



Facultad de Veterinaria

Trabajo de  
Fin de Grado

Prevalencias, factores de riesgo  
y efectos en la reproducción de  
la infección por *Coxiella burnetii*  
en explotaciones de ganado  
bovino de leche en Galicia.

Cristina Pisón Marcos

**Grado en Veterinaria**

Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

# Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Cristina Pisón Marcos y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.

Prevalencias, factores de riesgo y efectos en la reproducción de la infección por *Coxiella burnetii* en explotaciones de ganado bovino de leche en Galicia. © 2024 by Cristina Pisón Marcos is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 International. To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



## **1. RESUMEN/ RESUMO/ ABSTRACT**

### **1.1. RESUMEN**

*Coxiella burnetii* es el agente etiológico de la coxielosis en los animales y de la Fiebre Q en el ser humano. Se trata de un patógeno altamente infeccioso y con elevada resistencia ambiental. En el ganado vacuno, la coxielosis suele ser asintomática, pero se ha sugerido una posible relación con distintos problemas reproductivos. Sin embargo, en Galicia existen pocos datos epidemiológicos en esta especie. Por ello, el objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de *C. burnetii*, su distribución, factores de riesgo y sus efectos sobre los parámetros reproductivos en las explotaciones bovinas lecheras de Lugo y A Coruña. Además, se estudió la relación entre los resultados de qPCR y ELISAI. De esta manera, se recogieron 36 muestras de leche en tanque y se analizaron mediante qPCR y ELISAI. Asimismo, se realizó una encuesta epidemiológica sobre las características de la explotación y del manejo y, se obtuvieron los datos reproductivos de cada explotación de los últimos seis meses para estudiar su relación con la presencia de *C. burnetii*. En total, un 52,3 % de las granjas presentaron eliminación activa de la bacteria y en el 97,2 % se detectaron anticuerpos frente a *C. burnetii*, con prevalencias elevadas en ambas provincias (Lugo = 53,9 % y A Coruña = 71,4 %). El tamaño de granja y la presencia de lazareto se identificaron como factores de riesgo para la presencia de *C. burnetii*. En relación con los parámetros reproductivos, el porcentaje de abortos y la presencia de endometritis en las granjas fueron significativamente mayores ( $p$ -valor < 0,05) en las granjas positivas a *C. burnetii* cuando el grado de positividad en la qPCR fue alto (Ct < 32). Es decir, el porcentaje de abortos fue mayor en estas granjas frente a las negativas (5,0 % vs 3,0 %) y, el porcentaje de granjas positivas fue superior en las que tuvieron endometritis (35,0 % vs 29,0 %). Finalmente, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la ratio S/P y el Ct de la qPCR. Estos resultados indican la existencia de una elevada presencia, exposición y distribución geográfica de *C. burnetii* en las explotaciones de vacuno lechero de esta región. La asociación entre una mayor presencia de la bacteria y el tamaño de la granja puede ser debido a las diferentes características en función del tamaño, las cuales podrían influir en el riesgo de que la bacteria esté en las explotaciones. Por otra parte, la asociación con los parámetros reproductivos únicamente en las granjas con un mayor grado de positividad sugiere que esta se produzca en patrones epidemiológicos concretos. La falta de relación entre los resultados de ELISAI y la qPCR también sería atribuible a este fenómeno. Como consecuencia, es necesario determinar si la existencia de diferentes patrones serológicos y de excreción de la bacteria podrían afectar en estos resultados. En definitiva, este trabajo confirma la existencia de una alta exposición y presencia de *C. burnetii* en las granjas gallegas de bovino, y sugiere la posibilidad de su implicación en trastornos reproductivos en granjas con perfiles epidemiológicos concretos. Por último, es importante considerar que la elevada presencia de *C. burnetii* en las explotaciones lecheras podría suponer un riesgo para la salud pública.

**Palabras Clave:** Coxielosis, vacuno, leche en tanque, ELISAI, qPCR, análisis de riesgo, abortos, endometritis.

## **1.2. RESUMO**

*Coxiella burnetii* é o axente etiolóxico da coxielose nos animais e da Febre Q no ser humano. Trátase dun patóxeno altamente infeccioso e con elevada resistencia ambiental. No gando vacún, a coxielose adoita ser asintomática, pero suxeríuse unha posible relación con distintos problemas reprodutivos. Porén, en Galicia existen poucos datos epidemiolóxicos nesta especie. Por iso, o obxectivo deste estudo foi coñecer a prevalencia de *C. burnetii*, a súa distribución, factores de risco e os seus efectos sobre os parámetros reprodutivos nas explotacións bovinas leiteiras de Lugo e A Coruña. Ademais, estudouse a relación entre os resultados de qPCR e ELISAI. Desta maneira, recolléronse 36 mostras de leite en tanque e analizáronse mediante qPCR e ELISAI. Así mesmo, realizouse unha enquisa epidemiolóxica sobre as características da explotación e do manexo e, obtivéronse os datos reprodutivos de cada explotación dos últimos seis meses para estudar a súa relación coa presenza de *C. burnetii*. En total, un 52,3 % das granxas presentaron eliminación activa da bacteria e no 97,2 % detectáronse anticorpos fronte a *C. burnetii*, con prevalencias elevadas en ambas provincias (Lugo = 53,9 % e A Coruña = 71,4 %). O tamaño da granxa e a presenza de lazareto identificáronse como factores de risco para a presenza de *C. burnetii*. En relación cos parámetros reprodutivos, o porcentaxe de abortos e a presenza de endometrite nas granxas foron significativamente maiores ( $p\text{-valor} < 0,05$ ) nas granxas positivas a *C. burnetii* cando o grao de positividade na qPCR foi alto ( $Ct < 32$ ). É dicir, a porcentaxe de abortos foi maior nestas granxas fronte ás negativas (5,0 % vs 3,0 %) e, a porcentaxe de granxas positivas foi superior nas que tiveron endometrite (35,0 % vs 29,0 %). Finalmente, non se atopou unha asociación estadísticamente significativa entre a ratio S/P e o Ct da qPCR. Estes resultados indican a existencia dunha elevada presenza, exposición e distribución xeográfica de *C. burnetii* nas explotacións de vacún leiteiro desta rexión. A asociación entre unha maior presenza da bacteria e o tamaño da granxa pode ser debido ás diferentes características en función do tamaño, as cales poderían influír no risco de que a bacteria estea nas explotacións. Por outra banda, a asociación cos parámetros reprodutivos unicamente nas granxas cun maior grao de positividade suxire que esta se produza en patróns epidemiolóxicos concretos. A falta de relación entre os resultados de ELISAI e a qPCR tamén sería atribuíble a este fenómeno. Como consecuencia, é necesario determinar se a existencia de diferentes patróns serolóxicos e de excreción da bacteria poderían afectar nestes resultados. En definitiva, este traballo confirma a existencia dunha alta exposición e presenza de *C. burnetii* nas granxas galegas de vacún, e suxire a posibilidade da súa implicación en trastornos reprodutivos en granxas con perfís epidemiolóxicos concretos. Por último, é importante considerar que a elevada presenza de *C. burnetii* nas explotacións leiteiras podería supoñer un risco para a saúde pública.

**Palabras chave:** Coxielose, vacún, leite en tanque, ELISAI, qPCR, análise de risco, abortos, endometrite.

### **1.3. ABSTRACT**

*Coxiella burnetii* is the etiological agent of coxiellosis in animals and Q fever in humans. It is a highly infectious pathogen with high environmental resistance. In cattle, coxiellosis is often asymptomatic, but a possible relationship with various reproductive problems has been suggested. However, there is limited epidemiological data in this species in Galicia. Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of *C. burnetii*, its distribution, risk factors, and its effects on reproductive parameters in dairy cattle farms in Lugo and A Coruña. Additionally, the relationship between qPCR and ELISAI results was investigated. Thus, 36 bulk tank milk samples were collected and analyzed using qPCR and ELISAI. Furthermore, an epidemiological survey was conducted on the characteristics and management of the farms, and reproductive data from the past six months for each farm were obtained to study their relationship with the presence of *C. burnetii*. In total, 52.3 % of farms showed active shedding of the bacterium, and antibodies against *C. burnetii* were detected in 97.2 % of farms, with high prevalences in both provinces (Lugo = 53.9 % and A Coruña = 71.4 %). Farm size and the presence of quarantine facilities were identified as risk factors for the presence of *C. burnetii*. Regarding reproductive parameters, the abortion rate and the presence of endometritis on farms were significantly higher ( $p$ -value < 0.05) in farms positive for *C. burnetii* when the qPCR positivity was high (Ct < 32). That is, the abortion rate was higher in these farms compared to negative ones (5.0 % vs 3.0 %), and the percentage of positive farms was higher in those with endometritis (35.0 % vs 29.0 %). Finally, no statistically significant association was found between the S/P ratio and the qPCR Ct value. These results indicate a high presence, exposure, and geographical distribution of *C. burnetii* in dairy cattle farms in this region. The association between a higher presence of the bacterium and farm size may be due to different characteristics depending on size, which could influence the risk of the bacterium being present on farms. Furthermore, the association with reproductive parameters only in farms with a higher degree of positivity suggests that this occurs in specific epidemiological patterns. The lack of correlation between ELISAI and qPCR results could also be attributed to this phenomenon. Consequently, it is necessary to determine if the existence of different serological and excretion patterns of the bacterium could affect these results. In conclusion, this study confirms the high exposure and presence of *C. burnetii* in Galician cattle farms and suggests the possibility of its involvement in reproductive disorders in farms with specific epidemiological profiles. Finally, it is important to consider that the high presence of *C. burnetii* in dairy farms could pose a risk to public health.

**Key words:** Coxiellosis, cattle, bulk tank milk, ELISAI, qPCR, risk analysis, abortions, endometritis.

## 2. ÍNDICE

1.	RESUMEN/ RESUMO/ ABSTRACT .....	3
1.1.	RESUMEN .....	3
1.2.	RESUMO.....	4
1.3.	ABSTRACT .....	5
2.	ÍNDICE .....	6
3.	ABREVIATURAS .....	9
4.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	10
4.1.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA COXIELOSIS BOVINA .....	10
4.1.1.	ETIOLOGÍA .....	10
4.1.2.	EPIDEMIOLOGÍA.....	13
4.1.3.	IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA .....	18
4.1.4.	PATOGENIA .....	18
4.1.5.	EFFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN .....	19
4.1.6.	DIAGNÓSTICO.....	21
4.1.7.	TRATAMIENTO Y CONTROL .....	23
4.2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	24
5.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
5.1.	DISEÑO DEL ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS.....	25
5.2.	RECOGIDA DE DATOS Y DE LA INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA .....	25
5.3.	ANÁLISIS LABORATORIAL .....	27
5.3.1.	PCR A TIEMPO REAL .....	27
5.3.1.	ELISA INDIRECTO .....	28
5.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	29
6.	RESULTADOS.....	31
7.	DISCUSIÓN .....	37
8.	CONCLUSIONES .....	42
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	43

## **ÍNDICE DE FIGURAS:**

**Figura 1. A) Mecanismos genéticos de la variación de fase de lipopolisacárido de *Coxiella burnetii*; B) Ciclo de desarrollo intracelular de *Coxiella burnetii*.** Fuente: A) Beare et al., 2018; B) Modificada a partir de García-Pérez, 2019.

**Figura 2. Ciclo epidemiológico y transmisión de *Coxiella burnetii* en diferentes especies.** Fuente: Sahu et al., 2021.

**Figura 3. Tinción inmunohistoquímica de antígenos de *Coxiella burnetii* dentro del citoplasma de trofoblastos cotidelonarios bovinos.** Fuente: Hansen et al., 2011

**Figura 4. Esquema de la infección intrauterina por *Coxiella burnetii*.** Fuente: Modificada a partir de Agerholm, 2013.

**Figura 5. Número de explotaciones muestreadas por cada parroquia y distribución espacial de las positivas a qPCR en las distintas parroquias de las provincias de Lugo y A Coruña. Porcentaje de explotaciones positivas a *Coxiella burnetii* mediante qPCR según la provincia.**

**Figura 6. Relación entre la detección directa de *Coxiella burnetii* (qPCR) y los distintos factores asociados al manejo y características de la granja (n=32).**

**Figura 7. Relación entre la detección directa de *Coxiella burnetii* (qPCR) y la presencia de otras enfermedades (n=32).**

**Figura 8. Diagramas de cajas de para los valores de cada parámetro reproductivo considerado, en función de la detección de *Coxiella burnetii* en tanque de leche mediante qPCR de las explotaciones incluidas en el estudio (n=34).**

**Figura 9. Diagrama de cajas de la proporción de abortos según la clasificación del grado de positividad de la qPCR (n= 34).**

**Figura 10. Diagramas de cajas para la variación del ratio S/P del ELISAI en función del resultado a la qPCR: presencia/ausencia y grado de positividad; y, diagrama de dispersión entre el ratio S/P del ELISAI y el valor Ct de la qPCR de las muestras en tanque de leche de las 36 explotaciones incluidas en el estudio (n=34).**

## **ÍNDICE DE TABLAS:**

**Tabla 1. Prevalencia de anticuerpos y de ADN de *Coxiella burnetii* en explotaciones de ganado bovino en distintas localizaciones de España.**

**Tabla 2. Duración de la excreción de *Coxiella burnetii* en la especie bovina.** Fuente: Elaborado a partir de: Guatteo et al., 2006; 2007; Ruiz-Fons et al., 2010; Sahu et al., 2021.

**Tabla 3. Factores asociados al manejo y características de la granja incluidos en la encuesta epidemiológica realizada a las explotaciones lácteas en intensivo en Galicia.**

**Tabla 4. Fórmulas de los parámetros reproductivos empleados en el estudio, calculados tanto para el conjunto total de reproductoras como para novillas.**

**Tabla 5. Protocolo térmico de la amplificación de la qPCR para la detección de *Coxiella burnetii* en muestras de tanque de leche.**

**Tabla 6. Interpretación de los resultados según el porcentaje S/P para cada muestra de tanque de leche.**

**Tabla 7. Resultados del análisis multivariante de los factores de riesgo que presentaron una asociación estadísticamente significativa para la presencia de *Coxiella burnetii* (n=32).**

**Tabla 8. Presencia de mortalidad embrionaria, retención placentaria, metritis y endometritis, en función de la detección en leche de *Coxiella burnetii* (n=34).**

### **3. ABREVIATURAS:**

**ADSG:** Agrupación de Defensa Sanitaria Ganadera.

**Ag:** Antígeno.

**ASPW:** Aborto, parto prematuro, mortinato, nacido débil.

**BVD:** Diarrea vírica bovina.

**CFT:** Prueba de fijación del complemento.

**Ct:** Ciclo umbral.

**DO<sub>CN</sub>:** Densidad óptica del control negativo.

**DO<sub>CP</sub>:** Densidad óptica del control positivo.

**DO muestras:** Densidad óptica de las muestras.

**ELISA:** Ensayo de inmunoabsorbancia enzimática.

**ELISA i:** Ensayo de inmunoabsorbancia enzimática indirecto.

**IBR:** Rinotraqueítis infecciosa bovina.

**IFA:** Inmunofluorescencia.

**IFI:** Inmunofluorescencia indirecta.

**INRA:** Instituto Nacional de Investigación Agraria.

**INVESAGA:** Grupo de investigación en Sanidad Animal de Galicia.

**LCV:** Variante de células grandes.

**LPS:** Lipopolisacárido de membrana.

**MLVA:** Análisis de repetición en tándem de múltiples loci.

**MST:** Tipificación de secuencia multiespaciada.

**NMI/NMII:** Cepa de referencia Nine Mile Fase I/Fase II.

**OMSA:** Organización Mundial de Sanidad Animal.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

**S/P:** Ratio de densidad óptica de la muestra y el control.

**SCV:** Variante de células pequeñas.

**SDC:** Variante de células pequeñas densas.

**VP:** Vacuola parasitófora.

## **4. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

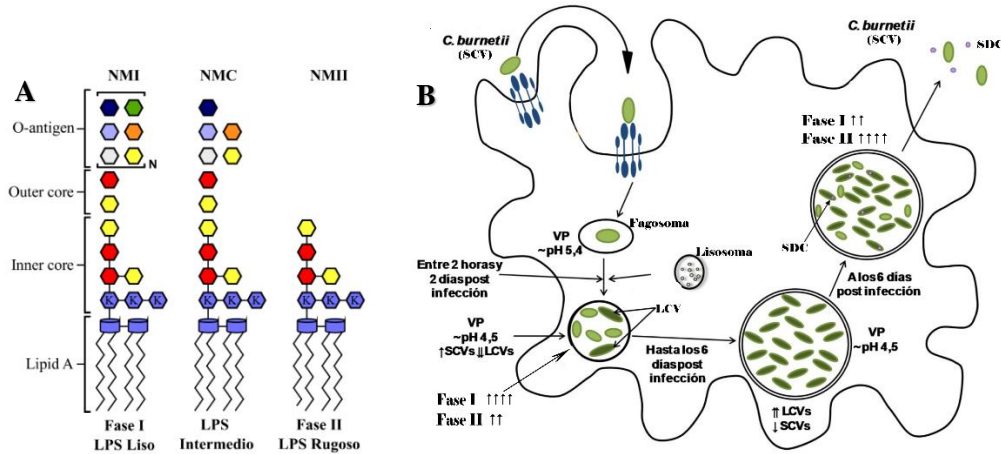
La Fiebre Q es una enfermedad zoonótica causada por la infección con la bacteria *Coxiella burnetii*. Esta se describió por primera vez en humanos en 1937, cursando con un cuadro febril. El término Fiebre Q alude a que el patógeno causante del proceso era en aquel momento desconocido (la “Q” proviene del término inglés “query”, que significa interrogación). El agente causante de la Fiebre Q fue descubierto simultáneamente en Montana, -(EE. UU)-, y en Queensland, -(Australia)-, en los años 1930, honrando su nombre a los investigadores implicados en su identificación, Harold Cox y Frank Burnet (Dragan & Voth, 2020). Aunque la Fiebre Q es un término muy extendido en la medicina veterinaria, su origen hace referencia a la sintomatología observada en los humanos al adquirir la enfermedad. Por ese mismo motivo, resulta más idóneo denominar a la enfermedad observada en los animales, como consecuencia de la infección por *C. burnetii*, como coxielosis (Agerholm, 2013).

### **4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA COXIELOSIS BOVINA**

#### **4.1.1. ETIOLOGÍA**

La coxielosis bovina está causada por *C. burnetii*, una bacteria pleomórfica gram-negativa intracelular obligada, del orden de las *Legionellales* y de la familia *Coxiellaceae* (Roest et al., 2013). *Coxiella burnetii* presenta dos formas antigénicas relacionadas con una deleción genómica en el lipopolisacárido de membrana (LPS), que es el determinante antigénico mejor caracterizado y reconocido de esta bacteria. El paso de una forma antigénica a otra se conoce como “variación de fase”, y consiste en que *C. burnetii* pasa de producir antígenos de Fase I (fase virulenta) a antígenos de Fase II (fase avirulenta). La variación de fase implica la modificación en la que pasan de una forma lisa a rugosa (*Figura 1A*), semejante a lo que ocurre en la familia *Enterobacteriaceae* (Abnave et al., 2017; Beare et al., 2018). Aunque microscópicamente ambas fases son indistinguibles, sí tienen propiedades bioquímicas e inmunológicas diferentes, y pueden ser diferenciables mediante técnicas serológicas (Marrie & Raoult, 1997). Este cambio antigénico es utilizado por el patógeno como estrategia para infectar a las células y desarrollar una infección eficiente, modulando la respuesta inmune en el interior del hospedador y causando infecciones crónicas y persistentes (Beare et al., 2018; Eldin et al., 2017). La modificación del LPS se considera que es mayoritariamente irreversible (Dragan & Voth, 2020; Trachsel et al., 2023). Las bacterias de la Fase I se hallan en los hospedadores infectados de forma natural (humanos, animales y artrópodos), son virulentas y altamente infecciosas. Además, en la mayoría de sus aislados se identifica la presencia del LPS de longitud completa (Van Schaik & Samuel, 2012). Mientras que, las bacterias de Fase II son avirulentas y menos infecciosas, y se pueden obtener en laboratorio (medio de cultivo) tras sucesivos pases de la Fase I.

Paralelamente a la transición de las fases antigénicas, en el ciclo biológico de la bacteria también existen tres variantes celulares (*Figura 1B*): la variante de células pequeñas (SCV), de células pequeñas densas (SDC) y la de células grandes (LCV) (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Van Schaik & Samuel, 2012).



**Figura 1. A) Mecanismos genéticos de la variación de fase de lipopolisacárido de *Coxiella burnetii*.** NMI/ NMII (Cepa de referencia Nine Mile Fase I/ Fase II).

**B) Ciclo de desarrollo intracelular de *Coxiella burnetii*.** La bacteria ingresa en la célula eucariota (SCV) y es fagocitada formando un fagosoma que da lugar a la vacuola parasitófora (VP), posteriormente se fusiona un lisosoma, acidificándola y promoviendo un medio ácido que favorece la supervivencia de la bacteria. A continuación, comienza la diferenciación a variantes LCV y a replicarse. Al cabo de los 6 días post-infección comienzan a formarse las SCV y, al mismo tiempo, es posible visualizar las SDC como endosporas en las LCV. Por último, se produce la liberación de las SDC y SCV fuera de la célula.  
**Fuente:** A) Beare et al., 2018; B) Modificada a partir de: García-Pérez, 2019.

Estas variantes celulares presentan diferentes características antigénicas, metabólicas y de resistencia a agentes físico-químicos (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). Así, las SCV y SDC son las estructuras de resistencia extracelular, análogas a las esporas (González-Barrio, 2015) con las que *C. burnetii* puede permanecer viable en el medio ambiente ante condiciones de desecación, temperaturas elevadas, variaciones de pH y, además son resistentes a muchos agentes desinfectantes incluida la radiación ultravioleta (Pires et al., 2023). De esta manera, las características de estas variantes celulares pequeñas le confieren una muy elevada capacidad de persistencia medioambiental (Van Schaik & Samuel, 2012). Esto explica su amplia capacidad para infectar, durante un largo periodo, a humanos y a animales después de haber sido excretada por un hospedador (Van Schaik & Samuel, 2012).

La variante SCV es la principal responsable de las infecciones naturales y es con la que el hospedador se infecta. Esta contiene proteínas involucradas en la evasión del sistema inmune que le permiten mantenerse en la célula. La variante LCV se desarrolla a partir de ella, es intracelular, pleomórfica y metabólicamente más activa que la anterior, y será la responsable de la

multiplicación en el interior de la célula infectada (Van Schaik & Samuel, 2012). El desarrollo intracelular de la bacteria se realiza en la vacuola parasitófora (VP) (Dragan & Voth, 2020). Cuando la bacteria se replica, los LPS se sintetizan en su tamaño completo y, por tanto, en este momento podemos detectar bacterias en Fase I dentro de la VP. Parte de las LCV se diferencian a variantes SCV y se empiezan a observar SDC dentro de las LCV en forma de endosporas que se liberarán al medio tras la lisis de las LCV (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). En este punto empieza a haber una predominancia de las formas en Fase II. La evidencia sugiere que la función de la SDC está relacionada con la persistencia del microorganismo, ya que se trata de la variante más estable pero la menos activa metabólicamente (Samuel et al., 2003). Las SDC posteriormente cambian a SCV en un proceso dinámico influido por factores relacionados con su interacción con las células hospedadoras (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Mccaul et al., 1991). En el medio externo, la forma SCV es la forma infecciosa que puede persistir en el medio ambiente, en el suelo, el polvo, las heces de animales infectados y otros materiales orgánicos durante períodos extensos, manteniendo su viabilidad y capacidad de infectar a nuevos hospedadores (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). Debido a su riesgo zoonótico, su marcada capacidad de sobrevivir en el medio ambiente y su alta infectividad, *C. burnetii* ha sido catalogada como un agente de bioterrorismo de categoría B (EFSA, 2010; Roest et al., 2013).

Además, *C. burnetii* muestra una amplia diversidad genética presentando 6 grupos genómicos circulando en diferentes áreas geográficas y especies animales (Hemsley et al., 2023; Hornstra et al., 2011). Estas diferencias genómicas podrían implicar una diferente virulencia entre cepas (Hemsley et al., 2023) e incluso tener diferente implicación zoonótica. Conocer la distribución de los genotipos de la bacteria presentes en una región es fundamental para poder detectar las fuentes de infección principales e implementar las medidas de control oportunas (Astobiza et al., 2012a). Por ejemplo, Tomaiuolo et al, (2021) en Bélgica, encontraron que las cepas en humanos estaban relacionadas con las presentes en pequeños rumiantes sugiriendo que las fuentes de infección en humanos se deben al contacto con estos. En España no existe mucha información en cuanto a la diversidad genotípica de *C. burnetii*. Sin embargo, los estudios realizados sugieren que las cepas en ganado vacuno no están relacionadas con problemas en humanos. Esto concuerda con un estudio en el que se observó que casos humanos compartían los genotipos hallados con ovinos y caprinos, pero, no sucedía lo mismo con el único genotipo encontrado en el ganado vacuno (Jado et al., 2012).

Se han usado diversas técnicas para genotipar y caracterizar cepas de la bacteria, normalmente utilizando la cepa Nine Mile como referencia (Tomaiuolo et al., 2021). Actualmente, las más utilizadas son el análisis de repetición en tándem (MLVA) de múltiples loci y la tipificación de secuencia multiespaciada (MST) (Astobiza et al., 2012a; Tomaiuolo et al., 2021), ya que son

fiables y presentan la ventaja de no necesitar un cultivo previo de la bacteria (Astobiza et al., 2012a).

#### 4.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

*Coxiella burnetii* está presente en todo el mundo, con la excepción de Nueva Zelanda y Antártida, y la infección con la bacteria es de declaración obligatoria por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) (OMSA, 2022).

##### A. HOSPEDADORES Y DISTRIBUCIÓN

La bacteria es capaz de infectar a una amplia variedad de especies. Además de los rumiantes domésticos y del ser humano, existen evidencias de infección en rumiantes silvestres, camélidos, carnívoros silvestres, aves y variados mamíferos como gatos, perros, conejos, caballos, cerdos, etc. (Woldehiwet, 2004).

En bovino, la información disponible sobre la exposición a la bacteria ha sido tradicionalmente escasa, ya que la coxielosis no ha sido considerada un problema importante en esta especie durante mucho tiempo (Woldehiwet, 2004). Sin embargo, en los últimos años, la percepción del riesgo clínico de la infección para el bovino ha aumentado, especialmente en relación con la aparición de problemas reproductivos (Agerholm, 2013). Esto ha fomentado la realización de estudios en las últimas décadas que buscan una mayor comprensión de la epidemiología de la coxielosis en los rumiantes (Guatteo et al., 2011). En una revisión realizada por Guatteo et al, (2011) se encontró que la presencia de *C. burnetii* varía considerablemente entre los distintos países. La prevalencia de excreción en los estudios revisados oscilaba a nivel mundial entre 10,8 % y 84 % individual y, entre el 0 % y 45 % intrarrebaño. A su vez, en esta revisión se detectó que las seroprevalencias medias, observadas hasta 2010, en ganado vacuno eran altas: 20 % individual y 37,7 % intrarrebaño, valores que resultaron significativamente mayores en comparación con los de ovino y caprino: 15 % individual y 25 % intrarrebaño (Guatteo et al., 2011). Incluso dentro de un mismo conjunto geográfico puede haber una gran oscilación de resultados. Por ejemplo, en EE. UU., se observaron diferencias en los distintos estados, con un rango de seroprevalencia informada entre el 1 % al 73 % (Kim et al., 2005).

En España, la presencia de infecciones por *C. burnetii* en rumiantes domésticos es endémica (EFSA, 2010) y se encuentran valores elevados tanto a nivel individual como de explotaciones afectadas (*Tabla 1*). Por ejemplo, observando los resultados de tanque de leche, todos ellos superan el 50 % de detección de anticuerpos y de la bacteria en diferentes localidades. Esto indica un alto número de explotaciones de ganado vacuno expuestas. A nivel individual también se encuentran variaciones elevadas en la seroprevalencia en función de la zona (*Tabla 1*), desde el 18,4 % en Asturias hasta el 39 % en Andalucía (Espí et al., 2021; Ruiz-Fons et al., 2008).

**Tabla 1. Prevalencia de anticuerpos y de ADN de *Coxiella burnetii* en explotaciones de ganado bovino en distintas localizaciones de España.**

Provincia	N	Sistema de producción	Muestra	Técnica	Prevalencia	Referencias
<b><u>Anticuerpos</u></b>						
Andalucía	79 animales	Extensivo	Suero	IFA	39 %	Ruiz-Fons et al., 2008
Asturias	163 animales	Extensivo/ intensivo	Suero	ELISAI	18,4 %	Espí et al., 2021
País Vasco	618 animales (>12 meses)	Extensivo (carne)	Suero	ELISAI <sup>a</sup>	43 %	Ruiz-Fons et al., 2010
Lleida	781 animales <sup>c</sup>	Intensivo (lechera)	Suero	ELISAI <sup>b</sup>	50,2 %	López-Gatius et al., 2012
Madrid	1100	Intensivo/ Extensivo	Suero	ELISAI	30 %	Álvarez et al., 2012
Cataluña	90 explotaciones	Intensivo (lechera)	Tanque de leche	ELISAI <sup>b</sup>	74 %	Nogareda et al., 2013
Bizkaia	178 explotaciones	Intensivo (lechera)	Tanque de leche	ELISAI	66,9 %	Astobiza et al., 2012b
Galicia	262 explotaciones	Intensivo (lechera)	Tanque de leche	ELISAI	60,1 %	Yáñez et al., 2024
<b><u>ADN</u></b>						
Asturias	25 muestras	Intensivo (lechera)	Aerosole s/ polvo	qPCR	80 %	Espí et al., 2021
Bizkaia	178 explotaciones	Intensivo (lechera)	Tanque de leche	PCR	51,7 %	Astobiza et al., 2012b

IFA: Inmunofluorescencia; ELISAI: Ensayo de inmunoabsorbancia enzimática indirecto; qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real/cuantitativa. a) Cepa Nine Mile; b) Cepa aislada de un rumiante doméstico; c) Animales post-parto de 90 días.

La exposición a la bacteria se ha estudiado con diferente intensidad en distintas zonas de España, pero sigue habiendo una falta de información sobre la distribución y prevalencias de coxielosis en algunas comunidades autónomas en las que la producción de esta especie tiene mucha importancia, como Galicia. El País Vasco es la región en la que se han hecho más estudios en diferentes especies por ser considerada una zona hiperendémica (Ruiz-Fons et al., 2010), debido a una incidencia especialmente alta en casos de Fiebre Q humana (Montes et al., 2006), con

múltiples brotes asociados a pequeños rumiantes (Hurtado et al., 2023). No obstante, el porcentaje de bovinos seropositivos observado por Ruiz-Fons et al, (2010) fue menor que el encontrado en otras zonas de España (*Tabla 1*). En este sentido, debe considerarse que las diferencias entre ambos estudios en relación con el diseño de los mismos, sistemas de producción y técnicas diagnósticas empleadas pueden influir en los resultados observados (Guatteo, 2013). Esto mismo ocurre con la prevalencia de excreción, que además se ve influenciada porque la bacteria se elimina intermitentemente (se obtienen falsos negativos cuando se pretende identificar directamente la presencia de esta) (Voss et al., 2023).

Pese a todo, la situación de la coxielosis bovina en Galicia no se conoce bien. De hecho, solamente se ha realizado un estudio en esta especie en Galicia para detectar la presencia de anticuerpos a partir de muestras de tanque de leche de ganado vacuno (Yáñez et al., 2024), obteniendo una seroprevalencia mayor que las observadas en los estudios similares en Asturias, País Vasco y Andalucía (*Tabla 1*). Por tanto, son necesarios análisis de prevalencias individuales y de excreción para conocer mejor la distribución de la infección en esta región.

## B. TRANSMISIÓN

Los rumiantes domésticos pueden excretar el microorganismo por distintas vías: leche, orina, heces, moco vaginal y, a través de descargas vaginales o uterinas tras el parto o aborto; de forma constante o intermitente. Sin embargo, la importancia y la duración de la excreción por cada vía depende de la especie y varía de forma considerable entre ellas (Guatteo et al., 2006; 2007). En el ganado vacuno, la leche es una vía de eliminación muy importante ya que los animales pueden excretar altas cargas bacterianas (Guatteo et al., 2007). Además, la bacteria se elimina durante más tiempo por esta vía que a través de las descargas vaginales o de las heces (*Tabla 2*), a diferencia de otros rumiantes como el ovino o el caprino (Rodolakis et al., 2007). Esto se encuentra relacionado con una mayor capacidad del patógeno para establecer una infección crónica en la glándula mamaria en las vacas en comparación con otras especies, lo que provoca la excreción persistente de la bacteria (Porter et al., 2011).

**Tabla 2. Duración de la excreción de *Coxiella burnetii* en la especie bovina.**

Vía de eliminación	Días
Descargas vaginales	15-28
Heces	14
Leche	390

Fuente: Elaborado a partir de: Guatteo et al.,2006; 2007; Ruiz-Fons et al., 2010; Sahu et al., 2021.

En relación con la transmisión, *C. burnetii* puede transmitirse de forma directa o indirecta. Debido a las múltiples especies que pueden ser susceptibles a la infección, el ciclo epidemiológico de esta bacteria es complejo e implica la participación de reservorios tanto domésticos como silvestres (Figura 2). El ganado vacuno es el principal reservorio de la bacteria en la naturaleza y adquiere la infección fundamentalmente a partir de otros bovinos infectados o animales domésticos, más que de animales silvestres. No obstante, hay pocos estudios sobre la prevalencia en las especies silvestres, por lo que la importancia relativa de estas en el ciclo epidemiológico de *C. burnetii* no está bien caracterizada (Voss et al., 2023).

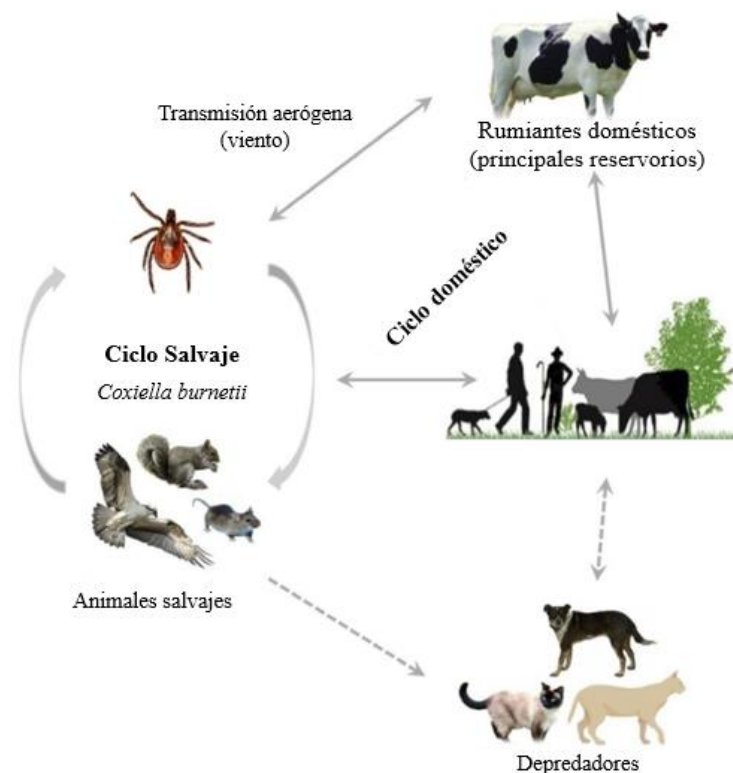


Figura 2. Ciclo epidemiológico y transmisión de *Coxiella burnetii* en diferentes especies.

Fuente: Sahu et al, 2021.

La principal vía de transmisión es la aerógena o respiratoria, tanto en animales como en humanos, por medio de la inhalación de aerosoles generados a partir de la excreción de la bacteria (Sahu et al., 2021). El viento también puede jugar un papel importante en la transmisión aerógena de la bacteria ya que *C. burnetii* se dispersa a largas distancias (en condiciones climáticas adecuadas) unida a partículas de polvo (García-Seco, 2017). La evidencia sugiere que puede llegar a viajar hasta 18 km, cuando se presentan vientos fuertes (Pires et al., 2023). De la misma manera, puede suceder la transmisión directa por la ingestión del material contaminado y por vía venérea (Pires et al., 2023), pero son menos comunes.

La transmisión mediante garrapatas puede ocurrir, pero no es esencial para el mantenimiento del ciclo doméstico, aunque sí contribuye a la conservación de la bacteria en el medio ambiente (ciclo silvestre) y también constituye el nexo entre ambos ciclos (*Figura 2*) (Espí et al., 2021). Estos, también pueden confluir ya que los animales domésticos y silvestres pueden interactuar y compartir entornos. Entre los géneros de garrapatas en los que se ha identificado *C. burnetii* están *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Ixodes* (Pires et al., 2023), que albergan especies que en algunos casos son muy comunes en Galicia (p.e., *Ixodes ricinus*).

La coxielosis se puede mantener de forma endémica dentro del rebaño bovino gracias a los animales portadores persistentemente infectados y a la contaminación del ambiente (Böttcher et al., 2024). Las vacas infectadas persistentemente constituyen un reservorio en las explotaciones lecheras y garantizan la persistencia del patógeno en el rebaño a largo plazo, a través de la excreción en leche o durante el parto (Porter et al., 2011). Por lo tanto, para lograr la interrupción de la transmisión de la bacteria en el rebaño es crucial la eliminación de animales infectados persistentemente, procurando que los animales susceptibles (fundamentalmente animales jóvenes que no han estado en contacto con el patógeno) no entren en contacto con fuentes de infección. En este momento, las explotaciones pueden llegar a estar libres de la bacteria y se volverían susceptibles de nuevo. El riesgo de iniciar un nuevo ciclo de infección provendría de una nueva introducción de *C. burnetii* desde el exterior de la granja (Böttcher et al., 2024).

### C. FACTORES DE RIESGO PARA LA TRANSMISIÓN

La edad del animal ha sido relacionada con una mayor probabilidad de infección (Álvarez et al., 2012), a mayor edad, mayor probabilidad de exposición. De acuerdo con la presencia de cabras u ovejas cohabitando con los bovinos, también se encontró como un factor de riesgo en determinadas poblaciones (Van Engelen et al., 2014). Esto se asocia a que en ovejas y cabras la infección tiene un mayor impacto clínico, causa abortos más frecuentemente, lo que provoca una gran contaminación del medio y, por lo tanto, un mayor riesgo de infección para otros animales que cohabiten en la explotación (Agerholm, 2013). Como se ha mencionado anteriormente, también puede existir variabilidad entre la patogenicidad y la cepa de la bacteria, lo que condicionaría la capacidad de transmisión de la misma (Hemsley et al., 2023).

Con relación al sistema de manejo, la prevalencia en explotaciones lecheras suele ser mayor que en granjas de carne dado que la intensificación de la producción favorece las interacciones entre animales, y así el mantenimiento y la propagación del patógeno (Álvarez et al., 2012). También, en el análisis de riesgo realizado por Neare et al, (2023) en Estonia, se vio una mayor prevalencia en las granjas de mayor tamaño. Se identificó que, uno de los riesgos de introducción de la bacteria en las explotaciones de mayor tamaño se debe a la entrada de un mayor número de personal externo a las mismas. Paul et al, (2012) también encontraron que la cuarentena de los animales

recién comprados conlleva una menor probabilidad de positividad a anticuerpos contra *C. burnetii* (Paul et al., 2012).

Otros factores de riesgo relacionados con el manejo observados en múltiples estudios son: la reposición externa, el uso de pastos compartidos, el contacto con especies silvestres, incluso la presencia de animales de compañía (perros y gatos), o la mala higiene en la zona del parto (Ali et al., 2022; Neare et al., 2023; van Engelen et al., 2014).

#### **4.1.3. IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA**

La presencia de explotaciones infectadas con *C. burnetii* supone un riesgo importante para la salud humana. Muchos de los brotes notificados en personas se han vinculado a rumiantes domésticos, principalmente ovejas y cabras, por ejemplo, el registrado en Países Bajos (2007 - 2010), siendo el de mayor duración y extensión (hasta 4000 personas afectadas) (Roest et al., 2013). Además, España es uno de los países europeos con la mayor incidencia de casos humanos desde 2017 (EFSA, 2023).

Se considera que la infección en los humanos ocurre fundamentalmente al inhalar aerosoles contaminados, pero también puede producirse por el contacto con excrementos de animales infectados o por el consumo de productos lácteos no pasteurizados (Roest et al., 2013). Incluso, se ha considerado como un factor de riesgo de brotes de Fiebre Q en humanos la aerosolización a través de la distribución de fertilizantes en los campos (Pires et al., 2023). El largo período de excreción de esta bacteria en leche bovina también puede suponer un riesgo zoonótico, especialmente en las regiones donde se consume leche cruda sin pasteurizar (Ruiz-Fons et al., 2010). Sin embargo, la infección vía oral no es tan eficaz como vía respiratoria por inhalación de aire contaminado. Las altas prevalencias de infección en los animales también pueden suponer un riesgo para la infección de garrapatas y la adquisición de la enfermedad en humanos a través del vector (Pires et al., 2023).

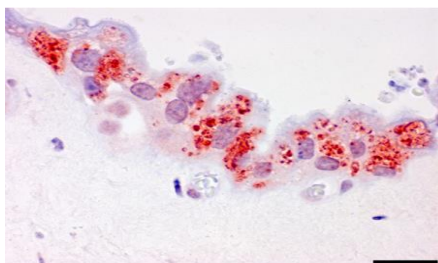
#### **4.1.4. PATOGENIA**

La forma más frecuente de infección comienza cuando un animal inhala la variante SCV. Cuando las SCV llegan al tracto respiratorio, invaden a los macrófagos alveolares y son interiorizadas en una vacuola. Los macrófagos infectados se dirigen a los ganglios linfáticos e invaden a otras células inmunitarias mediante un mecanismo que no está completamente esclarecido (Roest et al., 2013; Sireci et al., 2021). Como consecuencia de la propagación de la bacteria a través de los macrófagos, se puede establecer una bacteriemia que disemina la infección por el organismo. Así, en las primeras etapas de la infección se detecta *C. burnetii* en sangre, pulmones, bazo, hígado, tracto reproductivo, glándulas mamarias y en hembras gestantes, también en la placenta

(Anastácio et al., 2022; Woldehiwet, 2004). De entre todos estos tejidos, la bacteria puede conseguir establecer una infección persistente fundamentalmente en dos tejidos: las glándulas mamarias y el tracto reproductivo (González-Barrio, 2015):

- La bacteria presenta tropismo por el tejido mamario (Sobotta et al., 2017), donde se mantiene y se replica en las células de la glándula evadiendo la respuesta inmune del animal. Desde estas localizaciones se va a eliminar bacteria al exterior, por lo que el establecimiento de infecciones persistentes es determinante para la transmisión bacteriana desde el hospedador y la persistencia de la bacteria en una población (Sobotta et al., 2017). Asimismo, se sugiere una posible asociación entre la eliminación de *C. burnetii* y las mastitis crónicas subclínicas en el ganado vacuno (Barlow et al., 2008).

- *Coxiella burnetii* tiene tropismo por el tejido placentario donde puede establecer una infección en los trofoblastos cotiledonarios bovinos (Figura 3), causando desde una inflamación simple de la placenta hasta una placentitis hemorrágica y/o necrotizante (Gisbert et al., 2024). De esta manera, las células trofoblásticas son el principal objetivo de multiplicación de la bacteria y, las células epiteliales coriónicas infectadas intactas contienen vacuolas citoplasmáticas con un gran número de bacterias en su interior, lo que daría lugar al establecimiento de una infección crónica. Lo cual podría estar relacionado con las infecciones persistentes (Woldehiwet, 2004). Aunque, el resultado de una infección intrauterina depende de la virulencia de la cepa, la respuesta inmunitaria o de la gravedad de la infección, entre otros (Agerholm, 2013).



**Figura 3. Tinción inmunohistoquímica de antígenos de *Coxiella burnetii* dentro del citoplasma de trofoblastos cotiledonarios bovinos.**

Fuente: Hansen et al., 2011.

#### **4.1.5. EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN**

En el ganado vacuno la coxielosis suele ser asintomática (Porter et al., 2011), pero la infección con *C. burnetii* se ha intentado relacionar con diferentes problemas reproductivos que incluyen el denominado síndrome ASPW (aborto, parto prematuro, mortinato, nacido débil) (Figura 4). No obstante, la implicación real de la bacteria como agente etiológico de algunos de estos problemas reproductivos, como la infertilidad, todavía no se encuentra completamente esclarecida (Agerholm, 2013; Böttcher et al., 2024).

En bovino solamente se ha reproducido experimentalmente la infección una vez mediante la inoculación intradérmica de la bacteria en 12 novillas de entre 8-11 meses, resultando en que dos novillas abortaron y tres mostraron infertilidad (Plommet et al., 1973). Esto sugiere que puede estar relacionada con problemas reproductivos, pero también que se pueden encontrar infecciones con la bacteria que no tengan consecuencias clínicas reproductivas. Además, hay animales que excretan la bacteria en las descargas vaginales de partos normales a pesar de no mostrar signos clínicos (Agerholm, 2013).

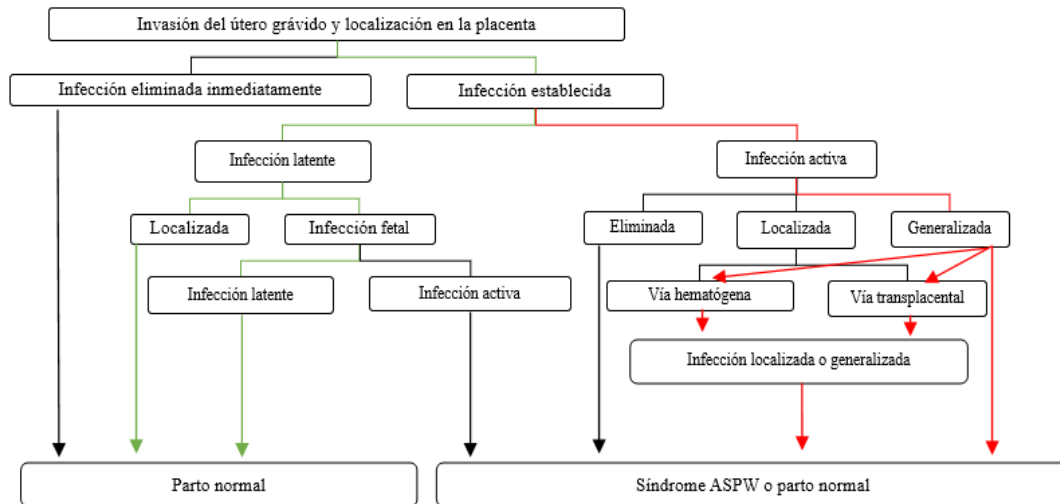


Figura 4. Esquema de la infección intrauterina por *Coxiella burnetii*. ASPW (Aborto, parto prematuro, mortinato, nacido débil).

Fuente: Modificada a partir de Agerholm, 2013.

Dentro de las posibles consecuencias reproductivas de la infección, según los distintos estudios, la implicación de la bacteria en abortos parece ser una de las asociaciones más plausibles. Una revisión reciente señala que, en el 77 % de los estudios realizados hay una mayor seropositividad a la bacteria en las vacas abortadas que en las no abortadas (Gisbert et al., 2024).

Además, la bacteria ha sido detectada en lesiones placentarias de animales abortados (Hansen et al., 2011). Si las bacterias contaminan el líquido amniótico pueden infectar de forma activa al feto por vía amniótica-oral. En estos casos, *C. burnetii* puede invadir los pulmones del feto por vía traqueobronquial provocando una bronconeumonía (Agerholm, 2013), y desde aquí propagarse a otros tejidos del feto. El acceso de la bacteria al feto también es posible por vía hematogena (Agerholm, 2013; Böttcher et al., 2024). No obstante, la infección puede producirse igualmente sin desembocar en un aborto, pues se ha detectado *C. burnetii* en placentas de partos normales (Hansen et al., 2011); y así, nacer un ternero que puede o no estar infectado congénitamente. Del mismo modo, también es posible la excreción vaginal de la bacteria en el transcurso del parto y posparto (Hansen et al., 2011) (Figura 4). De esta manera, la capacidad de la bacteria para estar

presente en tejidos sin provocar un efecto clínico complica la asociación causal de la infección con la clínica.

En cuanto a la infertilidad y a otras patologías reproductivas, la posible asociación causal deriva de observaciones epidemiológicas que, algunas veces, proporcionan resultados contradictorios. Mientras que hay trabajos que detectan cierta relación de la infección con infertilidad en los animales (Gisbert et al., 2024), otros, encuentran que las vacas seropositivas tienen incluso una mejor reproducción y una menor probabilidad de padecer endometritis que las que no estaban infectadas (Garcia-Ispierto et al., 2013). En este mismo estudio, se vio una falta de asociación entre la infección y la retención de placenta. Si bien es cierto, estos autores indicaron que podría deberse a limitaciones en el diseño de su proyecto (Garcia-Ispierto et al., 2013). Además, en la revisión de Gisbert et al, (2024) se examinaron 9 publicaciones que abordaron la retención de placenta encontrando una asociación con la bacteria en solo 5 de los estudios. Los estudios dirigidos a comprobar la relación entre el patógeno y las metritis y endometritis son bastante escasos. Muskens et al, (2011) establecieron como conclusión que *C. burnetii* no parecía ser una etiología importante de metritis puerperal. Hay que tener en cuenta que la retención placentaria es un factor de riesgo importante de cara a padecer metritis en el ganado vacuno, por lo que se plantea la duda de si realmente las metritis ocurren por la infección con la bacteria o si son consecuencia de la retención placentaria (Quintela et al., 2004).

Agerholm, (2013) indica que la disparidad de resultados obtenidos, en los distintos estudios sobre los efectos reproductivos, puede estar influenciada por el diseño e incluso por la interpretación de los resultados estadísticos. También es importante considerar la existencia de fases agudas y crónicas de la infección que pueden tener diferentes implicaciones clínicas y, no son normalmente tenidas en cuenta en los estudios; así como, la existencia de formas subclínicas (Guatteo, 2013). Además, infecciones con diferentes genotipos podrían tener diferente significación clínica (Astobiza et al., 2012a). Por consiguiente, todavía no se comprenden completamente las implicaciones de la coxielosis bovina en la reproducción. De cara a obtener una mayor información sobre las consecuencias de la infección con la bacteria es importante, en primer lugar, intentar adoptar unas metodologías estandarizadas para la detección de *C. burnetii* y establecer unas definiciones más precisas y coherentes de los parámetros reproductivos (Gisbert et al., 2024).

#### **4.1.6. DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico de los procesos causados por *C. burnetii* es complicado debido a la ausencia de signos clínicos patognomónicos y el hecho de que la excreción bacteriana pueda no correlacionarse con el estado serológico y eliminador (Agerholm, 2013). De forma general, el diagnóstico se basa en la detección de la propia bacteria o su material genético, o en el reconocimiento de anticuerpos frente a la infección. La identificación de *C. burnetii* confirma su presencia en los animales o en la granja mientras que, la presencia de anticuerpos nos indica que

los animales han tenido contacto con la bacteria (Roest et al., 2013; Voss et al., 2023). Los métodos de diagnóstico que permiten la detección directa de la bacteria o de su material genético son el cultivo celular, tinción, inmunohistoquímica, o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden realizar a partir de múltiples muestras como leche, heces, tejidos, descargas vaginales, orina o sangre (Guatteo, 2013). El aislamiento no se realiza frecuentemente ya que se necesitan instalaciones de alto nivel de seguridad biológica (González-Barrio, 2015). Las técnicas de tinción (tinción Stamp) sobre tejidos lesionados, como la placenta, pueden servir como “screening”, pero tienen una mala sensibilidad y especificidad, ya que otras bacterias pueden presentar una morfología parecida (*Chlamydia* spp., *Yersinia* spp., *Brucella* spp.) y, en caso de utilizarse, lo más recomendable sería combinarlas con otras como la PCR (EFSA, 2010).

La PCR es una técnica con una alta especificidad y sensibilidad, que sirve para detectar el material genético e identificar así la presencia de eliminación activa de la bacteria en cualquier tipo de muestra biológica (Böttcher et al., 2024). La PCR a tiempo real (qPCR) permite la cuantificación o semicuantificación de la concentración de ADN diana, es rápida, con poco riesgo de contaminación, y el análisis de un gran número de muestras (EFSA, 2010).

Para la determinación de esta bacteria mediante PCR se han descrito varios protocolos destinados a la localización de varias dianas o genes, siendo así la diana más frecuentemente utilizada la secuencia de inserción IS1111 (Jones et al., 2010). Además, las técnicas moleculares nos permiten genotipar la cepa para identificar las cepas circulantes en un área y especie determinada, realizar estudios filogenéticos y comparar con la situación epidemiológica de otras regiones (González-Barrio, 2015). No obstante, debido a que es posible la presencia asintomática de la bacteria en los tejidos, la combinación de las técnicas directas junto con el uso de técnicas histológicas, que pongan de manifiesto la presencia de lesiones en concomitancia con la presencia de la bacteria, es muy interesante para llegar a un diagnóstico más seguro (Guatteo, 2013). Además, se pueden utilizar métodos de detección indirecta. La detección de anticuerpos frente *C. burnetii* puede hacerse a partir de suero o de leche (Yáñez et al., 2024). Existen diferentes técnicas serológicas que se pueden utilizar para el diagnóstico de *C. burnetii* como la fijación del complemento (CFT), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo de inmunoabsorbancia enzimática (ELISA) (EFSA, 2010). De todas estas, la que presenta una mayor sensibilidad y la más utilizada en el diagnóstico veterinario y en los estudios epidemiológicos, ya que además presenta protocolos estandarizados entre laboratorios, es el ELISA (González-Barrio, 2015; Lurier et al., 2021). Existen diferentes tipos de kits comerciales de ELISA para la detección de anticuerpos que pueden estar preparados a partir de antígenos aislados de rumiantes (más sensibles), y otros con antígenos procedentes de aislados de garrapatas (cepa Nine Mile) (EFSA, 2010; Rodolakis et al., 2007). Las técnicas serológicas permiten detectar anticuerpos para las distintas variaciones de fase de la bacteria, tanto Fase I, como Fase II o ambas (EFSA, 2010). La diferenciación entre fases puede ayudar a estimar el tipo de infección (aguda/crónica) que sufre el animal. Por ejemplo, la

identificación de anticuerpos producidos en la Fase II se utiliza para detectar infecciones agudas en medicina humana. Sin embargo, en medicina veterinaria la mayor parte de los kits comerciales están diseñados para detectar ambas fases a la vez. Los anticuerpos frente a la Fase II son producidos tras la infección con la bacteria y se considera que los animales transitan desde un patrón Fase I/Fase II<sup>+</sup> (más frecuente en una infección aguda en la granja) a Fase I<sup>+</sup>/Fase II<sup>+</sup> (más frecuente en una infección crónica). Los anticuerpos producidos en esta Fase II pueden durar años (Roest et al., 2013). No obstante, debe considerarse que la dinámica serológica de *C. burnetii* es compleja y no está completamente conocida, por lo que esta diferenciación de fases puede no ser estricta a nivel individual. Por ejemplo, se ha observado que la transición parece depender de la edad, y animales de uno o dos años pueden volverse negativos en lugar de seroconvertir. Por otra parte, la detección de la bacteria mediante PCR (en tejidos o abortos) está relacionada con la detección de solamente anticuerpos de Fase II (Böttcher et al., 2011), pero también pueden existir animales eliminadores negativos (Serrano-Pérez et al., 2015).

Por tanto, el problema que puede presentar la interpretación de técnicas serológicas como el ELISA es que se pueden encontrar animales seropositivos años después de la infección; incluso, otros que nunca lleguen a seroconvertir aunque se hayan infectado, independientemente de la eliminación o no de la bacteria. Es decir, un resultado negativo no permite asegurar que el animal no esté infectado (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; EFSA, 2010). De este modo, los ensayos serológicos resultan más adecuados para el “screening” a nivel de las explotaciones que para la confirmación individual de la exposición de los animales (EFSA, 2010). Por ello, suele ser más adecuado combinar técnicas directas e indirectas en el diagnóstico, p.e., qPCR y ELISA (EFSA, 2010). En este sentido, para la investigación del estado sanitario del rebaño el hecho de poder detectar tanto material genético como anticuerpos en el tanque de leche resulta muy útil ya que permite caracterizar de forma barata y rápida la exposición y presencia de la bacteria en el rebaño (Porter et al., 2011).

#### **4.1.7. TRATAMIENTO Y CONTROL**

Para el control de la infección es necesario adoptar medidas de bioseguridad en el manejo de la explotación que minimicen la transmisión horizontal del patógeno, como por ejemplo tener un local exclusivo destinado a los partos y, la eliminación, limpieza y desinfección de los restos de estos para dificultar lo máximo posible la contaminación ambiental (García-Seco, 2017). En caso de la aparición de brotes, se han propuesto medidas terapéuticas como el uso de antibióticos, por ejemplo, la oxitetraciclina. Sin embargo, la utilidad de esta medida por sí sola presenta gran controversia porque realmente no suprime la infección y, si no se acompaña de las medidas de bioseguridad, puede no ser suficiente para controlar el brote en el rebaño (Guatteo, 2013).

La vacunación es el método más eficaz para la prevención de la coxielosis. Las vacunas comerciales administradas en rumiantes (Coxevac® suspensión inyectable para bovino, caprino y ovino) contienen *C. burnetii* de Fase I inactivada, porque la acción protectora de las vacunas requiere la presencia del LPS completo de la de Fase I de la bacteria. Taurel et al, (2011) encontraron que las vacas vacunadas tenían un menor riesgo de sufrir aborto que las no vacunadas (OR = 0,7), así como una mejora en la fertilidad, especialmente en novillas. De igual manera, las novillas vacunadas antes de la cubrición presentaron una menor probabilidad de eliminar la bacteria a través de descargas vaginales. Además, es interesante vacunar al animal cuando no esté gestante porque hay menor riesgo de que se vuelva eliminador (Guatteo, 2013), aunque administrarla en el último tercio de la gestación no provoca reacciones adversas ni partos prematuros (Guatteo et al., 2008). Por tanto, la vacunación es recomendable en rebaños seronegativos o en los que la seroprevalencia es baja (Piñero et al., 2014), pero en explotaciones endémicas no es tan eficiente ya que no logra prevenir la diseminación de la bacteria. Esto último es debido a que la contaminación ambiental puede llevar a una elevada presión de infección por la alta capacidad de resistencia ambiental de la bacteria. Por otro lado, la vacunación también puede tener beneficios para la salud pública. Por ejemplo, en Australia, la aplicación de la vacuna tiene como objetivo proteger a los trabajadores expuestos a esta bacteria, como veterinarios y ganaderos (Guatteo, 2013).

#### **4.2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, la coxielosis es una enfermedad de importancia creciente en las explotaciones lecheras de ganado bovino, pero para la que todavía falta información sobre su asociación con problemas reproductivos en el vacuno lechero. De esta manera, en este estudio se han definido los siguientes objetivos:

1. Determinar la prevalencia y seroprevalencia de *C. burnetii* a nivel de explotación a partir de muestras de leche de tanque en el ganado vacuno lechero en las provincias de Lugo y A Coruña.
2. Investigar la influencia de distintos factores asociados con el manejo y características de las granjas en la presencia de *C. burnetii* en las explotaciones lecheras.
3. Analizar la asociación entre los parámetros reproductivos y la presencia de *C. burnetii* en las explotaciones.
4. Comparar los resultados en tanque de leche obtenidos mediante qPCR y ELISAi.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y TOMA DE MUESTRAS

El estudio se realizó sobre explotaciones de bovino de aptitud láctea de las provincias de Lugo y A Coruña desde el mes de enero hasta mayo del año 2024. La participación en el estudio fue voluntaria y se ofreció a los ganaderos de ambas provincias a través de veterinarios clínicos de Lugo. Las explotaciones que aceptaron participar fueron incluidas en el estudio siempre y cuando cumpliesen los siguientes dos requisitos: pertenecer a una Agrupación de Defensa Sanitaria Ganadera (ADSG) y realizar controles de parámetros reproductivos, manteniendo un registro de los mismos. Como resultado, 36 explotaciones cumplieron con los requisitos establecidos y fueron incluidas en el estudio.

En cada una de las 36 explotaciones seleccionadas se recogió una muestra de 50 mL de leche de tanque. Las muestras fueron tomadas por los veterinarios colaboradores que trabajan en la explotación y se recogieron en tubos Falcon estériles después de remover el contenido del tanque, para asegurarse de que fuesen lo más homogéneas posible. A continuación, las muestras se mantuvieron en refrigeración (4-8 °C) en una nevera portátil con acumuladores de frío en su interior y fueron transportadas al laboratorio del grupo Investigación en Sanidad Animal de Galicia (INVESAGA) en el departamento de Patología Animal de la Universidad de Santiago de Compostela (USC), donde se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su posterior análisis.

### 5.2. RECOGIDA DE DATOS Y DE LA INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA

En cada explotación muestreada se registró la ubicación de la granja, el censo y el número de vacas en ordeño, y se llevó a cabo una encuesta epidemiológica que incluía variables relacionadas con factores de manejo y características de la granja (*Tabla 3*) en base al conocimiento de los distintos factores de riesgo de infección de *C. burnetii*.

Adicionalmente, se tomaron los siguientes parámetros reproductivos de la explotación correspondientes a los 6 meses anteriores a la fecha de recogida de las muestras (*Tabla 4*):

- Índices reproductivos en vacas: días abiertos (intervalo parto-gestación), tasa de concepción en la 1ª inseminación artificial (% fertilidad 1ª IA), tasa de concepción global (% fertilidad global), tasa de preñez.
- Índices reproductivos en novillas: tasa de concepción en la 1ª inseminación artificial, tasa de concepción global (% de fertilidad) y tasa de preñez.
- Enfermedades reproductivas: abortos, mortalidad embrionaria, metritis (< 21 días post- parto), endometritis (> 21 días post-parto), retención placentaria. En el caso de los

abortos se calculó el porcentaje (Tabla 4), para metritis, endometritis y retención placentaria, se registraron el número de eventos y se categorizó la explotación como presente o ausente de esta patología.

Los datos reproductivos fueron registrados por la explotación y recogidos utilizando el software de gestión reproductiva GANDO (<https://www.gando.es>).

Tabla 3. Factores asociados al manejo y características de la granja incluidos en la encuesta epidemiológica realizada a las explotaciones lácteas en intensivo de Galicia.

Variables	Categorías
Compra de animales fuera de Galicia.	No/Si.
Presencia de zona de partos	
Presencia de zona de cuarentena	
Presencia de lazareto	
Presencia de otras especies en la nave	
Contacto de animales de otras granjas	
Contacto con rumiantes silvestres	
Reposición propia externa	
Presencia pequeños rumiantes	
Presencia de toro	
Presencia de perros y gatos	
Presencia de otros animales	
Capacidad zona de partos	Individual/ >1 animal.
Realización de Inseminación Artificial	Otros/ Ganadero.
Sistema de ordeño	Circuito/ Robot/ Sala de ordeño.
Presencia de diarrea vírica bovina (BVD)	Negativo/ Presencia anticuerpos/ Presencia virus.
Presencia de rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR)	Negativo/Positivo.
Tamaño de granja	Pequeña: <135 animales. Mediana: 135-212 animales. Grande: >212 animales.

Tabla 4. Fórmulas de los parámetros reproductivos empleados en el estudio, calculados tanto para el conjunto total de reproductoras como para novillas.

Parámetros	Fórmulas
Intervalo parto-gestación (días abiertos)	Media del número de días entre parto y la IA fecundante.
% Fertilidad 1ª IA (animales totales o novillas)	$\frac{N^{\circ} \text{ de (animales totales/novillas) gestantes en la 1}^{\text{a}} \text{ IA}}{N^{\circ} \text{ de animales inseminados 1}^{\text{a}} \text{ IA}} \times 100$
% Fertilidad global (animales totales/ novillas)	$\frac{N^{\circ} \text{ de (animales totales/novillas) gestantes}}{N^{\circ} \text{ de animales inseminados}} \times 100$
Tasa de preñez (animales totales/ novillas)	$\frac{\text{Tasa de detección de celos} \times \text{Tasa de concepción}}{100}$
Abortos	$\frac{N^{\circ} \text{ de abortos}}{\text{Partos totales}} \times 100$

### **5.3. ANÁLISIS LABORATORIAL**

#### **5.3.1. PCR A TIEMPO REAL**

##### **A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DEL ADN**

En primer lugar, se descongelaron las muestras, se homogeneizaron con un agitador vibrador para tubos y se transfirieron 200  $\mu\text{L}$  de leche a un tubo Eppendorf™ con rosca.

La extracción de ADN a partir de las muestras de leche se realizó mediante el empleo del kit comercial de purificación en columna “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche® Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del kit. Para la realización de este protocolo fue necesario el empleo de un termostato de bloque seco “Eppendorf ThermoMixer® C” (Hamburgo, Alemania) y una centrífuga “BenchMixer™ V2” (Nueva Jersey, EE. UU.).

##### **B. qPCR**

El análisis qPCR se realizó utilizando el kit comercial “EXOone *Coxiella burnetii* - oneMIX qPCR kit 100 tests” (Exopol S.L., Zaragoza, España) para la detección del gen IS1111, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la realización de la qPCR se utilizó un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  compuesto de 5  $\mu\text{L}$  de ADN extraído de la muestra de leche y 15  $\mu\text{L}$  de “Master mix” proporcionada por el kit, que incluye todos los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción: “primers”, nucleótidos, Taq polimerasa (enzima ADN polimerasa) y  $\text{MgCl}_2$ .

Las muestras se analizaron junto a dos controles: uno positivo y otro negativo; ambos proporcionados por el kit y de los cuáles se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de cada a 15  $\mu\text{L}$  de “Master mix”. Además de los controles positivo y negativo, el kit utilizado está diseñado para detectar simultáneamente la presencia del gen de la  $\beta$ -actina, que es una proteína que se encuentra en la mayoría de los tipos celulares. Esta funciona como un control interno positivo para verificar que no ha habido problemas de inhibición en cada reacción analizada, es decir, asegura que los resultados obtenidos son fiables. Una vez llenados todos los pocillos de las muestras y controles con la cantidad correspondiente, se centrifugó la placa entera durante un minuto para homogeneizar la mezcla y evitar que quedasen gotas pegadas en las paredes de los pocillos y, por último, se introdujo en el termociclador para realizar el análisis.

La qPCR se realizó según el protocolo térmico recomendado por el fabricante durante 42 ciclos (Tabla 5). El umbral de corte para considerar que la fluorescencia de la muestra supera significativamente el ruido de fondo de la lectura, se estableció en el 5 % de la fluorescencia máxima obtenida en el ensayo.

El ciclo umbral (Ct) se consideró como aquel ciclo en el que la fluorescencia superó el umbral anterior. De acuerdo con las instrucciones del fabricante, un resultado se consideró positivo cuando la curva de amplificación producto de cada muestra supera dicho umbral, y el Ct de esa muestra fue inferior a 38. La qPCR se realizó utilizando un termociclador “QuantStudio 5 qPCR” (Applied Biosystems™; Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EE. UU.).

**Tabla 5. Protocolo térmico de amplificación de la qPCR para la detección de *Coxiella burnetii* en muestras de tanque de leche.**

Ciclos	Tiempo	Temperatura	Fases
1 ciclo	5 minutos	95°C	Activación
42 ciclos	15 segundos	95°C	Desnaturalización
	60 segundos	60°C	Alineamiento, extensión y lectura

### 5.3.1. ELISA INDIRECTO

En primer lugar, se preparó una placa madre con el fin de organizar las muestras. Para ello se elaboró un diagrama de organización de pocillos que fue empleado posteriormente para la placa de ELISA. Este diagrama también sirvió para facilitar la posterior interpretación de los resultados. Así, siguiendo el esquema, se introdujeron 150 µL de cada una de las muestras en su pocillo correspondiente. Antes de comenzar con la técnica se prepararon los reactivos, atemperándolos a temperatura ambiente y se reconstituyeron a sus diluciones de uso. Se preparó la solución de lavado diluyéndola a 1:20 en agua destilada y la solución de conjugado al 1:10 en el diluyente 3 proporcionado por el kit.

La técnica de ELISA indirecto se realizó utilizando el kit comercial “ID Screen® Q Fever Indirect Multi-species” (IDvet, Grabels, Francia), basado en antígenos purificados de Fase I y Fase II de *C. burnetii*. La sensibilidad y especificidad de este kit es del 100 % según el fabricante. Se utilizan antígenos de *C. burnetii* aislados de bovinos, lo que proporciona una mayor sensibilidad en comparación con otras opciones que emplean antígenos de cepas aisladas de garrapatas (p.e., Nine Mile) (Rodolakis et al., 2007). Así, el ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones indicadas por el fabricante y, una vez completado el procedimiento, la placa se leyó utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm “Multiskan EX” (Thermo Scientific®, Waltham, MA, EE. UU.).

Las absorbancias obtenidas fueron convertidas a ratio S/P siguiendo la siguiente fórmula:

$$\frac{S}{P} (\%) = \frac{DO \text{ muestras} - DO \text{ CN}}{DO \text{ CP} - DO \text{ CN}} \times 100$$

Siendo en esta fórmula:

- S/P: Ratio de la densidad óptica entre la muestra y el control.
- DO muestras: Densidad óptica de las muestras.
- DO<sub>CN</sub>: Densidad óptica del control negativo.
- DO<sub>CP</sub>: Densidad óptica del control positivo.

Se clasificaron las muestras de tanque de leche en función del valor S/P, siguiendo el criterio establecido por el kit (*Tabla 6*).

**Tabla 6. Interpretación de los resultados según el porcentaje S/P para cada muestra de tanque de leche.**

Resultado	Estado
S/P % ≤ 30%	Negativo
30 % < S/P % ≤ 40%	Dudoso
S/P > 40%	Positivo

#### **5.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se evaluó la relación entre el resultado a la qPCR y la presencia de factores asociados al manejo y características de la granja (*Tabla 3*) utilizando modelos de regresión logística. En primer lugar, se realizó un análisis univariante para cada una de las variables consideradas utilizando la prueba chi-cuadrado o Fisher según correspondiese. Las variables que presentaron un *p-valor* < 0,1 se incluyeron en modelos logísticos multivariantes. Cuando fue necesario, se evaluó la presencia de colinealidad utilizando el factor de inflación de la varianza.

En relación con los parámetros reproductivos (*Tabla 4*), se realizó un modelo de regresión empleando como variable dependiente cada uno de ellos y como variable independiente el resultado (positivo/negativo) a la qPCR en tanque de leche mediante modelos de regresión lineal cuando los datos fueron cuantitativos. En el caso de las variables mortalidad embrionaria, retención placentaria, metritis y endometritis, dado que el número de granjas fue bajo y que muchas de las explotaciones declararon no tener problemas, estas variables se recodificaron a variables dicotómicas para la presencia o ausencia de cada condición. De esta manera, se analizaron en este caso utilizando una regresión logística. Adicionalmente, dado que en las granjas positivas podrían existir diferentes situaciones epidemiológicas en función del grado de positividad, el resultado a la qPCR se utilizó para construir una nueva variable (grado de

positividad) con tres categorías: negativa, para granjas con resultado negativo; positiva débil a la qPCR, para granjas positivas con un Ct superior a 32; y positivas fuertes, para granjas con un Ct inferior a 32. El valor de 32 se estableció como umbral ya que se correspondió con la mediana de los valores de Ct obtenidos. Una vez hecho esto, los análisis anteriores para los parámetros reproductivos se repitieron considerando en este caso la variable grado de positividad como variable independiente. En estos modelos, se evaluó la presencia de otras enfermedades (diarrea vírica bovina, BVD, y rinotraqueítis infecciosa bovina, IBR) incluyendo estas variables como cofactores.

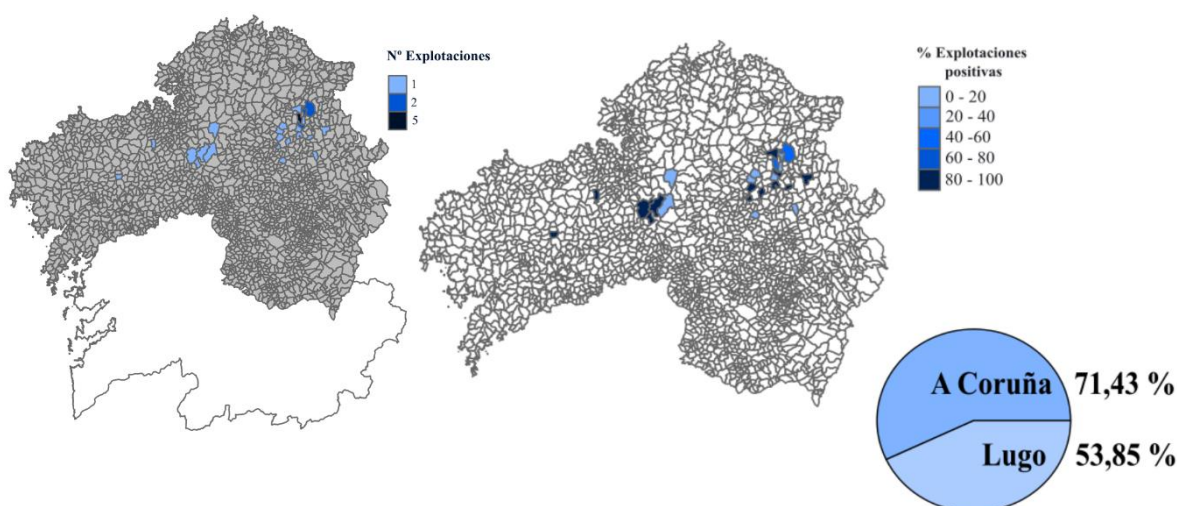
Finalmente, se compararon los resultados entre la qPCR y el ELISAi analizando la relación entre la ratio S/P y la positividad y el grado de positividad a la qPCR mediante regresión lineal; y en las granjas positivas a qPCR se evaluó la correlación entre la ratio S/P y el Ct utilizando la correlación de Pearson.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico R v.4.4.0 (R Core Team, 2024). Las asociaciones encontradas fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el *p*-valor < 0,05. La idoneidad y ajuste de los diferentes modelos se analizó utilizando el paquete estadístico “DHARMa” (Hartig, 2022).

## 6. RESULTADOS

Los resultados de los análisis de las muestras de tanque de leche mostraron que, de las 36 explotaciones incluidas en este estudio, 19 resultaron positivo a **qPCR**, es decir, un poco más de la mitad de las granjas presentaron eliminación activa de la bacteria (52,3 %). Sin embargo, con relación a los resultados del **ELISAi** se observó una mayor exposición al patógeno al encontrar que el 97,2 % (35/36) de las explotaciones fueron seropositivas. Es importante mencionar que ninguna de las granjas del estudio vacunaba frente a *C. burnetii*.

*Coxiella burnetii* se mostró muy extendida geográficamente ya que la presencia directa de la bacteria se identificó en 15 de las 24 parroquias muestreadas (62,5 %) (*Figura 5*) y se detectaron anticuerpos en 23 de las 24 con el ELISAi (95,8 %). A Coruña mostró una mayor prevalencia en comparación con la provincia de Lugo (71,4 % vs 53,9 %) (*Figura 5*), aunque no se han observado diferencias significativas en cuanto a la presencia de la bacteria entre las dos provincias muestreadas (*p-valor* = 0,686).



*Figura 5.* Número de explotaciones muestreadas por cada parroquia y distribución espacial de las positivas a qPCR en las distintas parroquias de las provincias de Lugo y A Coruña. Porcentaje de explotaciones positivas a *Coxiella burnetii* mediante qPCR según la provincia.

Se encontró una mayor proporción de granjas positivas a qPCR cuanto mayor era el **tamaño de la explotación** y el **número de animales en ordeño**. Así, en las dos variables se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con lo cual la probabilidad de ser positiva aumentaría a medida que incrementan el número total y en ordeño de animales en una explotación (*p-valor* < 0,001 en ambos casos). Por otra parte, de las 36 explotaciones muestreadas, 32 de ellas cubrieron la encuesta epidemiológica. La *Figura 6* muestra la relación entre el porcentaje de granjas positivas a *C. burnetii* y los diferentes **factores asociados al manejo y características de la granja**, que se incluyeron en el análisis. Entre los factores considerados, es destacable que

el porcentaje de granjas que estaban eliminando *C. burnetii* fue mayor en: las que presentaban lazareto y sala de ordeño, las que realizaron compra de animales fuera de Galicia en el último año y en las que tenían una capacidad de la zona de partos para más de un animal (Figura 6). Estas asociaciones no fueron estadísticamente significativas, si bien es cierto que se encontró cierta aproximación a la significación estadística en la compra de animales fuera de Galicia ( $p$ -valor = 0,052), en las granjas que poseen sala de ordeño ( $p$ -valor = 0,086) y en la presencia de lazareto ( $p$ -valor = 0,053). Por este motivo, estas variables fueron evaluadas posteriormente en el análisis multivariante.

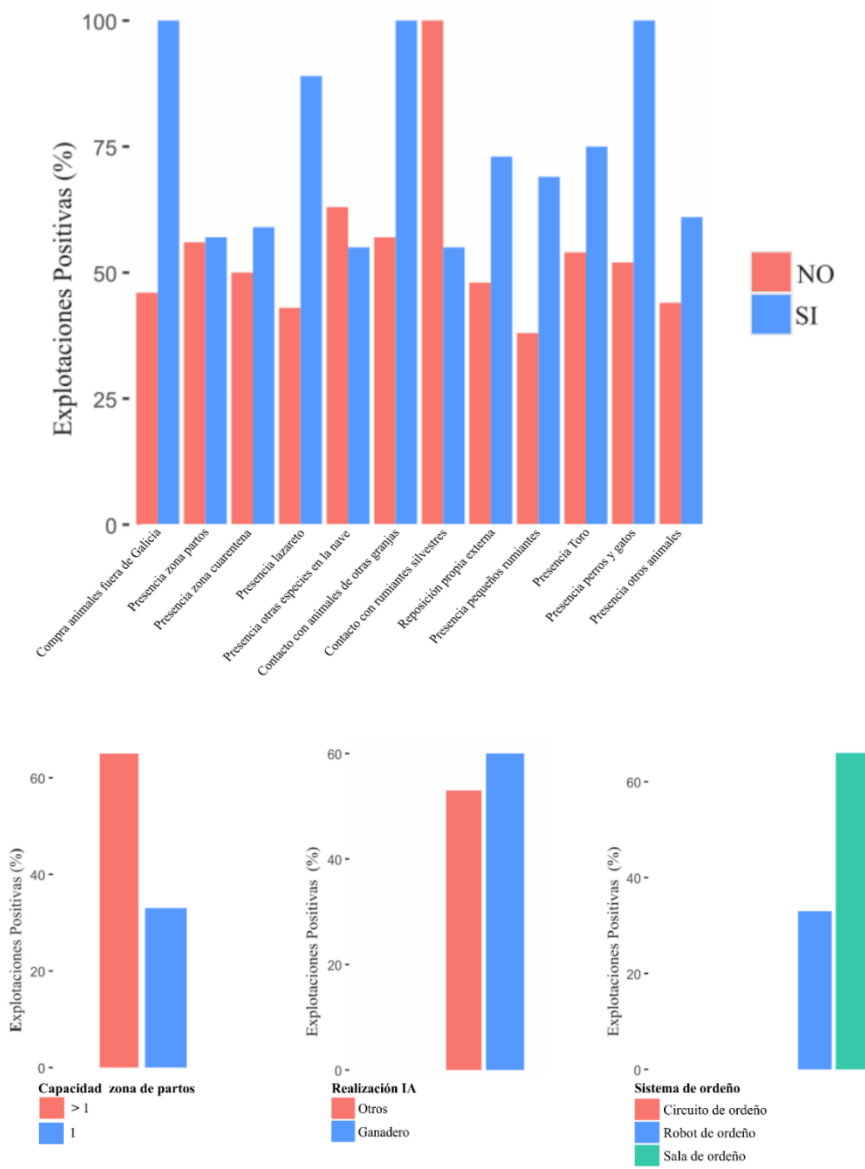


Figura 6. Relación entre la detección directa de *Coxiella burnetii* (qPCR) y los distintos factores asociados al manejo y características de la granja (n = 32).

En cuanto a la presencia de otros patógenos, se observó que el porcentaje de granjas positivas a *C. burnetii* en tanque de leche fue mayor en las explotaciones negativas a **BVD** e **IBR** (Figura 7). A pesar de esto, no se hallaron asociaciones estadísticamente significativas.

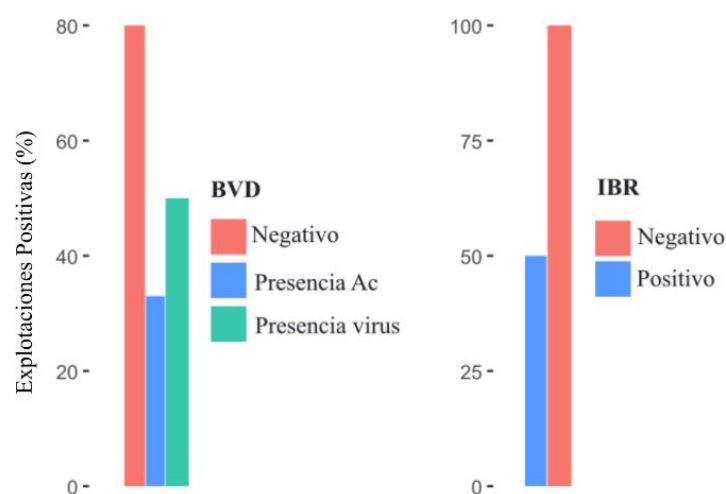


Figura 7. Relación entre la detección directa de *Coxiella burnetii* (qPCR) y la presencia de otras enfermedades (n = 32).

El análisis multivariante detectó diferencias estadísticamente significativas para la variable de lazareto y tamaño de granja (Tabla 7). Las granjas que tenían lazareto tuvieron una mayor probabilidad de ser positivas a *C. burnetii* mediante qPCR (OR = 23,9); asimismo, las granjas de tamaño grande resultaron ser un factor de riesgo (OR = 26,3) frente a las pequeñas.

Tabla 7. Resultados del análisis multivariante de los factores de riesgo que presentaron una asociación estadísticamente significativa para la presencia de *Coxiella burnetii* (n = 32).

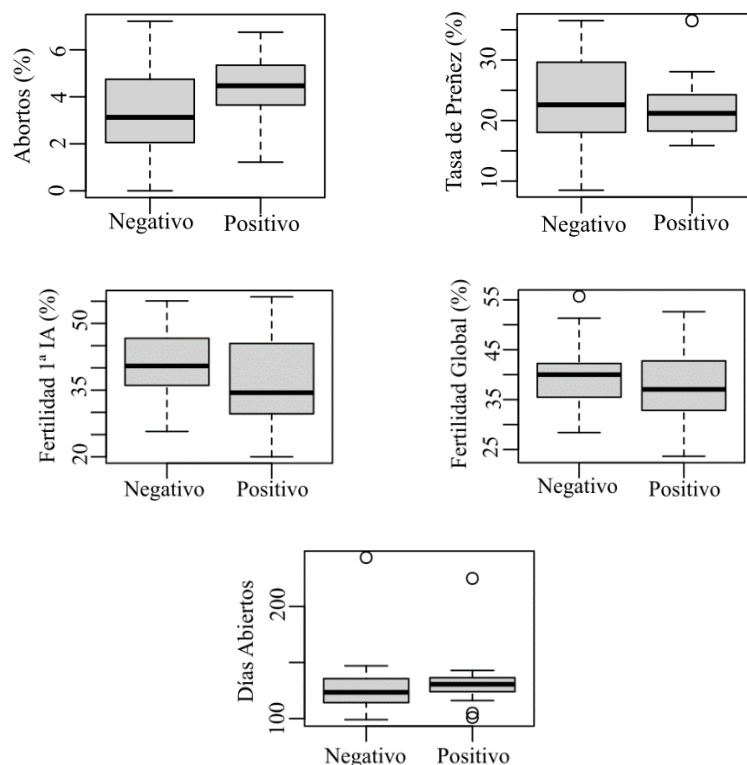
Variable	Categoría	n/total (%)	OR	IC95%	p-valor
Lazareto	No	*	*	*	*
	Si	8/9 (89)	23,9	2,1 a 886,7	0,028
Tamaño de granja	Pequeña	*	*	*	*
	Mediana	5/11 (45)	0,8	0,03 a 8,1	0,827
	Grande	10/11 (91)	26,3	2,8 a 657,4	0,012

\* Categoría de referencia.

Los datos reproductivos fueron remitidos de 34 de las 36 explotaciones muestreadas. La Figura 8 muestra la variabilidad de los valores de cada parámetro reproductivo recogido en el estudio en función del resultado a la qPCR. Para estudiar la influencia entre los distintos **parámetros reproductivos** y la detección del patógeno mediante qPCR, se llevaron a cabo modelos univariantes para cada parámetro en relación con el resultado de la qPCR en tanque.

Aunque en la mayor parte de los parámetros no se observaron diferencias significativas entre los valores en granjas positivas y negativas, sí que se detectó un porcentaje de abortos mayor en las

explotaciones positivas (4,3 % vs 3,3 %). Los porcentajes de tasa de preñez, fertilidad 1ª IA y fertilidad global fueron ligeramente superiores en las granjas que dieron negativas a la qPCR. Además, el número de días abiertos también fue un poco mayor en las granjas positivas (Figura 8). No obstante, los modelos de regresión no detectaron diferencias significativas.



**Figura 8. Diagramas de cajas de para los valores de cada parámetro reproductivo considerado, en función de la detección de *Coxiella burnetii* en tanque de leche mediante qPCR de las explotaciones incluidas en el estudio (n = 34).**

Dado que muchas de las granjas no presentaron problemas de mortalidad embrionaria, retención placentaria, metritis y endometritis en los últimos seis meses, estas variables se recodificaron como variables dicotómicas (Tabla 8). Se observó un mayor porcentaje de explotaciones con mortalidad embrionaria en aquellas que resultaron negativas a qPCR en comparación con las positivas (56 % vs 44 %). La presencia de problemas de retención de placenta y metritis en las explotaciones fueron muy similares en función de la detección de *C. burnetii*. No obstante, fue destacable el mayor porcentaje de granjas positivas que tuvieron endometritis respecto a las negativas (71 % vs 29 %). Sin embargo, no se hallaron asociaciones estadísticamente significativas para ninguno de estos parámetros.

Tabla 8. Presencia de mortalidad embrionaria, retención placentaria, metritis y endometritis, en función de la detección en leche de *Coxiella burnetii* (n = 34).

Variable		qPCR		
		Negativo	Positivo	Nº total
<b>Mortalidad embrionaria</b>	No	5 (33 %)	10 (67 %)	15
	Si	10 (56 %)	8 (44 %)	18
<b>Retención placentaria</b>	No	3 (43 %)	4 (57 %)	7
	Si	12 (44 %)	15 (56 %)	27
<b>Metritis</b>	No	1 (25 %)	3 (75 %)	4
	Si	14 (47 %)	16 (53 %)	30
<b>Endometritis</b>	No	10 (59 %)	7 (41 %)	17
	Si	5 (29 %)	12 (71 %)	17

Debido a que *C. burnetii* puede estar presente en una explotación en diferentes situaciones epidemiológicas, las granjas positivas se reclasificaron en positivas débiles o fuertes dependiendo del valor Ct encontrado en el análisis. Cuando se evaluaron estos indicadores en relación con este grado de positividad de qPCR sí que se hallaron asociaciones estadísticamente significativas con las variables porcentaje de **abortos en las granjas** (Figura 9) y la presencia o no de **endometritis** en las explotaciones.

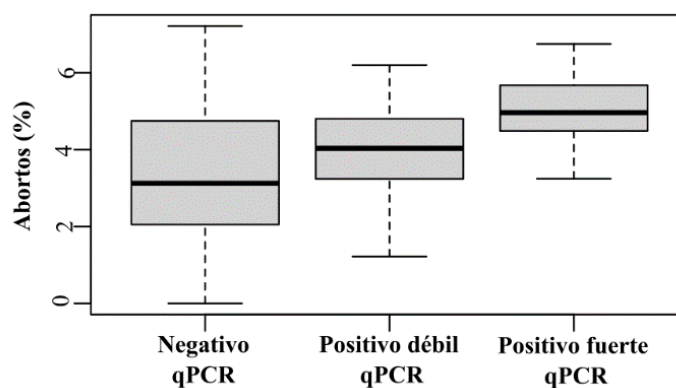


Figura 9. Diagrama de cajas del porcentaje de abortos según la clasificación del grado de positividad de la qPCR (n = 34).

En este sentido, se encontraron porcentajes de abortos significativamente superiores en las granjas que presentaron un grado de positividad fuerte ( $Ct < 32$ ) en comparación con las granjas negativas (5 % vs 3 %) ( $OR = 1,03$ ;  $IC_{95\%}$  de 1,001 a 1,033;  $p$ -valor = 0,034). Sin embargo, no se encontró una relación significativa entre las positivas débiles (4 %) y las negativas ( $OR = 1,0$ ;  $IC_{95\%}$  de 0,9 a 1,02;  $p$ -valor = 0,409) (Figura 9). En el caso de las endometritis, las explotaciones con un  $Ct$  más bajo (positivas fuertes) presentaron una mayor tendencia a tener problemas de endometritis respecto a las negativas (35 % vs 29 %) a qPCR ( $OR = 12$ ;  $IC_{95\%}$  de 1,5 a 262,1;  $p$ -valor = 0,04). En cambio, tampoco se descubrió una diferencia significativa entre las explotaciones con un menor grado de positividad respecto a las negativas ( $OR = 2$ ;  $IC_{95\%}$  de 0,4 a 10;  $p$ -valor = 0,384). Por último, se realizó una **comparación** entre los datos obtenidos de la **qPCR** y del **ELISAI**. En primer lugar, todas las granjas positivas a qPCR también lo fueron a ELISAI. Al comparar los resultados de ambos análisis, se observó que las granjas positivas a qPCR mostraron unos valores S/P más elevados con respecto a las negativas (120,3 frente a 100,7), pero estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Figura 9). Seguidamente, con el objetivo de buscar una relación entre los valores de la ratio S/P y el  $Ct$  de la qPCR, se realizó el análisis en base a las categorías del grado de positividad de la qPCR. Las categorías de positivas fuerte y débil presentaron valores de ratio S/P superiores a las negativas (119,7, 120,7 y 100,7 respectivamente), pero fueron muy similares entre ellas. En cualquier caso, no se detectaron asociaciones estadísticamente significativas entre los resultados a qPCR y a ELISAI. Adicionalmente, en las granjas positivas a qPCR se analizó la presencia de correlación entre los valores de la ratio S/P y el  $Ct$  de la qPCR, pero no se detectó una correlación significativa ( $p$ -valor = 0,609,  $r = -0,1$ ) (Figura 10).

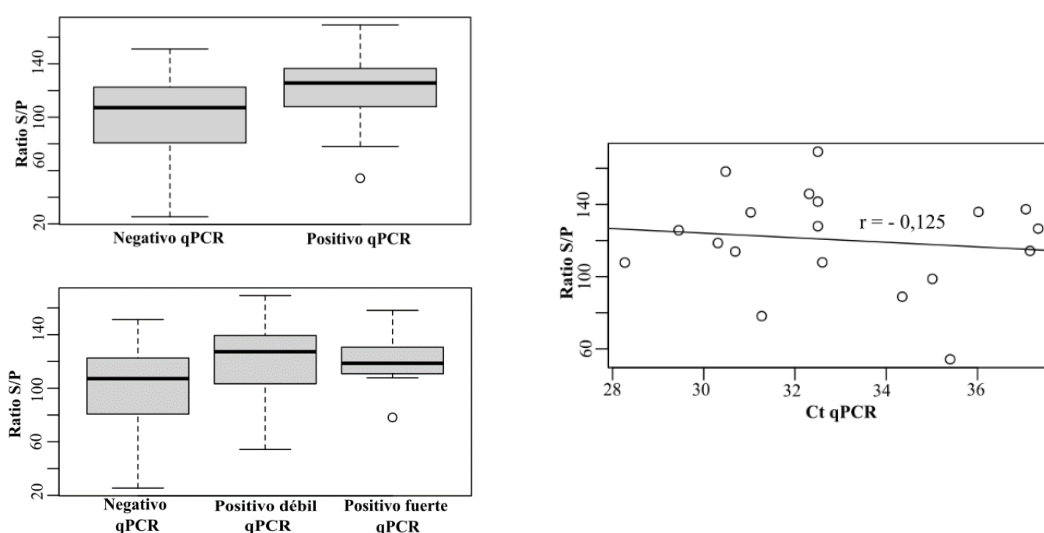


Figura 10. Diagramas de cajas para la variación de la ratio S/P del ELISAI en función del resultado a la qPCR: presencia/ausencia y grado de positividad; y, diagrama de dispersión entre la ratio S/P del ELISAI y el valor  $Ct$  de la qPCR de las muestras en tanque de leche de las 36 explotaciones incluidas en el estudio ( $n = 34$ ).

## 7. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en Galicia en el que se realiza una evaluación simultánea de la prevalencia y seroprevalencia frente a *C. burnetii* en ganado vacuno de leche. Los resultados mostraron una elevada proporción de granjas con infección activa frente a *C. burnetii* así como una amplia exposición a la bacteria en las explotaciones de ganado bovino lechero en las provincias de Lugo y A Coruña, encontrando anticuerpos en casi la totalidad de las granjas analizadas. Esto confirma que *C. burnetii* es un patógeno endémico en las explotaciones lecheras de esta región. En estas circunstancias se resalta la necesidad de estudiar la posible repercusión que pueda tener la bacteria en el rendimiento productivo en los rebaños ya que muchas explotaciones van a estar expuestas. Además, la elevada presencia de la bacteria en el ambiente ganadero constituye un riesgo importante para la salud pública, especialmente en determinados grupos de población como ganaderos o veterinarios.

En este estudio se han utilizado muestras de leche en tanque ya que presentan características muy útiles para obtener información sobre la infección con *C. burnetii*. Estas son económicas y fáciles de recolectar y, pueden sintetizar el estado sanitario de la explotación en una muestra, proporcionando datos epidemiológicos valiosos (Astobiza et al., 2012). Además, son un tipo de muestra especialmente interesante en esta bacteria debido al largo periodo de excreción por leche en vacuno. Pese a todo, cabría considerar cómo el posible efecto dilución de las muestras de leche en tanque podría afectar a los resultados obtenidos. No obstante, en este trabajo no parece haber tenido influencia ya que se encontró una asociación estadística en la que la probabilidad de detectar la bacteria fue mayor cuando el número de animales en ordeño fue superior.

La **prevalencia** de rebaños con eliminación de la bacteria en este estudio (52,3 %) fue mayor que en el estudio realizado en el País Vasco (51,7 %) a partir de muestras de tanque de leche. Esto es importante ya que en el País Vasco se considera una región hiperendémica en seres humanos (Astobiza et al., 2012b) por tanto, es posible que el contacto con la bacteria en Galicia pueda ser también alto. Por otra parte, el Ct obtenido en la qPCR es proporcional a la cantidad de bacteria presente en la muestra. Esta cantidad fue muy elevada en algunas muestras, que tenían valores de Ct relacionados con una alta eliminación ( $Ct < 32$ ). Las granjas con estos valores podrían indicar la existencia de una alta prevalencia intrarrebaño, dado que se ha encontrado cierta correlación entre el nivel de excreción y la prevalencia intrarrebaño (Boroduske et al., 2017).

En relación con los resultados de **seroprevalencia**, los resultados obtenidos en este estudio (97,2 %) demostraron un incremento destacable frente a los descritos por Yáñez et al, (2024) realizado en el año 2010 en la misma región (60,1 %), en el cual se detectaron anticuerpos en leche de tanque de 262 explotaciones lecheras. Una explicación para el incremento en el nivel de

exposición puede ser la falta de actuaciones de control frente a la coxielosis bovina (p.e, no está incluida en los programas de control sanitario de las ADSG de Galicia a diferencia del IBR o BVD, y generalmente tampoco se suelen realizar programas dirigidos a esta bacteria en las explotaciones). Esta falta de control rutinario y la no aplicación de medidas de prevención específicas como la vacunación, favorece que la difusión y exposición del patógeno aumenten. En una situación de alta exposición esto puede implicar una mayor posibilidad de sufrir consecuencias clínicas por el patógeno. Los resultados de seroprevalencia hallados en este estudio también fueron mayores que los encontrados en otros estudios hechos en España (con un rango entre el 30 % y el 74 %) (Álvarez et al., 2012; López-Gatius et al., 2012; Nogareda et al., 2013; Ruiz-Fons et al., 2008; García-Seco, 2017). Dado que muchos de esos estudios no son recientes, sería necesario investigar si podría haber aumentado la exposición de forma generalizada ante la falta de un control específico. No obstante, hay que tener en cuenta que las diferencias encontradas tanto a nivel de detección directa como indirecta también podrían ser fruto del diferente diseño de los estudios, animales muestreados o de las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas (IFA, ELISAI, qPCR...). En este sentido, en lo referente al considerable porcentaje de seroprevalencia detectado respecto a otros trabajos es conveniente indicar que, en el presente estudio se usó un ELISAI con antígenos de cepas provenientes de rumiantes domésticos, que proporciona una mayor sensibilidad diagnóstica que los ELISAI a partir de antígenos extraídos de la cepa de referencia Nine Mile aislada en garrapatas (Lurier et al., 2021). De igual manera, la técnica de detección directa qPCR que fue seleccionada en este estudio aporta mejores resultados que una PCR convencional (Guatteo et al., 2007). Por tanto, es posible que la presencia y exposición de la bacteria en otras zonas pudiera estar siendo ligeramente infraestimada.

Además, resulta interesante contrastar los resultados de este estudio con las seroprevalencias halladas en las explotaciones de pequeños rumiantes de Galicia, ovino y caprino, ya que en este caso las seroprevalencias de rebaño fueron menores (34,1 % y 60 %, respectivamente) (Díaz, et al., 2014). *Coxiella burnetii* puede encontrar diferentes hospedadores en los rumiantes domésticos que pueden servir de fuente de infección. La falta de asociación estadística encontrada en este estudio entre la presencia de la bacteria en la explotación y la presencia de pequeños rumiantes (Figura 6) sugiere que estas especies no están suponiendo un riesgo de infección destacable para el bovino. Al contrario, la mayor seroprevalencia en vacuno podría indicar que esta especie puede estar actuando como un reservorio para pequeños rumiantes. Esto es especialmente relevante si tenemos en cuenta que *C. burnetii* cursa de forma más grave en pequeños rumiantes, en los que se considera un agente abortivo importante (Guatteo, 2013).

El modelo multivariante identificó como posibles factores de riesgo para la presencia de *C. burnetii* en explotaciones lecheras de ganado bovino en Galicia al tamaño de la granja y a la presencia de lazareto. La influencia del **tamaño de la granja** frente a la prevalencia ha sido

detectada también en varios estudios (Boroduske et al., 2017; Nokhodian et al., 2016), y no solo se ha encontrado relacionado con la presencia directa de la bacteria, sino que esta tendencia también se observa cuando se valora la seroprevalencia (Neare et al., 2023; Yáñez et al., 2024; van Engelen et al., 2014). La mayor probabilidad de presencia de la bacteria en explotaciones grandes puede ser debida a que en estas suele ser más frecuente encontrar una mayor densidad de animales, lo que favorece una mayor interacción entre los susceptibles e infectados. Además, el contacto con el patógeno también se puede ver incrementado por un mayor número de partos ya que suele haber una elevada excreción de la bacteria alrededor de este momento, por vía genital y por leche. Esto facilita la dispersión y el mantenimiento de la bacteria en la explotación. Por otra parte, es posible que el tamaño de la explotación influya sobre el tipo de prácticas de manejo que se llevan a cabo. Así, explotaciones de distinto tamaño pueden presentar diferentes riesgos para la entrada y difusión de la bacteria. Por ejemplo, Yáñez et al. (2024) identificaron una mayor seropositividad en granjas que compraron animales, sin embargo, esto solo ocurrió cuando las explotaciones eran de pequeño tamaño (< 36 animales). En el presente estudio se vio que las granjas que usaban reposición externa y que compraban animales fuera de Galicia presentaron una mayor probabilidad de ser positivas mediante qPCR (*Figura 6*), pero no se hallaron diferencias significativas. La bioseguridad también puede ser diferente en función del tamaño de granja. Por ejemplo, explotaciones de mayor tamaño tienen una tendencia a recibir una mayor afluencia de visitas externas, lo que potencia el riesgo de introducción del patógeno (Neare et al., 2023; Paul et al., 2012). Todas estas diferentes situaciones que pueden darse en explotaciones de distinto tamaño podrían explicar la mayor probabilidad de presencia de *C. burnetii* en las granjas más grandes encontrada en este estudio, y plantean la necesidad de realizar futuras investigaciones que permitan caracterizar mejor estos riesgos.

En este contexto, en este trabajo se encontró un número significativamente mayor de granjas positivas a qPCR cuando estas presentaban **lazareto**. Esta relación no es común en otros estudios, y podría atribuirse a este manejo diferenciado que puede existir en función del tamaño de las granjas. De hecho, en este estudio se observó que las explotaciones de menor tamaño no presentaban dicha estancia (solamente el 9 % de las explotaciones con menos de 135 animales contaba con ella). Sin embargo, la variable se retuvo en el modelo ya que la asociación se mantuvo cuando ambas variables estuvieron presentes en el modelo, con lo que se podría estar enmascarando otras no incluidas en este estudio que tengan una mayor probabilidad de tener *C. burnetii*. Los resultados reiteran la importancia de caracterizar mejor los factores de riesgo en granjas de mayor tamaño para comprender la dinámica del patógeno. De esta manera, sería interesante realizar estudios posteriores más detallados para entender la influencia de esta y otras variables en el riesgo de presencia de *C. burnetii*.

En lo relativo a la influencia sobre los distintos **parámetros reproductivos** solamente se encontró una asociación significativa cuando se analizaron según el grado de positividad de qPCR y no cuando se analizaron como presencia/ausencia; observándose una mayor probabilidad de abortos y endometritis cuando las explotaciones tenían una excreción muy elevada de la bacteria en tanque de leche (positivas fuertes a qPCR). Esta diferencia en el efecto sobre los parámetros reproductivos dependiendo de si se analizan solamente por presencia/ausencia o por grado de positividad sugiere que la asociación con problemas reproductivos en bovinos por *C. burnetii* son más probables cuando la cantidad de bacteria en el tanque es más elevada, y que granjas con niveles de bacteria en tanque más bajos no parecen estar asociadas a problemas reproductivos. Por otra parte, debido a que con este tipo de muestras no es posible identificar cuáles son los animales infectados, esta mayor cantidad de bacteria en tanque puede corresponderse con varias circunstancias. Puede ser consecuencia de una alta prevalencia intrarrebaño (muchos animales infectados) o bien producida por unos pocos animales persistentemente infectados que eliminen altos niveles de *C. burnetii* en leche.

La asociación con problemas de **abortos** ha sido señalada anteriormente en la bibliografía (Gisbert et al., 2024). Además, la mayor probabilidad de padecer abortos hallada en este estudio es consistente con un trabajo realizado previamente en Galicia, en el cual *C. burnetii* fue el agente identificado con mayor frecuencia en fetos abortados (González-Warleta et al., 2016). En relación con la **endometritis**, la mayor probabilidad de detectar este problema en granjas infectadas no solo se detectó en otros estudios que realizaron qPCR a partir de muestras de tanque de leche (Valla et al., 2014), sino también en los que analizaron la presencia de anticuerpos en tanque de leche (Yáñez et al., 2024). Sin embargo, estas asociaciones no se han reproducido de forma sistemática en todos los casos. Por ejemplo, en un trabajo se encontró una menor probabilidad de sufrir endometritis en animales seropositivos eliminadores (López-Gatius et al., 2012). La presencia de otros patógenos que puedan afectar a la reproducción bovina también puede influenciar en los resultados hallados. En este sentido, resulta pertinente mencionar que los modelos de regresión desarrollados en el presente estudio entre los parámetros reproductivos y el grado de positividad a *C. burnetii* tuvieron en cuenta el estado sanitario con respecto a IBR y BVD, y no se detectó un efecto de estas enfermedades en los resultados obtenidos; además, la mayoría de las granjas que dieron positivo a la prueba directa frente a *C. burnetii*, fueron negativas a estas enfermedades (*Figura 7*).

La falta de concordancia entre los resultados obtenidos en diferentes estudios podría verse afectada por los distintos patrones de infección que pueden estar presentes en las explotaciones. De esta forma, Böttcher et al., (2024) han sugerido que las explotaciones positivas pueden presentar diferentes resultados diagnósticos en función de la predominancia en la explotación de situaciones agudas o crónicas. Por ejemplo, infecciones agudas están relacionadas con patrones

de respuesta serológicos positivos a Fase II, pero negativos a Fase I, y la eliminación de la bacteria se da de forma más frecuente en estas situaciones agudas, cuando la respuesta es solamente frente Fase II (Böttcher et al., 2024). El hecho de que una infección esté cursando de forma aguda o crónica podría influir en la manifestación clínica de la infección de igual forma que influye en la eliminación. El hecho de presentar un Ct más bajo podría reflejar que la explotación presenta muchos animales sufriendo una infección aguda y siendo eliminadores. Esto tal vez explicaría la asociación con problemas reproductivos en granjas con mayor grado de positividad a qPCR, que podrían ser explotaciones con una mayor proporción de animales con infecciones agudas.

En relación con esto, no se halló una correlación estadísticamente significativa entre el Ct de la qPCR y la ratio S/P en ELISAI. Esto podría sugerir que es posible tener explotaciones con niveles de anticuerpos similares, pero con diferente grado de excreción de la bacteria dado que, en ocasiones, las infecciones con *C. burnetii* se han caracterizado por presentar una ausencia de concordancia entre el resultado serológico y la excreción ya que puede que esto se encuentre influenciado por el tipo de infección (aguda/crónica) que sufra el animal (Böttcher et al., 2011). Los ELISAI comerciales, como el empleado en este estudio, no permiten diferenciar los anticuerpos de cada Fase, por lo que la falta de asociación entre la ratio S/P y el grado de positividad es probable que esté relacionada con que la mayor excreción de la bacteria se produce en una Fase antigénica específica. Por ejemplo, anticuerpos producidos en respuesta a una Fase I podrían ser detectados en una elevada magnitud, pero no ir acompañados de eliminación porque el estado de la infección es más crónico. De esta manera, se puede encontrar una alta excreción independientemente de la ratio S/P mostrada en el ELISAI ya que los anticuerpos detectados en el ELISAI podrían provenir de infecciones más o menos relacionadas con la eliminación. Esto sería consistente con los resultados que se han observado al analizar los parámetros reproductivos y el grado de positividad. No obstante, en otros estudios como el de Astobiza et al., (2012b) sí que se observó una relación positiva entre las dos técnicas. Estas diferencias también se podrían atribuir a las distintas situaciones epidemiológicas entre estudios. Por otra parte, debe considerarse que en este estudio el número de muestras fue limitado, lo cual puede influir en la capacidad para detectar asociaciones.

En resumen, este trabajo confirma la existencia de una alta exposición y presencia de *C. burnetii* en las granjas gallegas de bovino, y sugiere la posibilidad de su implicación en trastornos reproductivos en granjas con perfiles epidemiológicos concretos, por ejemplo, con alta prevalencia intrarrebaño o con alta eliminación. En base a los resultados presentados en este estudio, sería interesante llevar a cabo investigaciones en las que se emplee un ELISAI que permita discernir entre los anticuerpos de Fase I y de Fase II, para poder evaluar si los distintos perfiles serológicos que pueden presentar las granjas se pueden asociar a niveles de excreción específicos de la bacteria y a mayores consecuencias clínicas de la infección. Dada la complejidad

de la dinámica de la infección por *C. burnetii* en las granjas, determinar estas asociaciones podría ayudar a entender mejor su impacto clínico en las explotaciones. De esta forma, se podrían definir mejor los métodos de control más adecuados para prevenir la infección. Por lo tanto, estos resultados suponen una estimación preliminar de la presencia de *C. burnetii* en granjas de leche de Galicia y puede servir para diseñar nuevos estudios que permitan esclarecer la influencia de las infecciones con esta bacteria sobre la situación sanitaria y productiva de los rebaños: estudios con un mayor número de muestras, de análisis a nivel individual, sobre el impacto económico asociado con la enfermedad...; incluso, investigaciones longitudinales con el propósito de entender el comportamiento de *C. burnetii* en las explotaciones de ganado vacuno de una manera más precisa (Rabaza et al., 2021). Por último, es importante destacar el carácter zoonótico de la enfermedad y el riesgo que podría suponer en vista de la alta presencia encontrada en el bovino gallego. En este sentido, conocer el grado de exposición y los genotipos circulantes en los rebaños de Galicia también sería interesante para caracterizar la epidemiología y el riesgo para la salud pública.

## **8. CONCLUSIONES**

Tras la realización de este trabajo, se podrían considerar las distintas conclusiones que se exponen a continuación:

1. Se encuentra una elevada presencia, exposición y distribución geográfica de *Coxiella burnetii* en las explotaciones de vacuno lechero de Lugo y A Coruña, con valores de prevalencia de 52,3 % y de seroprevalencia de 97,2 %.
2. El tamaño de granja y la presencia de lazareto son factores asociados significativamente con una mayor presencia de *C. burnetii* en el vacuno lechero de Galicia. Las diferentes características de las explotaciones en función de su tamaño podrían influir en el riesgo a que la bacteria esté presente en las explotaciones.
3. Las explotaciones con un mayor grado de positividad de la bacteria en tanque de leche ( $Ct < 32$ ) presentaron mayores porcentajes de abortos y una mayor probabilidad de sufrir endometritis.
4. No se identificó una asociación estadísticamente significativa entre los resultados de ELISAI y la qPCR. Debe discernirse si la existencia de diferentes patrones serológicos y de excreción de la bacteria pueden influir en la falta de asociación entre las técnicas empleadas.
5. Sería recomendable analizar la influencia de *C. burnetii* en los parámetros reproductivos teniendo en cuenta el tipo de infección (aguda/crónica) existente en la explotación.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abnave, P., Muracciole, X., & Ghigo, E. (2017). *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide: What do we know? *International Journal of Molecular Sciences* 18(12), 2509  
<https://doi.org/10.3390/ijms18122509>
- Agerholm, J. S. (2013). *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals a critical review.. *Acta Veterinaria Scandinavica* 55(13), DK -1870  
<http://www.actavetscand.com/content/55/1/13>
- Ali, S., Saeed, U., Rizwan, M., El-Adawy, H., Mertens-Scholz, K., & Neubauer, H. (2022). Serological Prevalence of and Risk Factors for *Coxiella burnetii* Infection in Women of Punjab Province, Pakistan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph19084576>
- Álvarez, J., Pérez, A., Mardones, F. O., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Pagés, E., Mirat, F., Díaz, R., Carpintero, J., & Domínguez, L. (2012). Epidemiological factors associated with the exposure of cattle to *Coxiella burnetii* in the Madrid region of Spain. *Veterinary Journal*, 194(1), 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.02.022>
- Anastácio, S., de Sousa, S. R., Saavedra, M. J., & da Silva, G. J. (2022). Role of Goats in the Epidemiology of *Coxiella burnetii*. *Biology*, 11(12),1703.  
<https://doi.org/10.3390/biology11121703>
- Arricau-Bouvery, N., & Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Veterinary Research*, 36(3), 327–349. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005010>
- Astobiza, I., Tilburg, J. J. H. C., Piñero, A., Hurtado, A., García-Pérez, A. L., Nabuurs-Franssen, M. H., & Klaassen, C. H. W. (2012a). Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 8(241).  
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-241>
- Astobiza, I., Ruiz-Fons, F., Piñero, A., Barandika, J. F., Hurtado, A., & García-Pérez, A. L. (2012b). Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1632–1638. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4721>
- Barlow, J., Rauch, B., Welcome, F., Kim, S., Dubovi, E., Schukken, Y., & Kim, S. G. (2008). Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Veterinary Research*, 39(3), 23. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007060i>

- Beare, P. A., Jeffrey, B. M., Long, C. M., Martens, C. M., & Heinzen, R. A. (2018). Genetic mechanisms of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide phase variation. *PLoS Pathogens*, *14*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006922>
- Boroduske, A., Trofimova, J., Kibilds, J., Papule, U., Sergejeva, M., Rodze, I., & Grantina-Ievina, L. (2017). *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in dairy cattle and associated risk factors in Latvia. *Epidemiology and Infection*, *145*(10), 2011–2019. <https://doi.org/10.1017/S0950268817000838>
- Böttcher, J., Alex, M., Dänicke, S., Gethmann, J., Mertens-Scholz, K., & Janowetz, B. (2024). Susceptibility, Immunity, and Persistent Infection Drive Endemic Cycles of Coxiellosis on Dairy Farms. *Animals*, *14*(7), 1056. <https://doi.org/10.3390/ani14071056>
- Böttcher, J., Vossen, A., Janowetz, B., Alex, M., Gangl, A., Randt, A., & Meier, N. (2011). Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd. *Veterinary Microbiology*, *151*(3–4), 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.007>
- Díaz, J. M., Fernández, G., Prieto, A., Valverde, S., Lago, N., Díaz, P., Panadero, R., López, C., Morrondo, P., & Díez-Baños, P. (2014). Epidemiology of reproductive pathogens in semi-intensive lamb-producing flocks in North-West Spain: A comparative serological study. *Veterinary Journal*, *200*(2), 335–338. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.022>
- Dragan, A. L., & Voth, D. E. (2020). *Coxiella burnetii*: international pathogen of mystery. *Microbes and Infection*. *22*(3),100–110. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.09.001>
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on Q fever. *EFSA Journal*, *8*(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1595>
- EFSA. (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, *21*(12), 186–193. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J. L., Maurin, M., & Raoult, D. (2017). From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: A paradigm change. *Clinical Microbiology Reviews* *30*(1),115-190. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-16>
- Espí, A., Del Cerro, A., Oleaga, Á., Rodríguez-Pérez, M., López, C. M., Hurtado, A., Rodríguez-Martínez, L. D., Barandika, J. F., & García-Pérez, A. L. (2021). One health approach: An overview of q fever in livestock, wildlife and humans in Asturias (northwestern Spain). *Animals*, *11*(5),1395. <https://doi.org/10.3390/ani11051395>
- Garcia-Ispuerto, I., López-Helguera, I., Tutusaus, J., Serrano, B., Monleón, E., Badiola, J., & López-Gatius, F. (2013). *Coxiella burnetii* shedding during the peripartum period and

- subsequent fertility in dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(3), 441–446. <https://doi.org/10.1111/rda.12095>
- García-Pérez, A. L. (18 de octubre de 2017). *Coxiella burnetii*: Prevalencia de la infección en rumiantes de la CAPV. Jornada técnica: Fiebre Q y bioseguridad en explotaciones. Escuela Agraria de Arkaute (ARABA) <https://www.elika.eus/wpcontent/uploads/sites/10/2019/11/Ana-Garc%C3%ADa.pdf>
- García-Seco Romero, T. (2017). Epidemiología de la Fiebre Q en rumiantes domésticos en la zona central de la península ibérica. Tesis de veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. <https://www.visavet.es/data/tesis/epidemiologia-fiebre-Q-rumiantes-domesticos-tesis-garcia-seco.pdf>
- Gisbert, P., Garcia-Ispuerto, I., Quintela, L. A., & Guatteo, R. (2024). *Coxiella burnetii* and Reproductive Disorders in Cattle: A Systematic Review. *Animals*, 14(9), 1313. <https://doi.org/10.3390/ani14091313>
- González-Barrio, D. (2015). Epidemiología y control de la Fiebre Q (*Coxiella burnetii*) en fauna silvestre ibérica. Tesis doctoral, Universidad de Castilla La Mancha, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. <https://ruidera.uclm.es/bitstreams/2a0b4743-d3a5-4dd8-8017-3a90e555e7da/download>
- González-Warleta, M., Ferreras, M., Calvo Santalla, C., Fernández MB, Benavides, J., Pérez, V., Castro-Hermida, J., & Mezo, M. (11 de mayo de 2016). Agentes infecciosos causantes de abortos en granjas lecheras de Galicia. XXI Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina. Santiago de Compostela. <http://hdl.handle.net/10261/149748>
- Guatteo, R. (2013). Q fever, an emerging disease. *Servet editorial*, Grupo Asís Biomedica, S.L.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., & Seegers, H. (2006). Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: Implications for detection and control. *Veterinary Research*, 37(6), 827–833. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006038>
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., & Seegers, H. (2007). Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. *Zoonoses and Public Health*, 54(5), 191–194. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01043.x>
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., & Beaudeau, F. (2008). Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine*, 26(34), 4320–4328. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.06.023>

- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A. F., Joly, A., & Beaudeau, F. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Veterinary Microbiology. Elsevier B.V.*, 149(1-2),1-16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.10.007>
- Hansen, M. S., Rodolakis, A., Cochonneau, D., Agger, J. F., Christoffersen, A. B., Jensen, T. K., & Agerholm, J. S. (2011). *Coxiella burnetii* associated placental lesions and infection level in parturient cows. *Veterinary Journal*, 190(2). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.12.021>
- Hartig F. (2022). *DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (MultiLevel/Mixed) Regression Models*. R package version 0.4.6, <https://CRAN.R-project.org/package=DHARMA>
- Hemsley, C. M., Essex-Lopresti, A., Chisnall, T., Millar, M., Neale, S., Reichel, R., Norville, I. H., & Titball, R. W. (2023). MLVA and com1 genotyping of *Coxiella burnetii* in farmed ruminants in Great Britain. *Veterinary Microbiology*, 277, 109629 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109629>
- Hornstra, H. M., Priestley, R. A., Georgia, S. M., Kachur, S., Birdsell, D. N., Hilsabeck, R., Gates, L. T., Samuel, J. E., Heinzen, R. A., Kersh, G. J., Keim, P., Massung, R. F., & Pearson, T. (2011). Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS ONE*, 6(11), 002601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026201>
- Hurtado, A., Zendoia, I. I., Alonso, E., Beraza, X., Bidaurrezaga, J., Ocabo, B., Arrazola, I., Cevitanes, A., Barandika, J. F., & García-Pérez, A. L. (2023). A Q fever outbreak among visitors to a natural cave, Bizkaia, Spain, December 2020 to October 2021. *Eurosurveillance*, 28(28), 2200824 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.28.2200824>
- Jado, I., Carranza-Rodríguez, C., Félix Barandika, J., Toledo, Á., García-Amil, C., Serrano, B., Bolaños, M., Gil, H., Escudero, R., García-Pérez, A. L., Olmeda, A. S., Astobiza, I., Lobo, B., Rodríguez-Vargas, M., Luis Pérez-Arellano, J., López-Gatius, F., Pascual-Velasco, F., Cilla, G., Rodríguez, N. F., & Anda, P. (2012). Molecular method for the characterization of *Coxiella burnetii* from clinical and environmental samples: variability of genotypes in Spain. *BMC Microbiology*, 12 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/91>
- Jones, R. M., Twomey, D. F., Hannon, S., Errington, J., Pritchard, G. C., & Sawyer, J. (2010). Detection of *Coxiella burnetii* in placenta and abortion samples from British ruminants using real-time PCR. *Veterinary Record*, 167(25), 965–967. <https://doi.org/10.1136/vr.c4040>
- Kim, S. G., Kim, E. H., Lafferty, C. J., & Dubovi, E. (2005). *Coxiella burnetii* in Bulk Tank Milk Samples, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 619-621. [www.cdc.gov/eid](http://www.cdc.gov/eid)

- López-Gatius, F., Almeria, S., & Garcia-Ispierto, I. (2012). Serological screening for *Coxiella burnetii* infection and related reproductive performance in high producing dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.07.017>
- Lurier, T., Rousset, E., Gasqui, P., Sala, C., Claustre, C., Abrial, D., Dufour, P., de Crémoux, R., Gache, K., Delignette-Muller, M. L., Ayrat, F., & Jourdain, E. (2021). Evaluation using latent class models of the diagnostic performances of three ELISA tests commercialized for the serological diagnosis of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants. *Veterinary Research*, 52(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00926-w>
- Marrie, T., & Raoult, D. (1997). Q fever-a review and issues for the next century. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 8(3), 145–161. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(96\)00369-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(96)00369-x)
- Mccaul, T. F., Banerjee-Bhatnagar, N., & Williams', J. C. (1991). Antigenic Differences between *Coxiella burnetii* Cells Revealed by Postembedding Immunoelectron Microscopy and Immunoblotting. *Infection and immunity, American Society for Microbiology* 59(9),3243-3253. <https://journals.asm.org/journal/iai>
- Montes, M., Cilla, G., Vicente, D., Nieto, V., Ercibengoa, M., & Perez-Trallero, E. (2006). Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): A hyperendemic area of Q fever. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1078, 129–132. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.020>
- Muskens, J., van Maanen, C., & Mars, M. H. (2011). Dairy cows with metritis: *Coxiella burnetii* test results in uterine, blood and bulk milk samples. *Veterinary Microbiology*, 147(1–2), 186–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.041>
- Neare, K., Tummeleht, L., Lassen, B., & Viltrop, A. (2023). *Coxiella burnetii* Seroprevalence and Associated Risk Factors in Cattle, Sheep, and Goats in Estonia. *Microorganisms*, 11(4),819. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040819>
- Nogareda, C., Jubert, A., Kantzoura, V., Kouam, M. K., Feidas, H., & Theodoropoulos, G. (2013). Geographical distribution modelling for *Neospora caninum* and *Coxiella burnetii* infections in dairy cattle farms in northeastern Spain. *Epidemiology and Infection*, 141(1), 81–90. <https://doi.org/10.1017/S0950268812000271>
- Nokhodian, Z., Feizi, A., Moradi, A., Yaran, M., Hoseini, S. G., Ataei, B., & Hosseini, M. (2016). Detection and risk factors of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle based on bulk tank milk samples in center of Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, 134, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.10.003>

- OMSA, Organización Mundial de Sanidad Animal (2022). Fiebre Q. <https://www.woah.org/es/enfermedad/fiebre-q/>
- Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A. B., & Agerholm, J. S. (2012). Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 107(1–2), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.05.015>
- Piñero, A., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Barandika, J. F., Atxaerandio, R., & García-Pérez, A. L. (2014). Changes in the dynamics of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle: An approach to match field data with the epidemiological cycle of *C. burnetii* in endemic herds. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2718–2730. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7229>
- Pires, H., Cardoso, L., Lopes, A. P., Fontes, M. da C., Matos, M., Pintado, C., Figueira, L., Mesquita, J. R., Matos, A. C., & Coelho, A. C. (2023). Seropositivity for *Coxiella burnetii* in Wild Boar (*Sus scrofa*) and Red Deer (*Cervus elaphus*) in Portugal. *Pathogens*, 12(3),2-10. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030421>
- Plommet, M., Capponi, M., Gestin, J., Renoux, G., Marly, J., Sahuc, D., & Fièvre Expérimentale, al Q. (1973). Fièvre q expérimentale des bovins. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 4(2),325-346 <https://hal.science/hal-00900769>
- Porter, S. R., Czaplicki, G., Mainil, J., Guattéo, R., & Saegerman, C. (2011). Q fever: Current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *International Journal of Microbiology*, 1-22 <https://doi.org/10.1155/2011/248418>
- Quintela, L., Taboada, M., Alonso, G., Varela-Portas, B., Díaz, C., Barrio, M., Becerra, J., Peña, A., Deiros Herradón, J. P., & Breve, N. (2004). Risk factors for metritis in dairy cows: a retrospective study in the northwest of Spain. *Archivos de zootecnia*. 53(204), 383-386. [https://www.researchgate.net/publication/237532053\\_n](https://www.researchgate.net/publication/237532053_n)
- R Core Team (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R- Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/RCoreTeam>
- Rabaza, A., Fraga, M., Corbellini, L. G., Turner, K. M. E., Riet-Correa, F., & Eisler, M. C. (2021). Molecular prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk-tank milk from bovine dairy herds: Systematic review and meta-analysis. *One Health*. Elsevier B.V., 12 <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100208>
- Rodolakis, A., Berri, M., Héchar, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C. C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natorp, J. C., Vadet, J. P., & Arricau-Bouvery, N. (2007). Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5352–5360. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-815>

- Roest, H. I. J., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., & Rebel, J. M. L. (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.  
<https://doi.org/10.1080/01652176.2013.843809>
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J. F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R. A., & García-Pérez, A. L. (2010). Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. *Veterinary Microbiology*, 126, 282-286.  
<http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/3>
- Ruiz-Fons, F., Rodríguez, Ó., Torina, A., Naranjo, V., Gortázar, C., & de la Fuente, J. (2008). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Veterinary Microbiology*, 126(1–3), 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.020>
- Sahu, R., Rawool, D. B., Dhaka, P., Yadav, J. P., Mishra, S. P., Kumar, M., Vergis, J., Malik, S. S., & Barbuddhe, S. B. (2021). Current perspectives on the occurrence of Q fever: highlighting the need for systematic surveillance for a neglected zoonotic disease in Indian subcontinent. *Environmental Microbiology Reports*, 13(2), 138-158  
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12918>
- Samuel, J. E., Kiss, K., & Varghees, S. (2003). Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990, 653–663.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07440.x>
- Serrano-Pérez, B., Almería, S., Tutusaus, J., Jado, I., Anda, P., Monleón, E., Badiola, J., Garcia-Ispuerto, I., & López-Gatius, F. (2015). *Coxiella burnetii* total immunoglobulin G, phase I and phase II immunoglobulin G antibodies, and bacterial shedding in young dams in persistently infected dairy herds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(2), 167–176.  
<https://doi.org/10.1177/1040638715571993>
- Sireci, G., Badami, G. D., Di Liberto, D., Blanda, V., Grippi, F., Di Paola, L., Guercio, A., de la Fuente, J., & Torina, A. (2021). Recent Advances on the Innate Immune Response to *Coxiella burnetii*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 1, 1-18.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.754455>
- Sobotta, K., Bonkowski, K., Liebler-Tenorio, E., Germon, P., Rainard, P., Hambruch, N., Pfarrer, C., Jacobsen, I. D., & Menge, C. (2017). Permissiveness of bovine epithelial cells from lung, intestine, placenta and udder for infection with *Coxiella burnetii*. *Veterinary Research*, 48(23),1-15. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0430-9>

- Taurel, A. F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., & Beaudeau, F. (2011). Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine*, *101*(1–2), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.05.005>
- Tomaiuolo, S., Boarbi, S., Fancello, T., Michel, P., Desqueper, D., Grégoire, F., Callens, J., Fretin, D., Devriendt, B., Cox, E., & Mori, M. (2021). Phylogeography of Human and Animal *Coxiella burnetii* Strains: Genetic Fingerprinting of Q Fever in Belgium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.625576>
- Trachsel, C., Hirsbrunner, G., Herms, T. L., Runge, M., Kiene, F., Ganter, M., Zanolari, P., & Bauer, B. U. (2023). Two Years after *Coxiella burnetii* Detection: Pathogen Shedding and Phase-Specific Antibody Response in Three Dairy Goat Herds. *Animals*, *13*(19), 3048. <https://doi.org/10.3390/ani13193048>
- Valla, G., B. D. , F. G. , & B. M. (2014). Prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk milk in herds of dairy cows and possible correlation with Italian reproductive problems. *Large Animal Review*, *20*(2), 51–56. <http://cms.sivarnet.it/gDocument.aspx?id=901>
- van Engelen, E., Schotten, N., Schimmer, B., Hautvast, J. L. A., van Schaik, G., & van Duijnhoven, Y. T. H. P. (2014). Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Preventive Veterinary Medicine*, *117*(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.08.016>
- Van Schaik, E. J., & Samuel, J. E. (2012). Phylogenetic diversity, virulence and comparative genomics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *984*, 13–38. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4315-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4315-1_2)
- Voss, L., Huaman, J., Pacioni, C., Tolpinrud, A., Helbig, K., Carvalho, T. G., & Firestone, S. M. (2023). Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in wild deer populations in eastern Australia. *Australian Veterinary Journal*, *101*(3), 106–114. <https://doi.org/10.1111/avj.13223>
- Woldehiwet, Z. (2004). Q fever (coxiellosis): Epidemiology and pathogenesis. *Veterinary Science, Elsevier*, *77*(2), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.09.001>
- Yáñez, U., Álvarez, J., Pisón, C., Acción, A., Becerra, J. J., Jiménez, A., Gisbert, P., Herradón, P. G., Peña, A. I., Prieto, A., Díaz-Cao, J. M., & Quintela, L. A. (2024). Prevalence, Risk Factors, and Relationship between Reproductive Performance and the Presence of Antibodies against Coxiellosis in Dairy Farm Milk Tanks in the Northwest of Spain. *Animals*, *14*(3), 367. <https://doi.org/10.3390/ani14030367>