21 copias de un isotipo relacionado con IS110, 1 copia IS1111, 5 IS30 y 3 ISAs1. A su vez se identificaron cuatro plásmidos: QpH1 de 36 kb, QpRS de 39 kb, QpDG de 42kb y QpDV de 33 kb (Roest y col., 2013).

2.3. Salud pública

Las enfermedades rickettsiales, como lo es la fiebre Q, se deben de considerar un serio problema de salud pública cuando no son diagnosticadas o lo son inadecuadamente (Salinas-Meléndez y col., 2002). Al ser la fiebre Q una enfermedad zoonótica, la epidemiología de la enfermedad siempre refleja circulación de la bacteria en reservorios animales y se ha asociado la época de parto de rumiantes con picos de incidencia en humanos (Madariaga y col, 2003). Sin embargo, su prevalencia es muy variable de un país a otro, debido a disparidades

epidemiológicas o si la enfermedad es o no de reporte obligatorio (Eldin y col., 2017).

2.4. Epidemiología

2.4.1. En el mundo. En años recientes, se han realizado avances en la investigación de la fiebre Q, como por ejemplo, en el papel que juega *C. burnetii* en casos de endocarditis. Al ser un microorganismo con potencial de bioterrorismo se ha considerado como una enfermedad de reporte obligatorio, con lo cual se ha revelado que esta enfermedad es más común que lo que se pensaba (Eldin y col., 2016). Esta enfermedad ha sido reportada en la mayoría de los países del mundo (Agerholm, 2013), excepto en Nueva Zelanda (Eldin y col., 2017). La mayoría de los brotes involucran un número limitado de personas, sin embargo, en los últimos años ha tenido un impacto en poblaciones numerosas, como sucedió en Países Bajos (Van Schaik y col., 2013) donde se reportaron más de 4, 000 casos entre 2007 y 2010 (Eldin y col., 2017). Después de la introducción de medidas de control como la vacunación de caprinos y ovinos, el sacrificio de hembras gestantes en hatos infectados y las mejoras en la bioseguridad por parte de los veterinarios en 2009, el número de casos reportados disminuyó a menos de 10 casos por año (Van Schaik y col., 2013).

2.4.2. En México. Las condiciones epidemiológicas que necesita *C. burnetii* para mantener su existencia en zonas endémicas, son muy similares a las que existen en México (González-Canudas y col., 1997). No obstante, al tener carácter exótico en nuestro país, desde 1994 es considerada por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) como una enfermedad de notificación obligatoria (DOF, 2018).

En México, los primeros reportes en humanos de *C. burnetii* son de evidencia serológica y datan de 1950 en la Comarca Lagunera, donde se reportó una seroprevalencia de 2.02 % (13/644) mientras que en la Ciudad de México se encontró 1.8 % (77/4298) (Silva, 1950). En 1952, se estudiaron a 45 pacientes positivos a serología contra *C. burnetii* y se encontró que la mayoría de los cuadros

clínicos que se habían desarrollado fueron diagnosticados como influenza, neumonía atípica o brucelosis (González-Canudas y col., 1997). El primer caso confirmado en humanos fue el de una niña de 10 años con problemas cardiacos, hepatomegalia y esplenomegalia. El hemocultivo fue negativo a *C. burnetii*, pero el diagnóstico fue corroborado mediante serología y hubo mejoría después de tratamiento con doxiciclina (Sahagún-Sánchez y col., 1998). El segundo caso reportado fue de un hombre de 49 años originario y residente de la Ciudad de México, sin historial clínico de haber viajado al interior de la República ni tener contacto con ganado, animales domésticos o haber consumido alimentos relacionados con la transmisión de *C. burnetii*. Los signos clínicos que presentaba eran fiebre cotidiana de 38 °C, hepatomegalia e ictericia. Las aminotransferasas se encontraron elevadas al triple de lo normal y los marcadores séricos para hepatitis A y B fueron negativos. La biopsia percutánea de hígado mostró granulomas característicos de fiebre Q distribuidos de forma irregular en el lobulillo hepático, con una vacuola central rodeada por un anillo hialino, aunque algunos carecían de vacuola central. El hemocultivo y las reacciones febriles fueron negativos, pero el diagnóstico se confirmó al encontrar anticuerpos con títulos de 1/152 positivos a *C. burnetii* para la fase II y 1/16 para la fase I. El paciente fue tratado con 500 mg de tetraciclina cada seis horas por vía oral durante 19 días; un mes después las pruebas de función hepática eran normales. En ese reporte, los autores recalcan que es importante reconsiderar dos cosas, por un lado, que la enfermedad sí está circulando en nuestro país y, que no se tienen que conjuntar los factores de riesgo que clásicamente se relacionan con fiebre Q para que esta afecte al hombre (González-Canudas y col., 1997).

En 2009, Santamaría reportó el tercer caso de fiebre Q en un hombre de 24 años, originario y radicado en Hidalgo. Dentro de la historia clínica se destaca que era empleado de una ferretería pero que tuvo contacto directo con perros, gatos, bovinos, equinos y ovinos, ya que vivía en un lugar donde había un establo. Tres meses antes de iniciar su padecimiento, el paciente hizo referencia a que su prima padeció un cuadro febril de 20 días y se curó espontáneamente. El padre del

paciente también padeció un cuadro febril, fue hospitalizado por 15 días y fue dado de alta aparentemente sano. Los signos clínicos que manifestaba el paciente fueron tos seca, diarreas, cefalea, fiebre de 39 a 40 °C de predominio vespertino, diaforesis moderada, mialgias, artralgias, hiporexia, malestar general y discreta elevación de las enzimas hepáticas AST y ALT. El diagnóstico se confirmó con la prueba serológica de inmunofluorescencia indirecta contra *C. burnetii* con elevación de anticuerpos contra fase II, lo cual establece el diagnóstico de infección aguda. El tratamiento consistió de doxiciclina a dosis de 100 mg por vía oral cada 12 h. La fiebre desapareció en los tres días posteriores y el paciente evolucionó sin secuelas hasta la curación. El autor remarca la importancia de la convivencia con animales como factor de riesgo y formula la hipótesis de que la prima y el padre del paciente también sufrieron de fiebre Q.

Los siguientes tres casos reportados fueron por Araujo-Meléndez y *col.* (2012) quienes mencionan que de marzo a mayo de 2008 se refirieron tres pacientes del Estado de Hidalgo a la Ciudad de México. Los pacientes presentaban cuadro febril, escalofríos, malestar general, leve hepatitis y dos de estos pacientes presentaban el granuloma hepático característico de fiebre Q; los tres pacientes tenían anticuerpos contra *C. burnetii* por lo que fueron diagnosticados con fiebre Q. Debido a esto los autores decidieron realizar el primer estudio piloto en nuestro país. Dado que los tres pacientes diagnosticados residían en una región ganadera del Estado de Hidalgo, el estudio se realizó en esta zona para investigar la presencia de anticuerpos en contra de *C. burnetii* en pacientes con o sin síntomas, pero con riesgo de contagio; por ejemplo, personas que tuvieran contacto directo con ganado como trabajadores de rastro, carniceros, granjeros, ovejeros y veterinarios. La detección de anticuerpos se llevó a cabo mediante ELISA y se confirmaron resultados usando inmunofluorescencia indirecta. Se reportó una seroprevalencia de 10.69 % (17/159), donde la presencia de anticuerpos en pacientes con signos clínicos fue de 47.83 % (11/23) mientras que, en pacientes sin signos clínicos pero con factores de riesgo relacionados a la infección fue de 4.41 % (6/136). Este fue el

primer estudio con el cual los autores descartan que fiebre Q sea exótica en nuestro país, y proponen que sus resultados demuestran que la enfermedad es endémica.

La primera evidencia serológica en animales fue reportada por Salman y col. (1990) en Baja California, donde obtuvieron una frecuencia en hatos lecheros del 57% (59/104) mientras que la seroprevalencia de animales positivos fue de 23% (1646/7159). En 2002, Salinas-Meléndez y col. obtuvieron en un estudio serológico, una frecuencia del 40 % (36/90) para ganado ovino, 35 % (21/60) para caprino, 28 % (126/450) para bovino productor de leche y 10 % (19/190) para bovino productor de carne en diferentes establos del Estado de Nuevo León. El último estudio que se realizó sobre este tema fue en 2012 por el grupo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), quienes determinaron la seroprevalencia de *C. burnetii* en rebaños ovinos de diferentes Estados de la República (Mejía y col. 2013), mostrando los siguientes resultados: Sonora 17.48 % (120/819); Tlaxcala 13.44 % (75/558); Querétaro 12.88 % (105/815); Estado de México 12.66 % (96/758); Chihuahua 12.10 % (112/925); Hidalgo 11.34 % (97/855) y Chiapas 6.20 % (50/591).

2.5. Patogenia

La principal vía de entrada de *C. burnetii* es mediante la inhalación de aerosoles, una vez dentro hospedero tiene tropismo hacia células fagocíticas, pero también tiene la habilidad de invadir células no fagocíticas. Su principal célula blanco al iniciar la infección son los macrófagos alveolares y después puede diseminarse a otros tejidos e invadir otro tipo de células (Samuel, 2010; Eldin y col., 2017; Pechstein y col., 2018). En cabras gestantes, *C. burnetii* tiene tropismo por trofoblastos del alantocorión (Roest y col., 2013), mecanismo que aún se desconoce, pero gradualmente más trofoblastos se infectan y el alantocorión muestra signos de inflamación (Van den Brom y col., 2015).

Para el ingreso de *C. burnetii* a la célula se necesita de la interacción receptor-ligando. El receptor celular que media la entrada es la integrina $\alpha_v\beta_3$, mientras que el ligando varía dependiendo del tipo de células, para las células fagocíticas es una

proteína con repeticiones de anquirina o motivos RGD (arginina, glicina y aspartato) y en células no fagocíticas OmpA facilita la internalización de *C. burnetii* (Madariaga y col., 2003; Samuel, 2010; Eldin y col., 2017; Pechstein y col., 2018). En ambos casos utiliza un mecanismo dependiente de actina, en células fagocíticas induce la fagocitosis, mientras que en células no fagocíticas utiliza el mecanismo *zipper* (Van Schaik y col., 2013). Debido a la naturaleza intracelular obligada de *C. burnetii* necesita una vacuola parasitófora para replicarse dentro de las células eucariotas (Samuel, 2010). Después de internalizarse, la bacteria inicia con la formación de una vacuola con características similares a un fagolisosoma denominada vacuola contenedora de *Coxiella* (CCV) (Van Schaik y col., 2013). También requiere pH ácido para sobrevivir (Pechstein y col., 2018), activar su metabolismo y replicarse (Madariaga y col., 2003; Samuel, 2010). Las enzimas lisosomales como son la catepsina D (CTSD) y la fosfatasa ácida lisosomal (ACP2) se acumulan en la CVV (Van Schaik y col., 2013) acidificando el medio y permitiendo así la diferenciación de la SCV a la LCV (Van Schaik y col., 2013). Este proceso es independiente del T4SS Dot/Icm, ya que este es funcional hasta varias horas después de que la bacteria reside en su CCV acidificada (Newton y Roy, 2011). Dependiendo del tipo de célula que infecte, *C. burnetii* se replica generacionalmente cada 15 a 30 h dentro de la vacuola (Pechstein y col., 2018) a pesar de la presencia de agentes tóxicos en la célula hospedera como son las hidrolasas, las defensinas, los radicales de óxido y el nitrógeno (Samuel, 2010), debido a los genes desintoxicantes de la bacteria que codifican para superóxido dismutasa, catalasa y fosfatasa ácida (Eldin *et. al.*, 2017; Pechstein y col., 2018). Entre las ocho horas y los dos días posteriores a la infección, la CCV crece drásticamente ocupando casi todo el volumen de la célula hospedera, esta se forma como resultado de la fusión homotípica de múltiples pequeñas CCVs y puede expandirse mediante fusión heterotípica con vesículas autofágicas, endocíticas y lisosomales (Van Schaik y col., 2013). Después de seis días post infección, la CCV está cargada con gran cantidad de LCV. La CCV madura contiene las mismas características que una CCV temprana: pH 4.5-5 y sigue teniendo la capacidad fusogénica (Van Schaik y col., 2013). La viabilidad de la célula hospedera

no se ve afectada a pesar del gran tamaño de la CCV. *C. burnetii* asegura su viabilidad de dos maneras: inhibe activamente las vías de señalización de la apoptosis e induce la producción de factores pro-supervivencia (Madariaga y col., 2003). La supervivencia de la célula hospedera es necesaria para el mantenimiento de la infección crónica. La CCV es transmitida solamente a una de las células hijas, dejando a la otra célula sin infectar, esto puede proveer a la bacteria de células libres para infectar y, por ende, promueve la infección crónica. Posteriormente *C. burnetii* es capaz de inducir apoptosis a través de la liberación de citocromo c, para promover su diseminación a las células susceptibles cercanas (Van Schaik y col., 2013). Después de infectar a las células se genera una bacteremia que dura de cinco a siete días (Woldehiwet, 2004), la cual ayuda a la diseminación sistémica hacia el hígado, el bazo, los pulmones y la médula ósea, generando granulomas (Roest y col., 2013); en animales gestantes se disemina a la placenta y a la glándula mamaria (Woldehiwet, 2004).

Los granulomas causados por *C. burnetii* están caracterizados por presentar la acumulación de células del sistema inmune como macrófagos en diferentes niveles de maduración, células epiteloideas, células gigantes y neutrófilos alrededor de un espacio céntrico libre delimitado por un anillo de fibrina, lo que se conoce como “granuloma en forma de dona”. La presencia de neutrófilos indica que juegan un papel en la defensa contra esta bacteria. Como parte de la respuesta inmune adquirida en la fase crónica los altos títulos de anticuerpos dan lugar a la formación de complejos inmunes y producen afecciones como la glomerulonefritis y lesiones leucocitoclásticas (Madariaga y col., 2003). En rumiantes, *C. burnetii* se disemina hacia la placenta y causa inflamación en el alantocorión, pero no en las vellosidades coriales que tienen relación con el intercambio de gases y de nutrientes, lo que podría explicar por qué no hay muerte fetal prematura. A diferencia de las infecciones causadas por la brucelosis y la clamidiasis, donde se presentan alteraciones en el placentoma que dan como resultado el aborto, en infecciones por *C. burnetii* solamente hay alteraciones placentarias y el feto muere después o durante la inflamación de la placenta (Van den Brom y col., 2015).

C. burnetii es capaz de inducir apoptosis a través de un efector del SST4 el cual promueve liberación de citocromo c y así asegurar su diseminación a las células susceptibles cercanas (Van Schaik *et al.*, 2013).

2.6. Respuesta inmune

En humanos, los anticuerpos anti-*C. burnetii* fase II IgM e IgG se desarrollan a las tres semanas post infección, acompañado por bajos niveles de anticuerpos anti-*C. burnetii* fase I (Roest *y col.*, 2013), los cuales aumentan después de las cuatro semanas post infección (Van den Brom *y col.*, 2015). Por otro lado, en cabras se forman anticuerpos anti-*C. burnetii* fase II IgM e IgG después de dos semanas post infección, de igual manera acompañados de bajos niveles de anticuerpos anti-*C. burnetii* fase I, e inician su aumento después de las seis semanas post infección (Roest *y col.*, 2013). Los anticuerpos contra la fase II logran lisar a las bacterias por fijación de complemento, pero no sucede así con *Coxiella* fase I (Voth y Heinzen, 2007).

Los anticuerpos fase I están dirigidos directamente contra el LPS completo, mientras que los anticuerpos fase II están dirigidos contra las proteínas de superficie de *Coxiella*, las cuales también están presentes en *Coxiella* fase I, solamente que estos anticuerpos no pueden interactuar debido a que cuentan con el LPS completo (Roest *y col.*, 2013). La respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T es necesaria para sobrellevar la infección por *C. burnetii*, por otro lado, los anticuerpos no son indispensables y pueden contribuir a causar lesiones al tejido debido a la formación de complejos inmunes. En conclusión, la inducción de una respuesta inmune celular con perfil Th1 es ideal para el control de la infección primaria de *C. burnetii* (Eldin *y col.*, 2017). Además, la respuesta inmune innata juega un papel importante en la formación de granulomas, al igual que la producción de IFN γ y TNF producido por células T (Roest *y col.*, 2013).

2.7. Cuadro clínico

En los animales regularmente no se presenta cuadro clínico, con excepción de hembras gestantes, las cuales pueden presentar aborto (Bok *y col.*, 2017), parto

prematureo, mortinato, infertilidad (Agerholm, 2013) y metritis (Roest y col., 2013). Los abortos asociados con *C. burnetii* afectan a caprinos, bovinos, ovinos y gatos al final de la gestación, hay presencia de placentitis con exudado purulento de color amarillento pero los fetos no presentan alteraciones (Roest y col., 2013; Van den Brom y col., 2015). Durante la fase aguda se puede encontrar el microorganismo en sangre, pulmones, bazo e hígado (Van den Brom y col., 2015).

En humanos, el periodo de incubación es de 21 días (Van den Brom y col., 2015). La presentación de la fiebre Q es extremadamente variable y la infección puede conducir a una seroconversión asintomática, la cual puede suceder en el 50 al 60 % de los pacientes que son infectados (Hartzell y col., 2008; Salinas-Meléndez y col., 2012). Por otro lado, para los pacientes sintomáticos se han descrito cuadros clínicos que pueden presentarse de forma aguda o crónica. El cuadro agudo varía desde sintomatología parecida a gripe con fiebre, sudoración, tos, mialgia, artralgia, náuseas, dolor abdominal, bradicardia, escalofríos hasta neumonía; también puede presentarse hepatitis y hepatoesplenomegalia (Hartzell y col., 2008; Salinas-Meléndez y col., 2012). Del uno al dos por ciento de los cuadros agudos evolucionan a cuadros crónicos, siendo personas con condiciones como el embarazo e inmunosupresión las más susceptibles a desarrollar lesiones en válvulas cardíacas, anomalías vasculares y endocarditis, la cual es manifestación más común (Hartzell y col., 2008; Van Schaik y col., 2013). A pesar de que la infección raramente desencadena la muerte, sí tiene gran significancia en cuanto a la morbilidad (Van Schaik y col., 2013).

2.8. Transmisión

Como se mencionó anteriormente la principal vía de entrada de *C. burnetii* es la inhalación de aerosoles procedentes del polvo de las granjas y de las excretas, el contacto directo con fluidos de animales infectados (Araujo-Meléndez y col., 2012) o la ingesta de productos lácteos contaminados (Salinas-Meléndez y col., 2002; Santamaría, 2009; Mares-Guía y col. 2018) mediante la vía transplacentaria (Salinas-Meléndez y col., 2002), o bien a través de heridas en la piel (Hartzell y col.,

2008). A pesar de que hay una gran frecuencia de casos de fiebre Q debido al contacto directo con animales en lugares como granjas, rastros, escuelas de veterinaria o centros de investigación (Salinas-Meléndez y col., 2002), el contagio directo no ocurre siempre y existen casos clínicos de personas que no comparten factores de riesgo, únicamente el vivir en zonas endémicas de la enfermedad. Por lo tanto, esta enfermedad no debería de considerarse ocupacional, sino ser definida como una enfermedad de riesgo en zonas endémicas (Hartzell y col., 2008).

La época del año es un factor importante; los casos de fiebre Q se dan con mayor frecuencia durante las épocas de parición en rumiantes, cuando billones de bacterias son excretadas en los productos del parto y después pueden ser fácilmente transportadas por aerosoles (Van den Brom y col., 2015).

El papel que juegan las garrapatas en la transmisión de esta enfermedad no se encuentra del todo elucidado, pero diversos autores mencionan que la distribución de las garrapatas *Rhipicephalus* (antes *Boophilus*) está relacionada con alta seroprevalencia contra *C. burnetti* en animales, lo que sugiere que las garrapatas juegan un papel importante en la transmisión (Salinas-Meléndez y col., 2002, Glazunova y col., 2005 y Pechstein y col., 2018). De igual manera, Salinas-Meléndez y col.(2002) mencionan que las heces de garrapatas infectadas están contaminadas con altas cantidades de microorganismos, por lo que se piensa que las heces se desecan, se pulverizan y pueden ser una fuente de infección para humanos y animales.

2.9. Diagnóstico

La fiebre Q suele ser una enfermedad subdiagnosticada que se confunde fácilmente con la fiebre tifoidea, la neumonía atípica y con otras enfermedades en las cuales se puedan presentar hepatitis y endocarditis. *C. burnetii* es susceptible al tratamiento antimicrobiano con quinolonas, que son frecuentemente empleados para tratar las afecciones antes mencionadas, imposibilitando el diagnóstico correcto (Santamaría, 2009).

Para el diagnóstico de la fiebre Q se requiere evidencia clínica y del agente causal mediante el aislamiento, la evidencia molecular o serológica (González-Canudas y col., 1997; Hartzell y col., 2008; Santamaría, 2009; Van Schaik y col., 2013). El aislamiento de *C. burnetii* se puede realizar durante los episodios febriles a partir de muestras de sangre u orina (Salinas-Meléndez y col., 2002), sin embargo, la mayoría de los laboratorios clínicos no realiza cultivos debido a que técnicamente es difícil y se requiere de un laboratorio de bioseguridad nivel tres (Salinas-Meléndez y col., 2002; Hartzell y col., 2008). La última técnica que se ha desarrollado para el aislamiento de *C. burnetii* es el medio de citrato de cisteína acidificado, el cual es un cultivo axénico que simula las condiciones a las que se enfrenta *C. burnetii* dentro del macrófago como pH ácido (4.5) y 2.5% de oxígeno, permitiendo un incremento de ~3 log en el número de copias de genoma después de seis días (Omsland y col. 2009). Debido a las dificultades del aislamiento, el diagnóstico actual se basa en serología, empleando la aglutinación, el ELISA y la inmunofluorescencia (Salinas-Meléndez y col., 2002), siendo este último el método más común, debido a su alta sensibilidad y especificidad, además de no presentar reacción cruzada con otras rickettsiosis (Salinas-Meléndez y col., 2002; Hartzell y col., 2008; Santamaría, 2009). Clínicamente las pruebas serológicas detectan anticuerpos contra la fase I y fase II. Los anticuerpos contra la fase II son relacionados con la enfermedad aguda, mientras que anticuerpos contra la fase I se relacionan con la enfermedad crónica. Anticuerpos contra la fase II son detectables en las primeras dos semanas post-infección en el 90% de los pacientes, el pico más alto se da a los dos meses y van disminuyendo con el tiempo, sin embargo, los títulos de IgG persisten elevados (Hartzell y col., 2008). Otros métodos para el diagnóstico incluyen la microscopía electrónica, la observación de cortes histológicos preparados con tinción de Giemsa y la presencia de anillos de fibrina en granulomas son asociados a fiebre Q, pero estos no son específicos de esta infección (Hartzell y col., 2008; Santamaría 2009; Eldin y col., 2017). Otra técnica utilizada es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que tiene la capacidad de detectar *C. burnetii* en estadios tempranos de la enfermedad, pero es limitada a

algunos laboratorios de referencia e investigación. Existen diferentes tipos de PCR, punto final, tiempo real (qPCR), anidada y multiplex, que son utilizadas para demostrar la presencia de ADN de *C. burnetii* en muestras de diferente origen como tejidos, productos del parto, hisopados vaginales, heces, suero sanguíneo, leche, así como, subproductos de origen animal como leche, queso y yogurt. Las PCRs que detectan multicopias de los genes como IS1111 son más sensibles que aquellas que solamente detectan genes de una sola copia (Roest y *col.*, 2013; Van den Brom y *col.*, 2015).

2.10. Tratamiento

La fiebre Q es una enfermedad difícil de tratar puesto que produce una gran variedad de signos clínicos. En humanos, la enfermedad aguda se debe tratar inmediatamente para evitar que el paciente desarrolle la enfermedad crónica. El tratamiento de elección es de 100 mg de doxiciclina oral cada 12 horas por 14 días, mientras que para la presentación crónica cardiaca la cirugía es la mejor opción, acompañada de doxiciclina a una dosis de 200 mg oral al día e hidroxycloquinina a una dosis de 600 mg oral al día por 18 meses (Hartzell y *col.*, 2008). Desafortunadamente, a la fecha ya hay reportes de cepas resistentes a doxiciclina (Millar, 2017).

Cuando un animal es considerado positivo debe ser removido del hato y tomar medidas de prevención y control para evitar contaminación (Van den Brom y *col.*, 2015) debido a que el efecto de antibióticos para tratar fiebre Q en animales está pobremente estudiado. Roest y *col.*(2013) y Van den Brom y *col.*(2015) mencionan que hay pocos estudios que sugieren que el tratamiento con oxitetraciclina a dosis de 20 mg por kg de peso vivo, sea efectivo para disminuir la tasa de abortos y la carga bacteriana excretada en residuos del parto; por la falta de pruebas tangibles de que el tratamiento sea funcional aunado a la prevención de resistencia antimicrobiana se sugiere no tratar animales con fiebre Q.

2.11. Prevención y control

Las medidas preventivas en rumiantes tienen como objetivo reducir las tasas de abortos y la carga bacteriana, para que de esta manera se reduzca la contaminación ambiental y se disminuya el riesgo de contagio tanto del hato como de humanos. Algunas de estas medidas incluyen tomar precauciones al momento de introducir un animal a un hato libre de *C. burnetii*, pasteurizar la leche, llevar a cabo medidas de higiene general durante el manejo de residuos del parto, recolección y eliminación de placentas y fetos; los trabajadores deben de portar ropa de protección (Van den Brom y col., 2015) y por último la detección de animales infectados, sin embargo, esta última constituye un reto porque algunos animales pueden estar infectados de forma asintomática (Eldin y col., 2017).

Otra medida de prevención que se ha tratado de implementar tanto para animales como para humanos es una vacuna contra *Coxiella* fase I, desarrollada en Australia a partir de una bacteria completa inactivada con formalina que se utiliza en humanos y animales (Madariaga y col., 2003). No obstante, su uso es controversial. Roest y col. (2013) mencionan que la vacunación es efectiva en cabras y vacas primíparas, pero no en animales que están infectados. Los inconvenientes de esta vacuna es que se necesitan laboratorios con nivel de bioseguridad tres para poder producirla, además de que es imposible diferenciar animales infectados de los animales vacunados.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El gobierno mexicano reconoce a la fiebre Q como una enfermedad exótica, que se encuentra enlistada dentro del grupo 1 de enfermedades de reporte obligatorio (Diario oficial, 2018) a pesar de que en los últimos años se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra *C. burnetii* en animales y humanos. Desde 1950 (Silva, 1950; Narváez, 1952) se han reportado evidencias serológicas y por lo menos tres casos confirmados en humanos han sido reportados en México (González-Canudas y col., 1997; Sahagún-Sánchez y col., 1998; Santamaría, 2009) mientras que en animales se han reportado seroprevalencias que van del 6% a 40% en diferentes Estados de la República Mexicana (Salinas-Meléndez y col., 2002; Mejía y col. 2012; Mejía y col., 2013). Esta evidencia serológica hace suponer que *C. burnetii* podría estar presente en México, por lo que es de suma importancia identificarla molecularmente para demostrar que se encuentra circulando en nuestro país. Al ser considerada una enfermedad exótica dentro del territorio nacional existen limitantes para realizar su diagnóstico e investigación, por lo que es necesario proveer de evidencia tajante de que la fiebre Q debe ser considerada como enzoótica y así se reconsidere el estatus zoonosario para que se puedan tomar medidas pertinentes sobre el diagnóstico, tratamiento, prevención y control; y al mismo tiempo proveer una técnica confiable que permita de manera certera identificar al microorganismo.

IV. HIPÓTESIS

Coxiella burnetii será identificada por PCR en hisopados vaginales obtenidos de vacas y cabras que presentaron aborto.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar la presencia de *Coxiella burnetii* en caprinos y bovinos que presentaron aborto mediante la amplificación por PCR de un fragmento de la secuencia de inserción IS1111.

5.2. Objetivos específicos

1. Recolectar muestras de exudado vaginal de caprinos y bovinos que han presentado aborto, procedentes de diversos Estados de la República Mexicana.
2. Obtener ADN de muestras de caprinos y bovinos que han presentado aborto.
3. Estandarizar y realizar la PCR punto final para la detección de *Coxiella burnetii* en muestras de caprinos y bovinos que han presentado aborto.
4. Enviar a secuenciación las muestras con amplificación positiva.
5. Desarrollar controles positivos a IS1111 de *Coxiella burnetii*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Tipo de estudio

La presente investigación es un estudio de tipo observacional, descriptivo, retrospectivo y transversal (Manterola y Otzen, 2014).

6.2. Localización geográfica

Las actividades de muestreo se realizaron en explotaciones caprinas y bovinas de diferentes Estados del país, en los cuales se han reportado previamente la presencia de anticuerpos contra *C. burnetii*. Los Estados en los que se obtuvieron las muestras fueron: Baja California Sur, Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz.

Las muestras fueron evaluadas en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

6.3. Tamaño de la muestra

El muestreo se realizó por conveniencia a partir de una colección de muestras del CENID-SAI, INIFAP. Al menos 150 hisopados vaginales de bovinos y 150 de caprinos fueron incluidos en el estudio.

6.4. Obtención de las muestras

Se consideraron como muestras clínicas a los hisopados vaginales obtenidos a partir de bovinos y caprinos con historial de aborto dentro de los primeros 30 días post-parto e hisopados vaginales de vacas y cabras que hubieran manifestado aborto en un periodo no mayor a 30 días de haber ocurrido. Las muestras de exudado vaginal fueron colectadas con hisopos estériles y colocados en medio de conservación SPG (Sucrosa-Fosfato-Glutamina). Todas las muestras se conservaron en refrigeración para su traslado al laboratorio de enfermedades bacterianas de los pequeños rumiantes del CENID-SAI, INIFAP y forman parte de

una colección de muestras almacenadas a -20 °C que incluye hisopados vaginales de distintas especies recolectados desde 2016 hasta 2020.

6.5. Extracción de ADN

Se utilizó el *kit* comercial *DNeasy® Blood and tissue kit* (QIAGEN) para extraer ADN a partir de hisopados vaginales. Se homogeneizaron los hisopados en Vortex y se tomaron 200 µL del medio de transporte SPG, se añadieron 20 µL de proteinasa K y 200 µL de amortiguador AL y esta mezcla se incubó a 56 °C toda la noche. Concluido el tiempo de incubación se agregaron 200 µL de etanol al 96 % y se mezcló con Vortex. La mezcla resultante se filtró en la columna por centrifugación a 8,000 rpm por 1 minuto. A continuación, se adicionaron 500 µL de amortiguador AW1, se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto, después se agregaron 500 µL de amortiguador AW2 y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos. Finalmente, se eluyó el ADN añadiendo 80 µL de agua libre de nucleasas por 1 minuto y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto. 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.

6.6. PCR

Para la detección de *C. burnetii* en muestras clínicas, se amplificó un fragmento de la secuencia de inserción múltiple IS1111. Los iniciadores utilizados fueron los reportados por Bruin y col., (2011) (cuadro 1). Los componentes y las condiciones de reacción fueron modificados de lo reportado por Bruin y col., (2011) (cuadro 2 y 3, respectivamente). Las reacciones de amplificación fueron procesadas en un termociclador Axygen® MaxyGene™-Gradient (Fisher Biotec).

Para el control negativo se utilizó solamente la mezcla de reacción de amplificación, mientras que el control positivo se creó a partir de las primeras muestras positivas. En estas el fragmento IS1111 de *C. burnetii* fue confirmado mediante secuenciación y posteriormente fue clonado en el plásmido pGEM-T. Contando con el control positivo se procedió a realizar la PCR de las demás muestras.

Los productos de la PCR fueron evidenciados en geles de agarosa al 1% en TBE 1x, sometidos a electroforesis por 50 min a 100 V, teñidos con bromuro de etidio (20 mg) y visualizados en un fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream).

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores empleados para la detección de *C. burnetii* por PCR.

Iniciador	Identificación	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto de amplificación (pares de bases)
<i>Forward</i>	IS1trg-f	AGAATTTCTATTTTCAAAAAAAGGAGAAG	605
<i>Reverse</i>	IS1trg-r	CGGTTCAACAATTCGGTATACAAACAA	

Cuadro 2. Componentes de la reacción de amplificación por PCR para *C. burnetii*.

Reactivo	Concentración final por reacción	Marca
20µL de TopTaq® Master Mix (250 unidades), equivalente a:	-	
Top Taq DNA Polymerase	3 U	QIAGEN
MgCl ₂	1.6 mM	
dNTPs	213.34 µM	
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (500 unidades)	2.5 U	PROMEGA
IS1trg-f	133 µM	BIOERCH
IS1trg-r	133 µM	BIOERCH
Solución Q 5x	0.67 x	QIAGEN
ADN muestra	≈750 ng	

Cuadro 3. Condiciones de amplificación por PCR de *C. burnetii*.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	
Desnaturalización	94	30 s	
Alineación	57	40 s	33
Extensión	72	45 s	
Extensión final	72	10 min	

6.7. Secuenciación de productos de amplificación IS1111

Las muestras positivas a *C. burnetii* se purificaron con el *kit QIAquick® gel extraction kit* (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante con algunas modificaciones. Se cargaron 90 µL de reacción de la PCR en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio (20 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 en baño María por 15 min, hasta que la agarosa se disolvió. El producto resultante se colocó en la columna del kit y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. A continuación, se adicionaron 750 µL de buffer PE y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. Finalmente, se eluyó el ADN añadiendo 35 µL de agua libre de nucleasas por 1 min y se centrifugó a 13,000 rpm 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 se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, asegurando una concentración final de 100 ng/µL del ADN y 10 pmol de iniciador en un volumen final de 16 µL. Los productos fueron secuenciados en ambos sentidos y la secuencia de nucleótidos fue generada con la Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing y analizada en un equipo Applied Biosystems 3730 DNA sequencing system (Foster City, CA, USA).

Las secuencias fueron editadas en el programa BioEdit para después ser ingresadas en la base de datos *GenBank* del NCBI, utilizando *BLAST nucleotide* para buscar similitudes. Se utilizó de molde 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 a nivel mundial en la base de datos.

6.8. Clonación de productos de amplificación IS1111

Se generaron células competentes de la cepa de *Escherichia coli* DH5-α utilizando el método de CaCl₂. Se inoculó una colonia en 10 mL de caldo LB y se incubó a 37 °C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. De este cultivo se

tomó 1 mL y se agregó a 100 mL de caldo LB y se repitieron las mismas condiciones de incubación durante 2 h. Se transfirieron 50 mL del cultivo en tubos cónicos estériles y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 400 g por 5 min a 4 °C. La pastilla resultante se resuspendió en 25 mL de MgCl₂ a 0.1 M y se incubó 30 min en hielo. Se realizó una segunda centrifugación y la pastilla obtenida se resuspendió en CaCl₂ a 0.1 M. Después de 30 min en hielo, se realizó una última centrifugación. Las bacterias se resuspendieron en 1.25 mL de CaCl₂ a 0.1 M / glicerol y se elaboraron alícuotas de 100 µL en microtubos de 1.5 mL. Las alícuotas resultantes se congelaron inmediatamente en hielo seco para almacenarse a -80 °C.

Para llevar a cabo el protocolo de transformación de células competentes mediante choque térmico, primero se preparó una reacción de ligación (cuadro 4) que se incubó toda la noche a 4 °C. Las células competentes se descongelaron en hielo y se añadieron 100 µL a la reacción de ligación y se incubó por 40 min en hielo. Posteriormente, se realizó el choque térmico en baño María a 42 °C por 1.5 min, transcurrido este tiempo se colocaron nuevamente las células en hielo. Se agregaron 500 µL de caldo BHI y se incubaron a 200 rpm por dos horas a 37 °C. Se sembraron 50 µL, 100 µL y 150 µL del cultivo en placas de agar LB complementadas con ampicilina (100 µg/µl), X-gal (20 µg/ml) e IPTG 100 mM. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C y se seleccionaron colonias blancas para su análisis y confirmación. Las colonias sospechosas se sembraron por separado en 10 mL de caldo LB con ampicilina (100 µg/µl) durante toda la noche a 37 °C a 200 rpm.

Para la confirmación de células con el inserto se llevó a cabo la extracción del ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina con el *kit PrepEase® Quick MiniSpin Plasmid Kit* (usb). Se centrifugaron los 10 mL de cada cultivo a 11,600 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por aproximadamente 30 min. Posteriormente fue resuspendido en 250 µL de solución uno y se colocó en tubos de 1.5 mL. Se añadieron 250 µL de solución dos y se mezcló por inversión. Finalmente se adicionaron 300 µL de solución tres y nuevamente se mezcló por inversión. Los tubos se centrifugaron a 11,600 rpm durante 5 min y el sobrenadante

se colocó en las columnas del kit. A continuación, se centrifugaron las columnas a 11,600 rpm por 1 min. Se añadieron 450 µL de solución AQ y se centrifugaron a 11,600 rpm por 4 min. Finalmente, se eluyó el ADN plasmídico añadiendo 50 µL de agua libre de nucleasas y centrifugando a 11,600 rpm por 1 min.

Para confirmar la inserción de fragmento de ADN en el plásmido se evaluaron colonias positivas y negativas, se visualizó la digestión del plásmido en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (20 mg), que fueron sometidos a electroforesis a 100 V durante 50 min. Finalmente fueron visualizados en un fotodocumentador Gel Logic 212 Pro (Carestream).

Para comprobar el inserto del fragmento de interés en el plásmido se llevó a cabo un análisis de restricción del ADN plasmídico, utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* (Thermo). La reacción de digestión (cuadro 5) se incubó durante 1 h a 37 °C para después ser visualizada en geles como se mencionó anteriormente.

Para conocer el límite de detección de la técnica de PCR utilizando los plásmidos con el fragmento clonado IS1111, el ADN plasmídico se diluyó comenzando con concentraciones de 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% teñidos con bromuro de etidio (20 mg), y fueron sometidos a electroforesis a 90 V durante 45 min.

Cuadro 4. Componentes de la reacción de ligación del fragmento de ADN purificado con el plásmido pGEM-T.

Reactivo	Concentración final	Marca
Buffer 2x Rapid Ligation Buffer	1 x	Promega
pGEM®-T easy vector system	50 ng	Promega
ADN muestra	100 ng	
T4 DNA Ligase (100 unidades)	2 U	Promega

Cuadro 5. Componentes de la digestión enzimática

Reactivo	Concentración final	Proveedor
Anza™ Buffer (10X)	1 x	INVITROGEN
ADN plasmídico	100 ng	
<i>EcoRI</i> o <i>NotI</i>	10 U	ThermoFisher

VII. RESULTADOS

7.1. Tamaño de muestra

Se recolectaron un total de 323 muestras, 153 procedentes de bovinos y 170 de caprinos. Las muestras de bovinos se obtuvieron de los Estados de Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Oaxaca, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas y Veracruz (cuadro 6); mientras que las de caprinos de los Estados de Baja California Sur, Chiapas, Ciudad de México, Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Querétaro, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (cuadro 7).

7.2. Clonación y desarrollo de controles positivos

Debido a la falta de controles positivos en nuestro país se realizó un protocolo de clonación para tener disponibles controles positivos a *C. burnetii*, a partir de *E. coli* transformadas. Una vez obtenido el primer producto de 605 pb correspondiente a un fragmento de la IS1111 de *C. burnetii*, se confirmó el diagnóstico mediante secuenciación y se insertó en el sitio de clonado del vector pGem-T Easy (figura 1) y posteriormente, se realizó la transformación de las células *E. coli*, de las cuales se obtuvo el ADN plasmídico. Se clonaron dos productos de amplificación de diferentes muestras de caprino positivas a *C. burnetii*. Después de la selección blanco/azul se identificaron varias colonias positivas, se purificó el plásmido y se analizaron los perfiles plasmídicos (figura 2), observando pesos moleculares mayores al plásmido control (vacío). Posteriormente se realizó un análisis de restricción de tres colonias positivas y se logró digerir e identificar el fragmento de interés (figura 3).

Para determinar el límite de detección de la PCR se utilizó el ADN plasmídico obtenido de la transformación. Se realizaron diluciones seriadas para identificar la concentración final de amplificación por PCR del ADN plasmídico. El fragmento IS1111 de *C. burnetii* clonado fue posible amplificarlo hasta con 1 fg de plásmido (figura 4), esta cantidad de plásmido se utilizó en el resto de pruebas realizadas.

Cuadro 6. Número de muestras de bovinos por entidad federativa de la República Mexicana.

Estado	Número de muestras
Chiapas	1
Ciudad de México	9
Estado de México	19
Guanajuato	4
Hidalgo	32
Jalisco	2
Oaxaca	31
Querétaro	9
Sinaloa	34
Sonora	3
Tamaulipas	2
Veracruz	7
Total	153

Cuadro 7. Número de muestra de caprinos por entidad federativa de la República Mexicana.

Estado	Número de muestras
Baja California Sur	63
Guanajuato	3
Morelos	2
Querétaro	22
Sinaloa	44
Sonora	10
Tlaxcala	12
Veracruz	14
Total	170

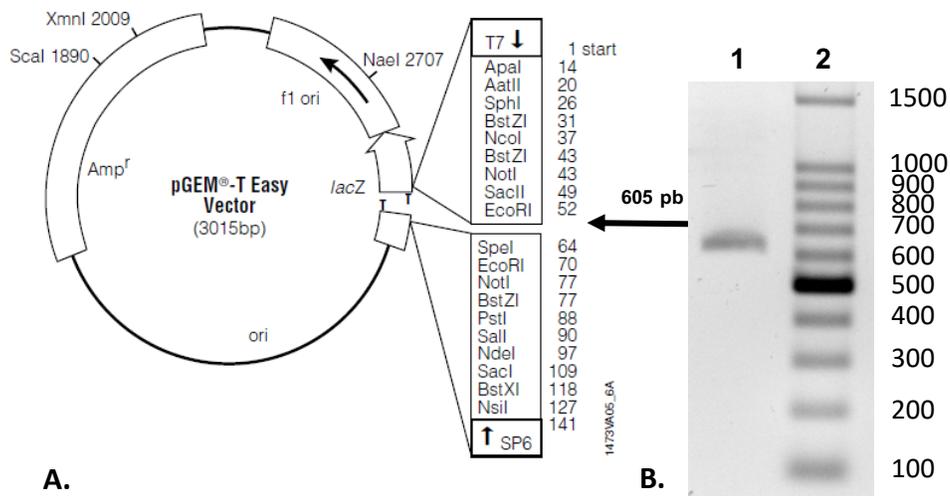


Figura 1. Clonación directa del producto de amplificación de la secuencia de inserción IS1111 de *C. burnetii* en el plásmido pGem-T Easy. A. Esquema del plásmido pGEM-T donde se observa el sitio de clonado en el gen *LacZ*. Se muestra la zona donde se insertó el fragmento aplicado por PCR de la secuencia de inserción IS1111 de *C. burnetii*. B. Gel de agarosa al 1% en el que se muestra el producto de amplificación clonado. Carril 1: muestra de caprino positiva a *C. burnetii*; carril 2: marcador de pares de bases 100 pb DNA ladder.

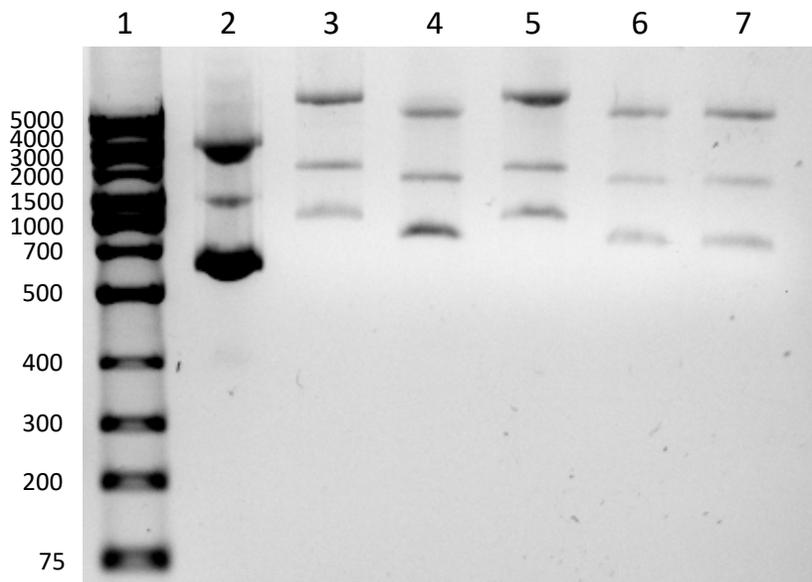


Figura 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el ADN plasmídico purificado a partir de células *E. coli* transformadas. Carril 1: marcador de pare de bases 1kb plus *DNA ladder*; carril 2: control negativo (plásmido vacío); carriles 3-7: ADN plasmídico obtenido a partir de colonias transformadas.

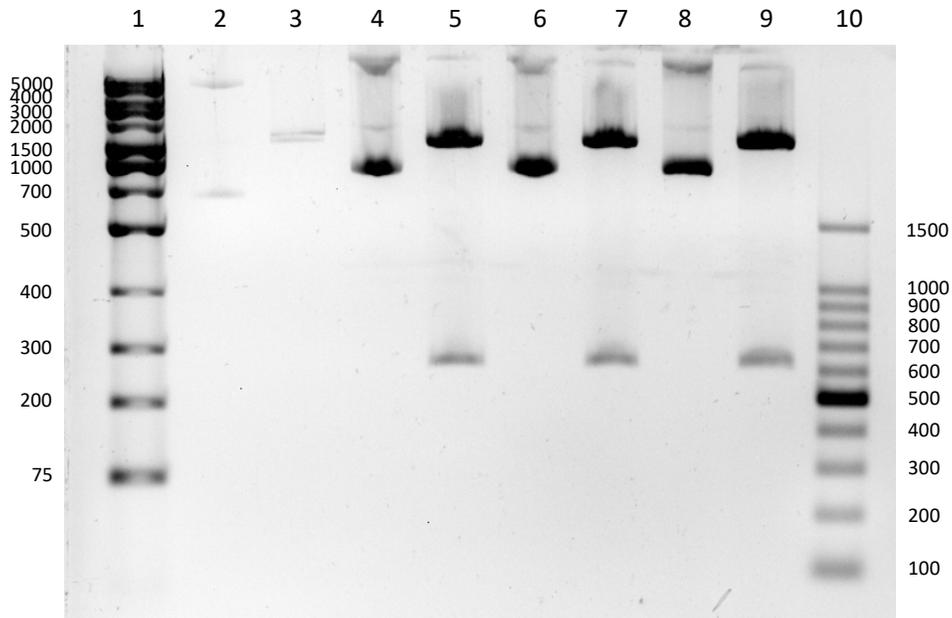


Figura 3. Análisis con enzimas de restricción de los plásmidos derivados de colonias blancas generadas por transformación con el producto purificado y ligado a el plásmido pGEM-T Easy de un fragmento de 605 pb de la secuencia IS1111 de *C. burnetii*. Carril 1: marcador de pares de bases 1kb plus *DNA ladder*; carril 2: perfil plasmídico de una colonia azul (control negativo); carril 3: perfil plasmídico de una colonia azul (control negativo) digerido con *EcoRI*; carriles 4, 6 y 8: perfil plasmídico de colonias blancas con el inserto del producto amplificado por PCR sin digerir; Carriles 5, 7 y 9: perfil plasmídico de colonias blancas con el inserto del producto amplificado por PCR digerido con *EcoRI*; carril 10: marcador de pares de bases 100 pb *DNA ladder*.

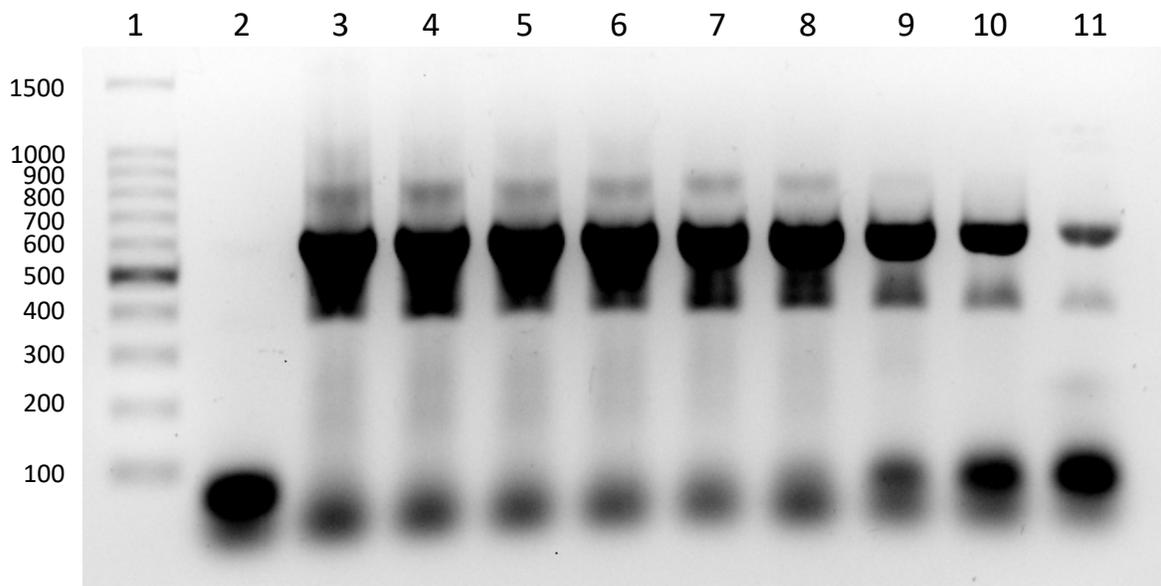


Figura 4. Determinación del límite de detección por PCR de *C. burnetii* mediante la amplificación de un inserto de 605 pb de la IS1111 utilizando un plásmido con el inserto clonado. Carril 1: marcador de pares de bases 100 pb *DNA ladder*; carril 2: control negativo; carril 3: 100 ng de plásmido; carril 4: 50 ng de plásmido; carril 5: 25 ng de plásmido; carril 6: 10 ng de plásmido; carril 7: 1 ng de plásmido; carril 8: 100 pg de plásmido; carril 9: 10 pg de plásmido; carril 10: 1 pg de plásmido; carril 11: 1 fg de plásmido.

7.3. Detección de la IS1111 de *C. burnetii* mediante PCR

Se realizó extracción de ADN de las 323 muestras recolectadas de bovinos y caprinos de la República Mexicana, a las cuales se les realizó PCR punto final (figura 5).

Por medio de PCR punto final se encontró que el porcentaje total de muestras de bovinos positivas a *C. burnetii* fue de 33.33% (51/153) (figura 6), las cuales se encuentran distribuidas en 11 de las 12 entidades federativas que fueron muestreadas (figura 7). De las 170 muestras de caprinos, 140 de ellas fueron positivas a *C. burnetii*, lo que representa un 82.35% (figura 8) distribuido en los ocho Estados que se muestrearon (figura 9).

7.4. Secuenciación de muestras positivas

Se purificaron las primeras seis muestras de ADN positivas a *C. burnetii* y se enviaron a secuenciar por el método de Sanger cuatro muestras de caprino y dos de bovinos (figura 10). Las secuencias obtenidas fueron editadas en el programa BioEdit, después se analizaron mediante la herramienta de Blastn del NCBI.

Las secuencias mostraron un porcentaje de identidad entre el 99.23 y 99.78 % con la IS1111 de diferentes cepas de *C. burnetii* aisladas de humanos y caprinos reportadas en países como Australia, Kirguistán y Estados Unidos de América (EE. UU.). Las secuencias fueron sometidas al GenBank para la asignación de números de acceso (cuadro 8).

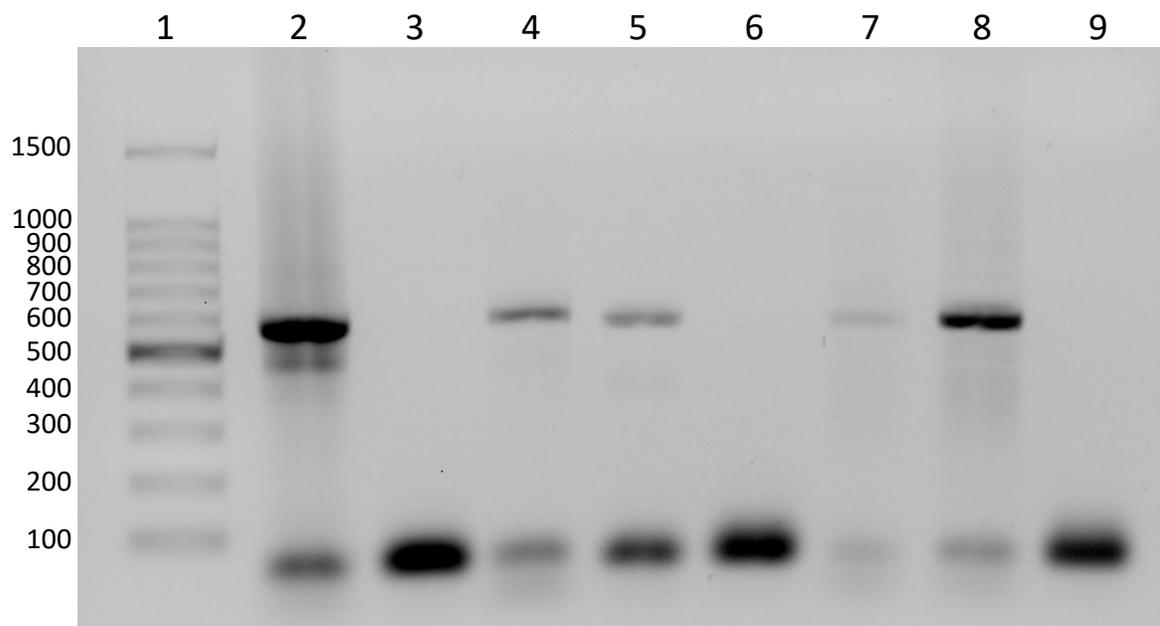


Figura 5. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa el producto de amplificación de 605 pb de la secuencia de Inserción IS1111 de *C. burnetii*. Carril 1: marcador de pares de bases 100 pb *DNA ladder*; carril 2: control positivo de *C. burnetii*; carril 3: control negativo; carriles 4 y 5: muestras de caprinos positivas a *C. burnetii*; carril 6: muestra de caprino negativa a *C. burnetii*; carriles 7 y 8: muestras de bovinos positivas a *C. burnetii*; carril 9: muestra de bovino negativa a *C. burnetii*.

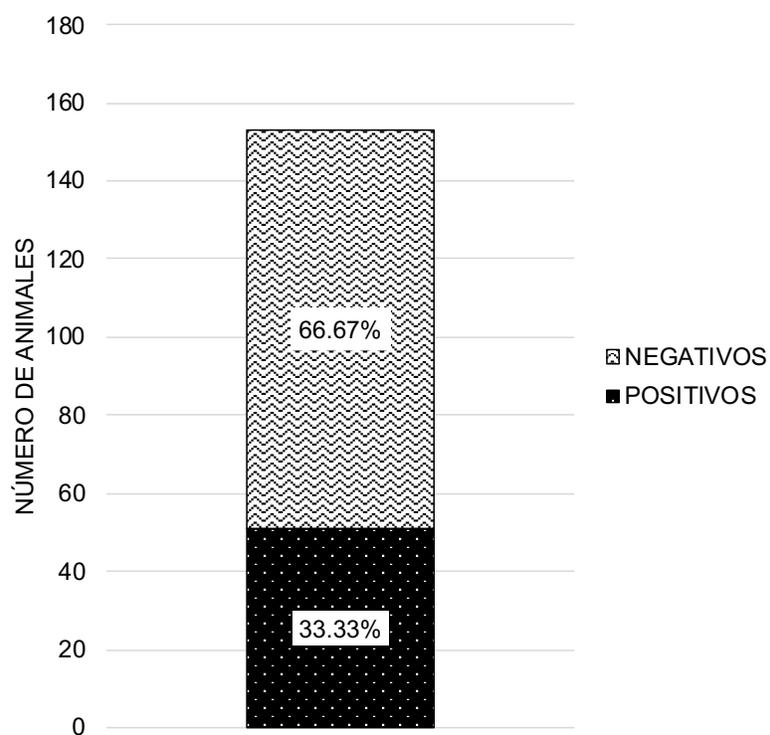


Figura 6. Detección de *C. burnetii* mediante PCR a partir de muestras vaginales de bovinos en la República Mexicana.

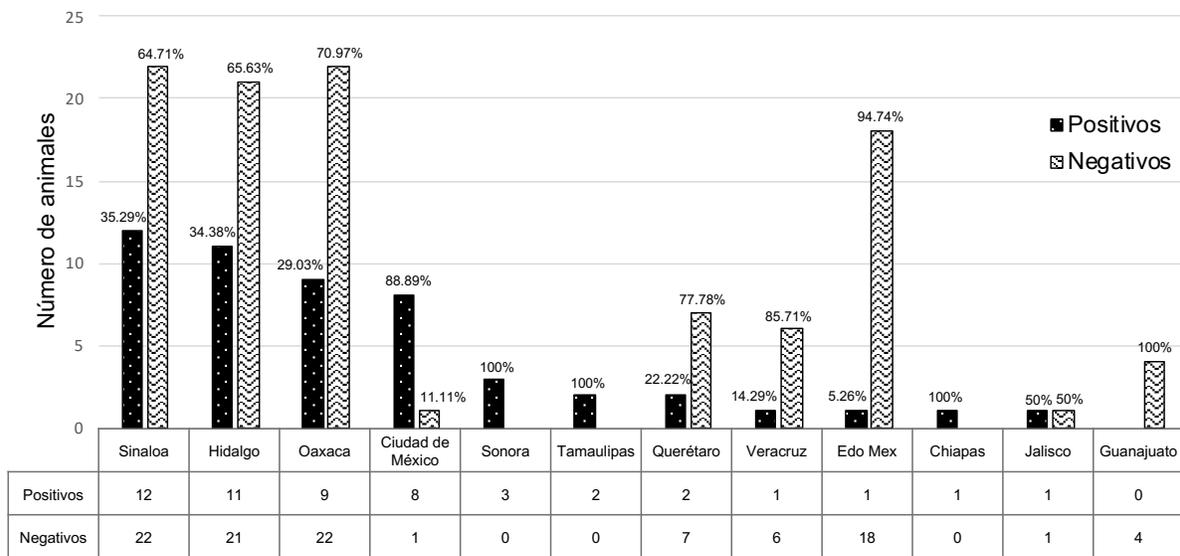


Figura 7. Detección de *C. burnetii* mediante PCR a partir de muestras vaginales de bovinos en diferentes entidades federativas de la República Mexicana.

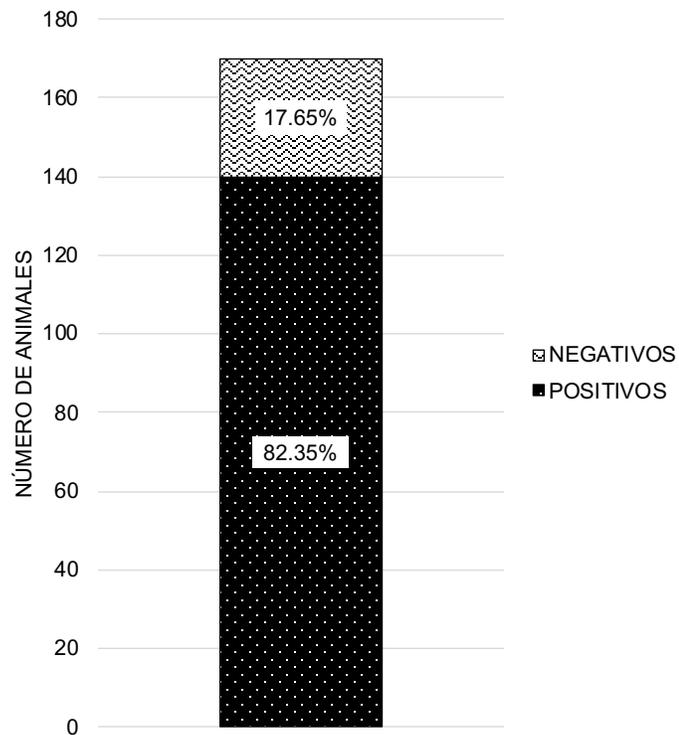


Figura 8. Detección de *C. burnetii* mediante PCR a partir de muestras vaginales de caprinos en la República Mexicana.

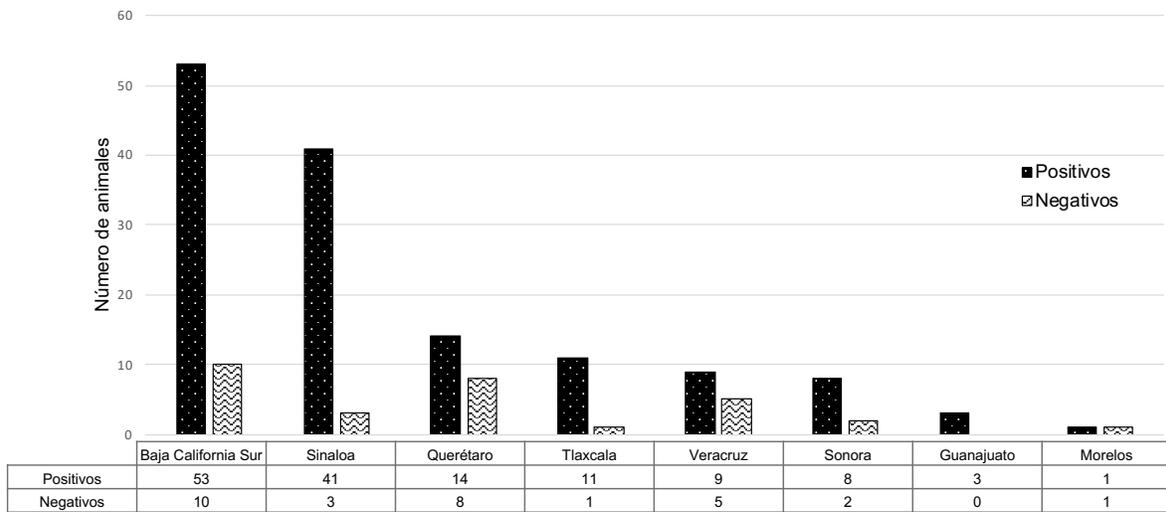


Figura 9. Detección de *C. burnetii* mediante PCR a partir de muestras vaginales de caprinos en diferentes entidades federativas de la República Mexicana.

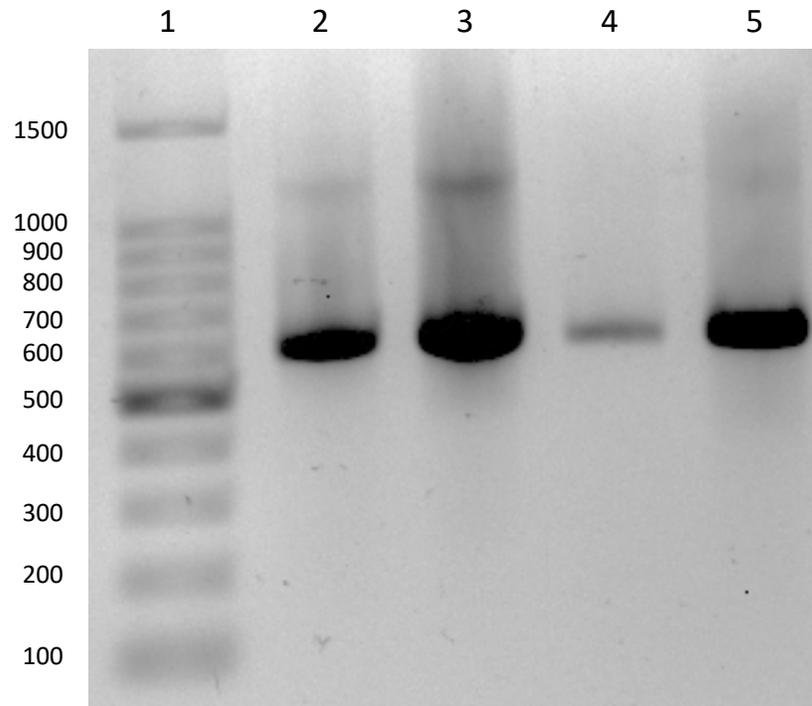


Figura 10. Purificación de productos de amplificación del fragmento de 605 pb de la secuencia de inserción IS1111 de *C. burnetii*. Carril 1: marcador de pares de bases 100 pb *DNA ladder*; carriles 2 y 3: muestras de caprinos positivas a *C. burnetii*; carriles 4 y 5: muestras de bovinos positivas a *C. burnetii*.

Cuadro 8. Listado de secuencias sometidas al GenBank del elemento IS1111 de *C. burnetii* obtenidas a partir de muestras vaginales positivas mediante PCR de bovinos y caprinos de la República Mexicana.

Identificación	Especie	Identidad	GenBank	Cepa de referencia		
				Especie	País	GenBank
INIFAP CAP01	Caprino	98.94%	MT462981	Caprino	EE. UU.	CP018150.1
INIFAP CAP04	Caprino	99.78%	MT459145	Humano	Australia	KT954146.1
INIFAP CAP06	Caprino	99.27%	MT459146	Humano	EE. UU.	CP001020.1
INIFAP CAP07	Caprino	99.27%	MT459147	Caprino	EE. UU.	CP018150.1
INIFAP BOV01	Bovino	99.65%	MT459148	Humano	Australia	KT954146.1
INIFAP BOV02	Bovino	99.23%	MT459149	Humano	Kirguistán	CP014563.1

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

A diferencia de otras enfermedades infecciosas donde el aislamiento es el estándar de oro para el diagnóstico, en el caso de la fiebre Q en humanos solamente es necesario obtener evidencia clínica sugestiva y serología positiva que comúnmente es evaluada por inmunofluorescencia (Salinas-Meléndez y col., 2002; Hartzell y col., 2008). Lo anterior es debido a las características infectocontagiosas que hacen de *C. burnetii* un microorganismo con potencial de bioterrorismo, cuyas técnicas para su aislamiento requieren incluso de un laboratorio de bioseguridad nivel tres lo que lo hace inaccesible para la mayoría de los laboratorios clínicos en países en desarrollo (Eldin y col., 2016). Por otro lado, el diagnóstico clínico de *C. burnetii* puede ser complicado, debido a que existen al menos treinta cuadros clínicos en humanos con similitud y algunos de ellos se pueden confundir fácilmente (Hartzell y col., 2008; Santamaría, 2009), mientras que en animales el diagnóstico se torna aún más complicado dado que solamente las hembras gestantes desarrollan un cuadro clínico (Agerholm, 2013; Bok y col., 2017; Roest y col., 2013). El usar solamente pruebas serológicas para el diagnóstico de *C. burnetii* en rumiantes presenta algunas desventajas. Una de ellas es que los animales requieren al menos dos semanas para crear anticuerpos (Roest y col., 2013), además, hay estudios que demuestran que entre el 25% al 39% de los caprinos que resultan seronegativos a *C. burnetii* son positivos mediante la PCR (Rousset y col., 2009) y en bovinos este porcentaje de falsos negativos puede aumentar hasta el 50% (Guatteo y col., 2007). La sensibilidad para pruebas como el ELISA e inmunofluorescencia se encuentra entre el 60% al 87% y del 66% al 97% respectivamente, mientras que la especificidad para ELISA oscila entre un 65% y 90%, y para la inmunofluorescencia presenta valores entre 95% y 100% (Slaba y col., 2005; Meekelenkamp y col., 2012). Por lo anterior la mejor herramienta para el diagnóstico de *C. burnetii* es mediante técnicas moleculares como la PCR (Boden y col., 2010; Schneeberge y col., 2010). En la actualidad se han desarrollado diferentes tipos de PCR para la detección de ADN de *C. burnetii* como la PCR anidada, PCR punto final y PCR tiempo real. Las secuencias blanco comúnmente utilizadas para detectar ADN de *C. burnetii* son secuencias plasmídicas (QpH1 o

QpRS) o genes cromosomales como los que codifican para la enzima isocitrato deshidrogenasa (*icd*), para una proteína de membrana externa (*com1*), para la enzima superóxido dismutasa (*sod*) y el gen de la transposasa en el elemento de inserción IS1111, siendo esta última una de las secuencias más utilizadas a nivel mundial debido a que en el genoma de *C. burnetii* se han reportado de 7 a 110 copias de dicha secuencia (Bruin y col., 2011; Roest y col., 2013; Van den Brom y col., 2015), lo que aumenta la sensibilidad de la prueba siendo capaz de detectar en muestras clínicas desde 10.4 copias de este elemento por reacción en la PCR (Bruin y col., 2011). Dado lo anterior, la sensibilidad de las PCRs que tienen como secuencia blanco a la IS1111 pueden alcanzar una sensibilidad que va del 70 al 99% y una especificidad del 93 al 100%, cuando la prueba se realiza a partir de hisopados vaginales (Vaidya y col., 2008; Abiri y col., 2019). Estas razones fueron las que se tomaron en cuenta en el presente estudio para estandarizar la PCR punto final como prueba diagnóstica y al elemento de inserción IS1111 como secuencia diana.

El panorama nacional actual de la fiebre Q, tanto en animales como en humanos, es un campo muy poco estudiado y la información al respecto es casi nula. A pesar de que desde 1950 se han publicado estudios de seroprevalencia en humanos y en diferentes poblaciones de animales (Silva, 1950; Narváez, 1952; Salman y col., 1990; González-Canudas y col., 1997; Salinas-Meléndez y col., 2002; Araujo-Meléndez y col., 2012; Mejía y col. 2012; Mejía y col., 2013), y además se han realizado al menos tres reportes de casos confirmados en humanos (González-Canudas y col., 1997; Sahagún-Sánchez y col., 1998; Santamaría, 2009), la SADDER considera a esta enfermedad como exótica desde 1994 (DOF, 2018). Con el antecedente de que en nuestro país ya hay reportes serológicos en los rumiantes contra *C. burnetii*, se decidió utilizar PCR punto final para obtener evidencia concluyente sobre la presencia de *C. burnetii* en la República Mexicana.

Hasta el momento no existe ningún reporte molecular en México sobre la presencia de *C. burnetii* en especie animal alguna, lo mismo sucede en los estudios realizados en los humanos. En el presente estudio se realizó la identificación molecular de *C. burnetii* a partir de muestras vaginales de bovinos y caprinos que

presentaron aborto en la República Mexicana. De las 153 muestras provenientes de bovinos, el elemento IS1111 de *C. burnetii* fue identificado en 51 muestras (33.33%), mientras que en caprinos se determinó en un 82.35% de las muestras (140/170).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo reportado en Francia por Rousset y col. (2009), donde identificaron por medio de la PCR el elemento IS1111 de *C. burnetii* en un 70% de cabras (35/50) que presentaron aborto, a partir de muestras vaginales, leche y excremento. De igual manera, Berri y col., (2007) reportaron que en un hato con problemas reproductivos, abortos y mortinatos, situado al sur de Francia, se pudo detectar la secuencia IS1111 de *C. burnetii* mediante PCR en el 84% (51/60) de muestras vaginales procedentes del seguimiento de un brote de cuatro abortos relacionados con *C. burnetii*.

En los Estados Unidos, Biggs y col., (2016) reportaron haber detectado con PCR el elemento IS1111 de *C. burnetii* en el 7% de muestras vaginales de bovinos (2/28) y el 26% en muestras de caprinos (8/31), los cuales se encontraban en una zona donde en cinco meses se habían reportado doce casos de fiebre Q en humanos. A pesar de que las muestras se tomaron después del parto de los animales, los resultados pueden ser diferentes con respecto a lo reportado, debido a que dentro de los factores de inclusión del estudio no se encontraban animales con problemas reproductivos. En el mismo sentido, pero en Países Bajos, Bruin y col., (2011) realizaron qPCR para detectar el elemento IS1111 de *C. burnetii* a partir de muestras vaginales de ovinos, caprinos y bovinos, reportando un 45% (136/300) de animales positivos. Los resultados obtenidos pueden variar a los de nuestra investigación, puesto que el muestreo fue realizado de forma aleatoria y algunos de los hatos muestreados eran considerados como libres de *C. burnetii*. En otro estudio, el cual fue realizado en Colombia por Contreras y col. (2018), se identificó la secuencia IS1111 mediante PCR en 0.6% (2/328) de hisopados vaginales provenientes de cabras. Estos resultados difieren de lo reportado en el presente estudio, debido de que su único criterio de inclusión fue que las cabras hubieran tenido al menos un parto, además no realizaron el muestreo en el periodo post parto, por lo que sugieren que la excreción de *C. burnetii* puede variar y podría ser más alta durante este periodo. En Francia, Guatteo y col. (2006) demostraron que en el

15% (46/292) de muestras vaginales de bovinos se pudo detectar el elemento IS1111 de *C. burnetii* mediante la PCR. La diferencia con nuestros resultados podría estar asociada a que al momento de realizar el muestreo solamente 46 vacas habían presentado aborto. Sin embargo, no se menciona si los 46 animales positivos correspondían a estas últimas. Por otra parte, Selim y col. (2018), reportaron en Egipto la identificación de *C. burnetii* en 16.3% (13/80) de muestras vaginales de cabras que presentaron aborto. En este trabajo utilizaron qPCR para detectar *icd*, el cual no es un marcador genético multicopia y por lo tanto se considera con una sensibilidad menor con respecto a la que detecta la secuencia IS1111, puesto que se sugiere que se necesitan al menos 13 copias de *icd* por reacción de PCR para poder detectar a *C. burnetii* (Bruin y col., 2011).

El presente y todos los estudios citados previamente contribuyen a elucidar la epidemiología de *C. burnetii* en caprinos y bovinos, quienes pueden llegar a representar un problema de salud pública puesto que son considerados como reservorios del agente. Además, se ha demostrado que los caprinos pueden excretar *C. burnetii* en fluidos vaginales y leche hasta cuatro meses post aborto o post parto (Berri y col., 2006), mientras que los bovinos lo hacen de uno a tres meses post parto (Guatteo y col., 2006). Aunado a esto, se conoce que la bacteria cuenta con características morfológicas que le permiten persistir en el ambiente durante periodos largos de tiempo (Eldin y col., 2017). Biggs y col. (2016) detectaron *C. burnetii* en 75% (6/8) de muestras ambientales como en corrales de parto, estiércol de una fosa de cadáveres y botas de los trabajadores; mientras que Bruinn y col. (2011) identificaron a esta bacteria en 54% (37/68) de muestras provenientes de superficies del establo como ventanas y muros. Una de las principales implicaciones que tienen estos reservorios en la salud pública fue enfatizada también por Biggs y col. (2016) al reportar que en el 85% (40/47) de pacientes diagnosticados con fiebre Q, durante su estudio, indicaron tener contacto cercano con rumiantes. Estos estudios aportan evidencia de la amplia distribución que tiene *C. burnetii* en el entorno y el riesgo que representa tener animales no diagnosticados correctamente.

Dado que la fiebre Q no es considerada endémica en nuestro país, su diagnóstico se dificulta enormemente debido a la imposibilidad de adquirir pruebas

serológicas de diagnóstico y la ausencia de laboratorios capacitados para emitir un diagnóstico certero. Además, el subdiagnóstico de la fiebre Q en humanos tiene como resultado un tratamiento inadecuado, lo que permite la diseminación y propagación de la enfermedad tal y como ocurre con la población animal y que finalmente repercute en el desconocimiento de la magnitud de su prevalencia en México, como lo apoyan nuestros resultados. Un ejemplo de la situación anterior es que al realizarse el diagnóstico de abortos en rumiantes, regularmente se buscan bacterias endémicas relacionadas con problemas reproductivos, como *Chlamydia* spp. o *Brucella* spp, y al resultar negativas se intuye erróneamente que el animal está sano y que el aborto puede tener etiología relacionada con condiciones nutricionales o factores ambientales. Esto permite que el animal permanezca como reservorio y sea un peligro latente para otros animales del hato y para los humanos que están en contacto con ellos.

La secuenciación de algunas muestras positivas del presente estudio confirma la presencia de *C. burnetii* en México, lo que apoya la hipótesis de que *C. burnetii* se encuentra distribuida mundialmente y que México no es la excepción. El análisis de las secuencias INIFAP CAP01 e INIFAP CAP07 muestran una identidad del 98.84 y 99.27% respectivamente con la cepa de referencia MSU Goat Q177, la cual fue aislada en 1980 a partir de una muestra de cotiledón de un aborto caprino en Montana, EE. UU. (Samuel y col., 1985; Hendrix y col., 1991; Russel-Lodrigue y col., 2009). Por otra parte, la secuencia INIFAP CAP06 tuvo una identidad del 99.27% con la cepa CbuK_Q154, una cepa de referencia aislada en 1976 de la válvula aórtica de un humano con endocarditis en Oregon, EE. UU. (Baere y col., 2009). Además, la cepa INIFAP BOV02 tuvo una identidad del 99.23% con la cepa Schperling, esta fue aislada en 1995 en Kirguistán de una muestra de sangre de un humano con un cuadro de fiebre Q agudo. Por último, para las secuencias INIFAP CAP04 e INIFAP BOV02 el porcentaje de identidad es de 99.78% y 99.65% respectivamente con la cepa AuQ31, cepa aislada en 2012 a partir de sangre de un humano con cuadro agudo de fiebre Q en Australia (Vicent y col., 2016).

Además de elucidar por primera vez el panorama de la fiebre Q en caprinos y bovinos en México, uno de los resultados más destacados de este trabajo es la

creación de controles positivos para la región genética IS1111 de *C. burnetii*. Al ser la fiebre Q una enfermedad exótica, existen demasiadas limitantes para tener acceso a la gran variedad de pruebas diagnósticas comerciales, por lo que el contar con controles positivos es una herramienta esencial para seguir realizando investigaciones que ayuden a dilucidar la epidemiología de esta enfermedad en el territorio nacional, y por otra parte, para el desarrollo y la estandarización de diferentes pruebas para el diagnóstico a nivel nacional.

Dado los resultados anteriormente expuestos y su contraste con la literatura disponible, este trabajo nos permite concluir que este es el primer reporte que demuestra mediante pruebas moleculares la presencia de *C. burnetii* en bovinos y caprinos de la República Mexicana.

Se pudo identificar mediante PCR la secuencia IS1111 de *C. burnetii* en 33.33% (51/153) de hisopados vaginales de bovinos que presentaron aborto, mientras que en caprinos se detectó este elemento en el 82.35% (149/170) de las muestras. Seis de estas muestras positivas se secuenciaron y se pusieron a disposición en el GenBank, siendo las primeras secuencias de IS1111 de *C. burnetii* en ser reportadas en bovinos y caprinos provenientes de nuestro país. Estos resultados confirmaron la especificidad de la PCR utilizada en este trabajo.

Por último, se logró obtener un control positivo para PCR al clonar el fragmento amplificado de IS1111 de *C. burnetii*, obtenido a partir de una muestra de campo de un caprino.

X. LITERATURA CITADA

- Abiri, Z., Khalili, M., Kostoulas, P., Sharifi, H., Rad, M., & Babaei, H. (2019). Bayesian estimation of sensitivity and specificity of a PCR method to detect *Coxiella burnetii* in milk and vaginal secretions in sheep and goat samples. *Journal of dairy science*, 102(6), 4954-4959.
- 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. Jueves 29 de noviembre de 2018. DIARIO OFICIAL (Primera Sección-Vespertina).
- Agerholm, J. S. (2013). *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 13.
- Araujo-Meléndez, J., Sifuentes-Osornio, J., Bobadilla-del-Valle, J. M., Aguilar-Cruz, A., Torres-Angeles, O., Ramirez-Gonzalez, J., Ponce-de-León, A., L., Ruiz-Palacios, G. M. and Guerrero-Almeida, M. L. (2012). What do we know about Q fever in Mexico *Revista de Investigación Clínica*, 64(6 Pt 1), 541-545.
- Beare, P. A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D. E., Omsland, A., Gilk, S. D., Williams, P. K, Sobral, B. W., Kupko, J. J., Porcella, S. F., Samuel, J. E., and Robert, A. H. (2009). Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infection and immunity*, 77(2), 642-656.
- Berri, M., Rousset, E., Champion, J. L., Russo, P., and 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.
- Biggs, H. M., Turabelidze, G., Pratt, D., Todd, S. R., Jacobs-Slifka, K., Drexler, N. A., McCurdy, G., Lloyd, J., Eyayold, C., Fitzpatrick, K. A., Priestley, R. A., Singleton, G., Sun, D., Tang, M., Kato, C., Kersh, G. and Anderson, A. (2016). *Coxiella burnetii* infection in a community operating a large-scale cow and goat dairy, Missouri, 2016. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 94(3), 525-531.
- Boden, K., Wagner-Wiening, C., Seidel, T., Baier, M., Bischof, W., Straube, E., and Kimmig, P. (2010). Diagnosis of acute Q fever with emphasis on enzyme-linked immunosorbent assay and nested polymerase chain reaction regarding the time of serum collection. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 68(2), 110-116.
- Bok, J., Hogerwerf, L., Germeraad, E. A., Roest, H. I., Faye-Joof, T., Jeng, M., Nwakanma, D., Secka, A., Stegeman, A., Goossens, B., Wegmüller, R., van der Sande, M. A. B., van der Hoek, W. And Secka, O. (2017). *Coxiella burnetii* (Q fever) prevalence in associated populations of humans and small ruminants in The Gambia. *Tropical medicine and international health*, 22(3), 323-331.
- Contreras, V., Gonzalez, M., Alvarez, J., and Mattar, S. (2018). *Coxiella burnetii* infection in sheep and goats: a public risk health, Colombia. *Infection*, 22(4), 173-177.

- De Bruin, A., De Groot, A., De Heer, L., Bok, J., Wielinga, P. R., Hamans, M., Van Rotterdam, B.J., and 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.
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K. D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., Vavre, F., Zenner, L., Jourdain, E., Durand, P., Aranthau, C., Renaud, F., Trape, J.F., Biguezoton, A.S, Cremaschi, J., Dietrich M., Léger, E., Appelgren, A., Dupraz, M., Gómez-Díaz, E., Diatta, G., Dayo, G.K., Adakal, H., Zoungrana, S., Vial, L., and Chevillon, C. (2015). The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS pathogens*, 11(5).
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.L., Maurin and M., Raoult, D. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 115-190.
- Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacova, E., Marrie, T., and Raoult, D. (2005). *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1211-1217.
- González-Canudas, J. A., Vega, B., Nellen-Hummel, H., Lisker-Halpert, A., and Laredo-Sánchez, F. (1997). Hepatitis granulomatosa por fiebre Q. *Gaceta Médica de México*, 133(5), 475-477.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., and Seegers, H. (2006). Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Veterinary research*, 37(6), 827-833.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., and Seegers, H. (2007). *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Veterinary research*, 38(6), 849-860.
- Hartzell, J. D., Wood-Morris, R. N., Martinez, L. J., and Trotta, R. F. (2008). Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment. In *Mayo Clinic Proceedings*, 83(5), 574-579.
- Hendrix, L. R., Samuel, J. E., and Mallavia, L. P. (1991). Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease-digested DNA separated by SDS-PAGE. *Microbiology*, 137(2), 269-276.
- Madariaga, M. G., Rezai, K., Trenholme, G. M., and Weinstein, R. A. (2003). Q fever: a biological weapon in your backyard. *The Lancet infectious diseases*, 3(11), 709-721.
- Manterola C y T Otzen. 2014. Estudios observacionales. Los diseños utilizados con mayor frecuencia en investigación clínica. *International Journal of Morphology*, 32(2), 634-645.
- Mares-Guía, M. A. M., Guterres, A., Rozental, T., Ferreira, M. D. S., and Lemos, E. R. (2018). Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. *Brazilian journal of microbiology*, 49(1), 138-143.
- Meekelenkamp, J. C. E., Schneeberger, P. M., Wever, P. C., and Leenders, A. C. A. P. (2012). Comparison of ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay detecting *Coxiella burnetii* IgM phase II for the diagnosis of acute Q fever. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(6), 1267-1270.

- Mejía, S. P., Diaz, A.E., Aguilar, R. F., Palomares, R. G., Santillán, M. M. A., Morales, P. M. I., Sánchez, P. H., Reyes, G. M. E., Peralta, L. M., y Córtes, P. Y. A. (2013) Enfermedades Infecciosas que afectan la producción ovina en los estados de Sonora y Chiapas. Epidemiología. XLIX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz, Mexico.
- Mejía, S. P., Diaz, A.E., Favila, H. L., Palomares, R. G., Castañeda, R. V., Santillán, F. M. A., Jiménez, S. H., y Córtes, P. Y. A. (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. Merida, Yucatán, Mexico.
- Menadi, S. E., Mura, A., Santucci, C., Ghalimi, F., Hafsi, F., and Masala, G. (2019). Seroprevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* infection in cattle in northeast Algeria. Tropical animal health and production, 1-8.
- Millar, J. A. (2017). Uncovering *Coxiella burnetii*'s Pathogenicity by Elucidating Its Metabolism and Host Interactions (Doctoral dissertation, Portland State University).
- Narváez A. (1952) Fiebre Q en la ciudad de México. Tesis de la Universidad Nacional Autónoma de México; Editorial Cultura T.G.S.A.
- Newton, H. J., and Roy, C. R. (2011). The *Coxiella burnetii* Dot/Icm system creates a comfortable home through lysosomal renovation. MBio, 2(5), 1-3.
- Omsland, A., Cockrell, D. C., Howe, D., Fischer, E. R., Virtaneva, K., Sturdevant, D. E., Porcerella, S. F., & Heinzen, R. A. (2009). Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(11), 4430-4434.
- Parisi, A., Fracalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Capuano, F. and 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.
- Pechstein, J., Schulze-Luehrmann, J., and Lührmann, A. (2018). *Coxiella burnetii* as a useful tool to investigate bacteria-friendly host cell compartments. International Journal of Medical Microbiology, 308(1), 77-83.
- Qiu, J., and Luo, Z. Q. (2017). *Legionella* and *Coxiella* effectors: strength in diversity and activity. Nature Reviews Microbiology, 15(10), 591-605.
- Roest, H. I., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., and Rebel, J. M. (2013). Clinical microbiology of *Coxiella burnetii* and relevant aspects for the diagnosis and control of the zoonotic disease Q fever. Veterinary Quarterly, 33(3), 148-160.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., and Rodolakis, A. (2009). *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. Applied and Environmental Microbiology, 75(2), 428-433.
- Russell-Lodrigue, K. E., Andoh, M., Poels, M. W. J., Shive, H. R., Weeks, B. R., Zhang, G. Q., Tersteeg, C., Masegi, T., Hotta, T., Yamaguchi, T., Fukushima, H., Hirai, K., McMurray, D. N. and Samuel, J. E. (2009). *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. Infection and immunity, 77(12), 5640-5650.
- Sahagún-Sánchez, G., Cotter-Lemus, L., Zamora-González, C., Reyes, P. A., Ramírez, S., and 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
- Salinas-Meléndez, J. A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., and Fimbres-Durazo, H. (2002). Serologic survey in animals of 'Q' fever in Nuevo Leon. *Revista latinoamericana de microbiología*, 44(2), 75-78.
- Salman, M.D., J.A. Hernandez and Y. Braun. (1990). A seroepidemiological study of five bovine diseases in dairy farms of the coastal region of Baja California, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 9:143-153.
- Samuel, J. E. (2000). Developmental cycle of *Coxiella burnetii*. In *Prokaryotic Development*. American Society of Microbiology, 427-440
- Samuel, J. E., Frazier, M. E., and Mallavia, L. P. (1985). Correlation of plasmid type and disease caused by *Coxiella burnetii*. *Infection and immunity*, 49(3), 775-779.
- Santamaría, J. R. (2009). Fiebre Q en el Estado de Hidalgo, México. Reporte de caso. *Perinatología y Reproducción Humana*, 23(1), 34-37.
- Schneeberger, P. M., Hermans, M. H., van Hannen, E. J., Schellekens, J. J., Leenders, A. C., and Wever, P. C. (2010). Real-time PCR with serum samples is indispensable for early diagnosis of acute Q fever. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(2), 286-290.
- Silva R. (1950). Fiebre Q en México. *Méd Rev Méx*. 61 (7), 493-497.
- Slaba, K., Skultety, L., and Toman, R. (2005). Efficiency of various serological techniques for diagnosing *Coxiella burnetii* infection. *Acta virologica*, 49(2), 123-7.
- Vaidya, V. M., Malik, S. V. S., Kaur, S., Kumar, S., and Barbuddhe, S. B. (2008). Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. *Journal of clinical microbiology*, 46(6), 2038-2044.
- Van den Brom, R., Van Engelen, E., Roest, H. I. J., Van Der Hoek, W., and Vellema, P. (2015). *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Veterinary microbiology*, 181(1-2), 119-129.
- Van den Brom, R., Van Engelen, E., Roest, H. I. J., Van der Hoek, W., and Vellema, P. (2015). *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Veterinary microbiology*, 181(1-2), 119-129.
- Van Schaik, E. J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M. M., and Samuel, J. E. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nature Reviews Microbiology*, 11(8), 561-588.
- Vincent, G., Stenos, J., Latham, J., Fenwick, S., & Graves, S. (2016). Novel genotypes of *Coxiella burnetii* identified in isolates from Australian Q fever patients. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(6), 463-470.
- Voth, D. E., y Heinzen, R. A. (2007). Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*. *Cellular microbiology*, 9(4), 829-840.
- Woldehiwet, Z. (2004). Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Research in veterinary science*, 77(2), 93-100.