

FIEBRE Q

RESUMEN

Definición de enfermedad: La fiebre Q (o Coxiellosis) es una zoonosis presente en la mayoría de los países. En general, el ser humano contrae la infección transmitida por el aire a partir de reservorios animales, sobre todo de rumiantes domésticos, aunque también pueden estar involucrados otros animales domésticos o salvajes (mascotas, conejos, aves, etc.). El agente causal es la bacteria intracelular estricta, *Coxiella burnetii*, que presenta distintas morfologías a lo largo de su ciclo de desarrollo. Algunas formas pueden sobrevivir extracelularmente e incluso acumularse en el medio. Todas las manipulaciones de material que pueda estar infectado o contaminado deben llevarse a cabo en instalaciones que cuenten con un nivel adecuado de bioseguridad y contención, que se establecerá en base a un análisis del riesgo biológico.

Descripción de la enfermedad: En los humanos, esta enfermedad presenta un gran polimorfismo. La fiebre Q puede cursar de forma aguda o crónica grave tras una infección inicial que puede pasar desapercibida. La forma aguda se resuelve rápidamente después de una terapia antibiótica adecuada, pero la manifestación crónica requiere una terapia antibiótica prolongada (durante 2 años o más), junto a un seguimiento serológico. En Australia, se dispone de una vacuna para grupos de población expuestos laboralmente.

En los rumiantes domésticos, la fiebre Q se asocia principalmente a abortos esporádicos o brotes de abortos y nacidos muertos o débiles, seguidos de una recuperación sin complicaciones. Además, existen indicios de que la fiebre Q interviene en la infertilidad o en problemas como la metritis en el ganado bovino. La infección por *C. burnetii* persiste durante varios años, y es probable que dure toda la vida. Las ovejas, las cabras y las vacas son principalmente portadores subclínicos, pero pueden diseminar la bacteria en distintas secreciones y en los excrementos.

Identificación del agente: Para el diagnóstico de laboratorio en el contexto de abortos seriados y/o nacidos muertos, pueden tomarse muestras de la placenta, secreciones vaginales y tejidos de fetos abortados (bazo, hígado, pulmón o contenido gástrico). Para estudiar la diseminación bacteriana, pueden tomarse muestras de la vagina, la leche y el calostro.

Como bacteria intracelular estricta, *Coxiella burnetii* se puede aislar por inoculación de muestras en cultivos celulares convencionales, en el saco vitelino de huevos embrionados o en animales de laboratorio. La inoculación de animales de laboratorio (cobaya, ratón, hámster) es útil en los casos que requieren un aislamiento a partir de muestras de tejidos, heces, leche o el ambiente contaminadas con distintos microorganismos.

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

Se considera que la demostración del agente por tinción inmunohistoquímica, mediante una hibridación in-situ o por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es más específica y sensible que los métodos clásicos de tinción. No existen anticuerpos específicos para inmunología a nivel comercial, pero se han propuesto preparaciones de PCR para rumiantes y se pueden utilizar fácilmente en laboratorios debidamente equipados. La PCR se considera una prueba útil y fiable como método de detección sistemático en gran cantidad de muestras de distintos tipos.

Actualmente, la PCR se ha convertido en la herramienta de elección para el diagnóstico de la fiebre Q.

Cada vez se utilizan más dos métodos de tipificación basados en la PCR, el MLVA (análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable) y la tipificación de la secuencia multiespacio (MST), que permite la tipificación de *C. burnetii* sin necesidad de aislar el microorganismo. Además, recientemente se ha descrito la genotipificación por SNP (polimorfismo de nucleótido único).

Pruebas serológicas: Se pueden usar varias pruebas, en particular la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), el enzoinmunoanálisis (ELISA), y la prueba de fijación de complemento (FC). La presencia de anticuerpos IgG específicos demuestra la exposición reciente o pasada a *C. burnetii*. Los ensayos ELISA son los de elección por motivos prácticos y por su mayor sensibilidad.

Los antígenos serológicos se basan en las dos principales formas antigénicas de *C. burnetii*: fase I), se obtienen de bazos tras la inoculación de animales de laboratorio, y fase II) se obtienen tras repetidos pases por huevos embrionados o cultivos celulares. Las pruebas comerciales de las que se dispone actualmente permiten la detección de anticuerpos anti-*C. burnetii* de fase II o bien de ambas fases.

Requisitos para las vacunas: Se han desarrollado varias vacunas inactivadas contra la fiebre Q, pero solo deben considerarse como protectoras las que contengan *C. burnetii* en fase I o estén preparadas a partir de ella. Se dispone comercialmente de una vacuna inactivada de fase I. En las zonas de alto riesgo se recomienda la repetición anual de la vacunación, sobre todo de animales jóvenes.

A. INTRODUCCIÓN

1. Definición de la enfermedad y vías de transmisión

La fiebre Q (o Coxielosis) tiene una amplia distribución por todo el mundo, excepto en Nueva Zelanda, y aunque está prácticamente presente en todo el reino animal, incluyendo los artrópodos, la enfermedad afecta sobre todo al hombre, al ganado bovino, al ovino y al caprino (Lang, 1990). Los rumiantes domésticos se consideran el principal reservorio de *C. burnetii*, pero se ha observado que gatos, perros, conejos, aves, etc. pueden intervenir también en la enfermedad/infección humana. Existen claros indicios epidemiológicos y experimentales de que esta infección se transmite principalmente por inhalación de partículas de aerosol desecadas y mediante la exposición cercana a animales infectados, a sus tejidos reproductivos o a otros productos de origen animal, como la lana (ECDC, 2010). También se ha sugerido que la ingesta podría ser una vía de infección, sobre todo en casos de consumo de productos lácteos derivados de leche cruda contaminada, pero no hay pruebas fehacientes que demuestren una transmisión significativa al ser humano a través de los alimentos. También parece ser muy infrecuente la transmisión entre personas, aunque es posible la exposición durante el parto, la transmisión sexual o la exposición mediante transfusiones de sangre. En los animales, puede producirse una transmisión vertical y por vía sexual, pero no se sabe qué trascendencia tiene. Por último, es posible que ciertos artrópodos, principalmente garrapatas, intervengan en la transmisión de la fiebre Q. El riesgo de transmisión parece estar vinculado a animales salvajes. Podría asociarse a ácaros así como a polvo contaminado procedente de excrementos desecados.

2. Descripción del agente etiológico

El agente etiológico, *Coxiella burnetii*, es una bacteria gramnegativa intracelular estricta, adaptada para desarrollarse en el interior del fagolisosoma del fagocito. Históricamente se ha clasificado dentro de la familia *Rickettsiaceae*; sin embargo, los estudios filogenéticos basados principalmente en el análisis de la secuencia de de ARN de la subunidad ribosómica 16S indican que el género *Coxiella* está lejos del género *Rickettsia* en la subdivisión *alfa* de las *Proteobacterias* (Drancourt & Raoult, 2005). *Coxiella burnetii* se clasifica ahora en la familia *Coxiellaceae*, en el orden *Legionellales* de la subdivisión *gamma* de las *Proteobacterias*. Recientemente se ha logrado la secuenciación completa del genoma de *C. burnetii*, que confirma su posición sistemática (Seshadri *et al.*, 2003). En general, los genomas de cepas de *C. burnetii* de gran variedad de procedencias biológicas y geográficas se conservan mucho, pero existe un considerable polimorfismo, como la reorganización de bloques sinténicos (Beare *et al.*, 2009). Esta plasticidad genómica podría contribuir a la aparición de distintos fenotipos y resulta muy interesante para los métodos de genotipificación (Massung *et al.*, 2012; Sidi-Boumedine & Rousset, 2011). A diferencia de las rickettsias, *C. burnetii* produce una forma pequeña, densa y muy resistente tipo spora (Heinzen *et al.*, 1999; Minnick & Raghavan, 2012). Esta capacidad se ha atribuido a la existencia de variantes en el ciclo de desarrollo de *C. burnetii*, descritas en estudios *in-vitro*: células grandes (LCV), células

pequeñas (SCV) y células densas pequeñas (SDC) que miden 0,2 µm de ancho y entre 0,5 y 2 µm de largo o entre 0,4 y 0,7 µm de diámetro (Heinzen *et al.*, 1999; Minnick & Raghavan, 2012). Las SDC y las SCV representan las variantes morfológicas pequeñas de la bacteria que probablemente sobrevivirán extracelularmente como partículas infecciosas, un rasgo que es importante para la persistencia en el medio y para la transmisión (ECDC 2010; Kersh *et al.* 2010).

Otra característica esencial es que *C. burnetii* tiene dos formas antigénicas: la fase I patógena, cuando se aísla de animales o humanos infectados, y la fase II atenuada, que se obtiene mediante repetidos pases *in ovo* o *in vitro*. Durante los pases seriados, se produce un cambio en el LPS (lipopolisacárido): las células en fase I, que contienen cadenas O de una longitud completa en el LPS, cambian a fases intermedias disminuyendo la longitud de las cadenas O del LPS, y luego a la fase II, con un LPS incompleto. Así, el LPS largo de fase I contiene la parte de la fase II. El segundo se ha descrito como un importante determinante inmunógeno. Las pruebas comerciales de las que se dispone actualmente permiten la detección de al menos los anticuerpos anti-*C. burnetii* de fase II, que parecen estar presentes sea cual sea la fase o forma de la infección. Por el contrario, la vacunación es eficaz con una vacuna de fase I pero no con una vacuna de fase II (O'Neil *et al.*, 2013).

3. Descripción de la enfermedad en seres humanos

La fiebre Q es una zoonosis. En los humanos, la infección puede cursar de forma aguda, crónica o subclínica (Anderson *et al.*, 2013; ECDC, 2010). El diagnóstico y el tratamiento suelen retrasarse debido a las distintas e inespecíficas manifestaciones clínicas. En general, las formas agudas van de un síndrome gripal autolimitante a una neumonía o hepatitis granulomatosa que puede requerir hospitalización. El principal signo clínico de la fiebre Q crónica es una endocarditis valvular, infecciones vasculares o aneurismáticas, hepatitis, neumonía o síndrome de fatiga crónica. La forma aguda se resuelve rápidamente mediante una terapia antibiótica adecuada, pero la manifestación crónica requiere una terapia antibiótica prolongada (durante 2 años o más), junto a un seguimiento serológico. Las complicaciones de la forma aguda pueden ser graves o fatales si no se aplica un tratamiento adecuado con antibióticos. Además, la infección de mujeres embarazadas por *C. burnetii* puede provocar inflamación de la placenta y comporta nacimientos prematuros, limitaciones del crecimiento, aborto espontáneo o muerte fetal. En general, la enfermedad crónica es más probable que dé lugar en individuos con factores de riesgo alto (como los inmunocomprometidos o con valvulopatía). La infección es endémica en muchas áreas, originando casos esporádicos o epidemias explosivas. Su incidencia es posiblemente mayor que la descrita. La fiebre Q afecta a personas de cualquier edad, pero principalmente a las de edades comprendidas entre los 30 y los 60 años. Durante los brotes humanos de fiebre Q, que en general son temporales y casi nunca consisten en más de 300 casos agudos, se tiene mayor conciencia de la enfermedad. Sin embargo, en los Países Bajos tuvieron lugar en 2007 los mayores brotes jamás notificados. Durante los siguientes años, el pico de incidencia entre febrero y septiembre ha aumentado y la zona geográfica se ha ampliado progresivamente. El país notificó más de 4000 casos humanos con una tasa de hospitalización del 20%, y se espera que en los próximos años aparezcan más casos de fiebre Q en los grupos de riesgo (ECDC, 2010). Las pérdidas causadas por esta epidemia se estima que son de alrededor de 307 millones de euros (van Asseldonk *et al.*, 2013).

4. Descripción de la enfermedad en los animales

En las vacas, las ovejas y las cabras, la fiebre Q se ha asociado fundamentalmente a trastornos reproductivos, como partos prematuros, nacidos muertos o débiles (Lang, 1990). Además, en ganado bovino *C. burnetii* podría asociarse a metritis e infertilidad. Dada la falta de especificidad de estos últimos signos, no se recomienda basarse en ellos para el diagnóstico clínico de la fiebre Q. Los ruminantes domésticos son principalmente portadores subclínicos, pero pueden diseminar la bacteria en distintas secreciones y en los excrementos. En el ambiente, *C. burnetii* puede sobrevivir durante periodos variables y diseminarse. Se han determinado los niveles de contaminación bacteriana en el medio mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa para detectar ADN de *C. burnetii*, pero se requiere una prueba rápida que evalúe la viabilidad para evaluar el riesgo infeccioso en el medio ambiente (Kersh *et al.*, 2010). Por el momento, la falta de conocimientos sobre los patrones de diseminación entre los ruminantes ha dificultado el determinar el estado de infección por fiebre Q. Podría ser infrecuente la excreción a la leche, las heces y el moco vaginal (Guatteo *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2009). En las cabras, la excreción por vía vaginal el día del parto podría ser la más frecuente (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005). En rebaños que presentan problemas de abortos causados por *C. burnetii*, la mayoría de animales podría estar expulsando cantidades masivas de bacterias hayan abortado o no. Así pues, las cantidades totales son claramente más altas que en los rebaños infectados de forma subclínica. En los partos posteriores a una ola de abortos, se hallaron secreciones bacterianas más altas en hembras primíparas que en otras hembras (de Cremoux *et al.*, 2012; Guatteo *et al.*, 2008). Además, la excreción podría persistir durante varios meses, describiendo un patrón de cinética intermitente o continua. Los animales con patrones de excreción continua podrían expulsar grandes cantidades. Estos últimos animales parecen presentar principalmente un perfil serológico altamente seropositivo (Guatteo *et al.*, 2007). Es importante destacar que la diseminación y respuesta serológica van asociadas a nivel de grupo, pero no a nivel de individuo.

5. Diagnóstico diferencial en los rumiantes

El diagnóstico de fiebre Q en rumiantes, que incluye la diferenciación de otras causas de aborto, tradicionalmente se ha llevado a cabo en función de la imagen microscópica de muestras clínicas, junto con un resultado serológico positivo (Lang, 1990). En el momento actual, no se dispone de ninguna técnica de referencia, pero la detección directa y la cuantificación mediante PCR y ELISA serológico (enzimoimmunoanálisis) deben considerarse los métodos de elección para el diagnóstico clínico (Niemczuk *et al.*, 2014; Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Recientemente se han elaborado propuestas para el desarrollo de esquemas de seguimiento y notificación normalizados para la fiebre Q, con el fin de posibilitar comparaciones a lo largo del tiempo y entre países (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Las pruebas de diagnóstico de la fiebre Q también resultan necesarias para los análisis epidemiológicos de poblaciones 'de riesgo' o sospechosas en áreas limitadas (después de brotes recientes en el hombre o en animales), o para intercambios entre rebaños o manadas. Se anima a seguir trabajando para la validación de los métodos para cada fin (véase la Tabla 1) y para el desarrollo de materiales de referencia con fines de control de calidad, competencia y armonización (véase el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*).

6. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

En Europa han surgido preocupaciones relativas a los riesgos que supone la fiebre Q, donde la Comisión Europea ha pedido consejo científico y evaluación del riesgo para humanos y animales (ECDC, 2010). Las principales conclusiones han sido que las acciones necesarias para detener un brote deben ser llevadas a cabo por parte de las autoridades sanitarias, junto con las autoridades veterinarias a nivel nacional y local. El impacto global de la infección por *C. burnetii* en la salud pública es escaso, pero se necesita un mejor sistema de vigilancia. En situaciones de epidemia humana, una vigilancia activa de la fiebre Q aguda es la mejor estrategia para evitar casos crónicos. Deben implementarse medidas para el control de la fiebre Q animal, sobre todo en los animales domésticos. Solo es esperable obtener eficacia a partir de una combinación de medidas. Las opciones son la vacunación preventiva, la gestión del estiércol, los cambios en las características de la explotación, la gestión del esquilado de lana, disponer de una zona de partos independiente, la eliminación del material de riesgo, la prohibición de visitas, el control de otros reservorios animales y el control de garrapatas. Asimismo, el desvieje de los animales gestantes, una prohibición temporal de la reproducción, la identificación y desvieje de los rebaños o manadas que eliminan la bacteria y el control de los movimientos de animales podrían desempeñar un papel en caso de brotes humanos.

Debido a su capacidad de causar una enfermedad incapacitadora en grandes grupos de personas, a su resistencia en el medio ambiente como pseudo-espora y a su diseminación natural en forma de aerosol, actualmente se considera que *C. burnetii* es una posible arma de bioterrorismo y está clasificada por el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades como un agente biológico del grupo B (Drancourt & Raoult, 2005; Kersh *et al.*, 2010).

En cuanto a la bioseguridad y la bioprotección, *C. burnetii* es extremadamente peligrosa para el ser humano. Por lo tanto, la fiebre Q es una zoonosis ocupacional reconocida. Todas las manipulaciones de laboratorio con cultivos vivos o material que pueda estar infectado/contaminado deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se establecerá en base a un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Deben aplicarse precauciones con *C. burnetii* tanto de fase I como de fase II. Aunque las bacterias de fase II se consideren avirulentas, durante su preparación puede haber también algunas de fase I. Se aconseja en concreto vestir indumentaria protectora de cobertura total y protección respiratoria equipada con una pieza facial de filtro de clase 3 (FFP3), así como manipular el material infeccioso o que pueda serlo con doble guante y en una cabina de seguridad biológica (CSB). La centrifugación del material infectado debe realizarse en recipientes cerrados y situados en cabinas de seguridad selladas, o bien en rotores que se descarguen en una CSB. En cuanto al uso de agujas, jeringas y demás instrumental afilado, debe estar estrictamente limitado. Tras cualquier manipulación en que se sepa que hay una exposición conocida o posible a aerosoles de *C. burnetii* viable, el personal deberá ducharse a la salida del laboratorio. Se recomienda utilizar desinfectantes esporicidas. Para realizar un seguimiento de la evolución del estado inmunitario del personal de laboratorio, sería de ayuda un estudio serológico. En algunos países, se lleva a cabo una vacunación del personal con exposición ocupacional, como los trabajadores de los mataderos, los veterinarios o el personal de laboratorio. Las vacunas de fase I son efectivas, pero la vacunación está contraindicada en personas que hayan seroconvertido o que hayan estado expuestas a *C. burnetii* antes de la vacunación.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la fiebre Q y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
PCR	+++	–	+++	+++	++	+ ¹
Cultivo	+	–	+	–	+	–
Tinción	+	–	+	+	+	–
Geno-tipificación	–	–	–	–	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+++	–	+++	+++	+++	+++
IFA	++	–	++	++	++	++
CF	–	–	–	++–	+	+

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; ELISA = enzimoimmunoanálisis;
 IFA = inmunofluorescencia indirecta; CF = fijación del complemento

Sin duda, una identificación positiva confirmada de *C. burnetii* de un animal aislado respaldaría un diagnóstico. No obstante, por normal general, los métodos de diagnóstico de la fiebre Q solo permiten una interpretación a nivel de la población, y no a nivel individual. Además, los resultados de las pruebas de laboratorio deben interpretarse en el contexto de los antecedentes del rebaño o manada (abortos, vacunaciones, desplazamientos e introducciones, etc.).

Se puede comprobar la presencia de *Coxiella burnetii* de varios modos, dependiendo del tipo de muestra y del propósito del estudio (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). La capacidad de detectar y cuantificar ADN de *C. burnetii* mediante PCR en tiempo real ha mejorado drásticamente el diagnóstico y los enfoques de estudio. Pueden tomarse muestras vaginales, de leche o de calostro o bien leche de tanque para determinar si los animales están excretando la bacteria. No obstante, la detección de animales que excretan el microorganismo es difícil porque la dinámica de la excreción no se conoce del todo (de Cremoux *et al.*, 2012; Guatteo *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2009). De hecho, la PCR no sirve para determinar si un animal está o no infectado, debido a la variabilidad de la excreción entre individuos (distintas vías y tal vez excreciones intermitentes). Pueden emplearse análisis serológicos, como el ELISA, la inmunofluorescencia indirecta (IFA) o la fijación del complemento. En varios trabajos publicados se ha comprobado que la CF es menos sensible que las otras pruebas, pero, por el contrario, tiene una especificidad alta para los altos niveles de anticuerpos anti-*C. burnetii* que genera un rebaño o manada con abortos por fiebre Q (Emery *et al.*, 2014; Horigan *et al.*, 2011; Kittelberger *et al.*, 2009; Niemczuk *et al.*, 2014; Rousset *et al.*, 2007; 2009). La IFA tiene el inconveniente de que es menos reproducible entre operarios y, por lo tanto, entre laboratorios. Aunque el ELISA no está del todo validado y armonizado, es robusto y puede automatizarse, y se recomienda para las pruebas serológicas ordinarias de animales destinadas a detectar la fiebre Q.

1 La confirmación del estado inmunitario debe acompañarse de pruebas que establezcan la ausencia de excreción del microorganismo por vía vaginal.

Un estudio serológico es una buena forma de determinar la prevalencia de la enfermedad. La presencia de anticuerpos anti-*C. burnetii* proporciona una prueba de infección reciente, así como de una exposición en el pasado. Las pruebas serológicas son adecuadas para el cribado de rebaños y manadas, pero no puede realizarse una interpretación a nivel de animal. De hecho, una proporción considerable de los animales que excretan *C. burnetii*, e incluso algunos animales abortados por fiebre Q, se observa que son seronegativos (de Cremoux *et al.*, 2012; Guatteo *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2007, 2009). Deben tomarse muestras de un número representativo de animales (en concreto, de distintas categorías de edades). Si en la zona no se han realizado estudios de prevalencia, la estrategia de muestreo deberá tener en cuenta la posibilidad de que dicha prevalencia sea baja. Como alternativa, para estimar la prevalencia pueden realizarse pruebas con leche de tanque o muestras combinadas (es decir, muestras de hisopos vaginales o de leche), pero deberán evaluarse en relación con la prevalencia de excreción intra-rebaño o intra-manada. Por ejemplo, desde 2009, en los Países Bajos se han realizado PCR de leche de tanque cada 2 meses para llevar a cabo un seguimiento de rebaños o manadas con signos clínicos comprobados.

El estado del rebaño o manada puede evaluarse serológicamente mediante ELISA en todos los animales (o en un número significativo). No obstante, empleando distintos kits de ELISA pueden obtenerse resultados incongruentes (Horigan *et al.*, 2011). Una opción es utilizar al menos tres kits para determinar el estado de un suero. Lamentablemente, con los métodos serológicos existentes no se puede distinguir entre rumiantes infectados y vacunados. Es necesario un análisis mediante PCR de leche de tanque o de muestras individuales (hisopos vaginales, preferiblemente del momento del parto), y tal vez tenga que repetirse si el objetivo es determinar que el rebaño está libre de la infección. Solo se puede determinar que un animal determinado está libre de la infección si el rebaño o manada lo está y no tiene antecedentes serológicos ni clínicos de fiebre Q. Es difícil asegurar que el estado del animal no haya cambiado con el tiempo debido a una transmisión por el aire.

La PCR es la herramienta más confiable para el diagnóstico de abortos infecciosos (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). Para el diagnóstico de laboratorio en el contexto de abortos en serie y mortinatos, las muestras deben tomarse de fetos abortados, placenta y descargas vaginales poco después del aborto o el parto. En caso de estallido de abortos en un rebaño o manada, la detección temprana y la implementación de las medidas adecuadas son fundamentales para la manipulación de la transmisión tanto a nivel de la explotación como del medio ambiente. La confirmación de casos clínicos siempre debe incluir un diagnóstico diferencial de los principales agentes abortivos y tener por objetivo al menos dos animales abortados. Los resultados solo pueden interpretarse a nivel de grupo. Un caso positivo es un rebaño o manada con signos clínicos (aborto y/o nacidos muertos) en el que se ha confirmado la presencia del agente. Siempre que sea posible deben tomarse hisopos vaginales del día del aborto (o en un plazo de menos de 8 días tras el parto) con el fin de reducir el número de falsos negativos en la PCR. Efectivamente, la carga bacteriana vaginal puede disminuir progresivamente tras el aborto o el parto. En la placenta, deben analizarse al menos tres cotiledones para comprobar si presentan *Coxiella*, ya que la colonización puede ser heterogénea. La cuantificación bacteriana resulta útil en hisopos vaginales o placentarios, ya que los niveles altos se asocian con mayor frecuencia a casos clínicos. Los órganos fetales pueden constituir muestras útiles, pero los resultados negativos pueden ser cuestionables. Es probable que las bacterias se diseminen a distintos órganos (bazo, pulmón, hígado, contenido gástrico, etc.) en función del avance de la infección, de tal modo que la ausencia en un órgano no excluye la presencia en los demás.

Cuando aparezcan dificultades en la interpretación de los resultados del diagnóstico, es útil contar con un resultado serológico positivo a nivel del rebaño o de la manada. Para analizar casos clínicos puede emplearse ELISA, IFA o CF, pero es fundamental definir las características de la prueba (sensibilidad, especificidad, exactitud alrededor del punto de corte y reproducibilidad) en las condiciones locales. Los puntos de corte serológicos que se emplean para el diagnóstico de la fiebre Q son los que proporcionan los proveedores de los kits. La interpretación de los resultados requiere tomar muestras de al menos seis ovejas o cabras y de diez vacas (priorizando los animales que hayan abortado).

La determinación del estado inmunitario de las poblaciones post-vacunación deberá basarse en las pruebas más sensibles (ELISA o IFA); en la medida de lo posible, deberá evaluarse mediante una PCR de hisopos vaginales que se obtendrán en el momento del parto. Si hay una alta presión de infección, es posible que la vacunación solo sirva para reducir la magnitud de la infección y de la excreción y que no induzca una verdadera protección. La combinación de seroconversión con ausencia de excreción vaginal en el siguiente parto indica protección inmunitaria.

1. Identificación del agente etiológico

1.1. Aislamiento del agente

Para determinadas investigaciones de laboratorio, puede ser necesario aislar el agente. Cuando el examen microscópico revela un gran número de células de *C. burnetii* y un bajo nivel de contaminación con otras bacterias, es posible el aislamiento directo por inoculación de huevos de gallina embrionados o de cultivos celulares. Para lograr el aislamiento, se recomienda una concentración superior a las 10⁵ bacterias por ml.

i) Huevos de gallina embrionados

Se homogeneiza una porción de la placenta en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga antibióticos (100–200 µg/ml de estreptomycin y 50–100 µg/ml de penicilina o gentamicina). Después de centrifugar a baja velocidad, se inoculan diluciones del sobrenadante en huevos de gallina embrionados de 6 a 7 días a través del saco vitelino. Preferiblemente, los huevos deben ser de gallinas libres de patógenos específicos (SPF). Se desechan los embriones que mueren durante los primeros 5 días después de la inoculación. Los sacos vitelinos se recogen después de 10–15 días de incubación. Se examinan frotis del saco vitelino teñidos para comprobar la ausencia de contaminación bacteriana y para determinar la presencia de *C. burnetii* y realizar un seguimiento del proceso de aislamiento. Para detectar la presencia de *C. burnetii*, también se puede utilizar un análisis por PCR. Se pueden necesitar varios pases para obtener un aislamiento en cultivo puro.

ii) Cultivo celular

Se ha adaptado un sistema de microcultivo celular de un método comercial utilizado para el cultivo de virus, el vial cerrado de cultivo celular², para el aislamiento de bacterias intracelulares estrictas o facultativas, como *C. burnetii*. Tal método se describió en 1990 para *C. burnetii* (Raoult *et al.*, 1990). Se inoculan suspensiones de la muestra en fibroblastos de pulmón de embrión humano (células HEL) que se cultivan sobre un cubre de 1 cm² dentro de un vial cerrado. Pueden utilizarse varias líneas celulares para poder observar las vacuolas características de la multiplicación de *C. burnetii*. La centrifugación a 700 g durante 1 hora favorece la fijación y la penetración de la bacteria en las células. Para la misma muestra se utilizan tres viales cerrados, y los días 3, 10 y 21 se examina el efecto citopático (ECP) – es decir, las vacuolas características de *C. burnetii* en las células HEL – mediante un microscopio invertido. Sobre el cubre situado dentro del vial cerrado se puede realizar directamente a los 10 días la detección de *C. burnetii* creciendo en el interior de las células, por medio de una prueba de inmunofluorescencia directa con anticuerpos policlonales anti-*C. burnetii* y un anticuerpo secundario apropiado conjugado con isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Las células del último vial cerrado se recogen y se transfieren a un recipiente de cultivo de 25 cm². Se puede incubar durante 3 meses, cambiando el medio de cultivo una vez a la semana (no se utiliza tripsinización). La infección puede seguirse mediante la microscopía de las células centrifugadas de un sobrenadante del cultivo y teñidas por la tinción de Giménez y análisis por PCR del sobrenadante del cultivo. Cuando las observaciones del ECP y las de la tinción de Giménez, o los resultados de la PCR son positivos, se realiza un pase a un recipiente de cultivo de 75 cm². Luego se inocula el sobrenadante en capas confluentes de células Vero o de células L929 de fibroblastos de ratón en un recipiente de cultivo de 150 cm² para establecer un aislamiento de *C. burnetii*. Este método fue desarrollado para los casos humanos pero podría adaptarse a los de los animales.

iii) Animales de laboratorio

Con muestras muy contaminadas, como las derivadas de la placenta, secreciones vaginales, heces o leche, puede ser necesaria la inoculación en animales de laboratorio como sistema de filtración. Los roedores infectados de forma experimental deben alojarse en condiciones de bioseguridad y contención adecuadas, que se establecerán en base a un análisis del riesgo biológico (véase el capítulo 1.1.4). Los animales de laboratorio más apropiados a tal efecto son los ratones y los cobayas (Scott *et al.*, 1987). Se controla la temperatura corporal y el estado de anticuerpos después de la inoculación intraperitoneal de una dosis de 0,5 ml por animal. Este método debe realizarse siempre en paralelo con las pruebas serológicas en otros cobayas o ratones que se hayan inoculado con las mismas muestras. Se recogen sueros 21 días después de la inoculación. Un resultado positivo en un suero confirma un diagnóstico de infección por *C. burnetii*. Si aparece pirexia, el animal es sacrificado y se extrae el bazo para aislar el agente mediante inoculación en huevos embrionados de gallina o en cultivos celulares. El examen microscópico de *C. burnetii* se puede llevar a cabo utilizando frotis y tinciones de los bazos recogidos. Como alternativa, este proceso puede simplificarse llevando a cabo una PCR para la detección de ADN de *C. burnetii* (véase abajo) en muestras de bazo.

1.2. Tinción

En el caso de un aborto en el que se sospeche de causa infecciosa, se preparan frotis de cotiledones placentarios sobre portas de microscopio. Igualmente puede usarse el contenido del bazo, pulmón, hígado o rumen de los fetos abortados o las secreciones vaginales. Estas muestras se tiñen siguiendo varios métodos: Tinción de Stamp, Giménez, Macchiavello, Giemsa y Koster modificada (Gimenez,

² Sterilin, Bibby Sterilino celular Ltd, Stone, Staffordshire ST15 05A, Reino Unido

1964; Quinn *et al.*, 1994). Con las tres primeras técnicas se obtienen los mejores resultados. Estos métodos son similares al de Ziehl–Neelsen modificado, y se realizan con una solución de fucsina básica para teñir las bacterias. Por ejemplo, el método de tinción de Stamp se realiza con una solución de fucsina básica al 0,4%, seguida de una decoloración rápida con una solución de ácido acético al 0,5%, y haciendo una tinción de contraste con una solución de azul de metileno o de verde de malaquita al 1%. Los frotis se examinan microscópicamente con objetivo de inmersión ($\times 500$ o más aumentos). La tinción de Stamp es la preferida en los laboratorios veterinarios de diagnóstico, mientras que el método de Giménez se utiliza mucho para el seguimiento de los cultivos celulares infectados en los laboratorios de investigación. El método de Giménez es más rápido de realizar, puesto que no incluye una solución ácida para la diferenciación. *Coxiella burnetii* se caracteriza por la presencia de un número muy alto de delgadas bacterias teñidas de rosa en forma de cocobacilos, destacando sobre un fondo azul o verde. El método de la tinción es rápido. El límite de detección es alto ($>10^5$ bacterias/ml) y adecuado para el diagnóstico clínico ya que en las muestras positivas hay grandes cantidades de bacterias. A veces pueden ser difíciles de detectar por su pequeño tamaño, pero esto se compensa con sus grandes cantidades; a menudo aparecen dentro de la célula hospedadora inclusiones como manchas rojizas sobre un fondo azul o verde. Se debe tener cuidado con la interpretación de los resultados, ya que se puede confundir microscópicamente *C. burnetii* con *Chlamydia abortus* o con *Brucella* spp. Sin embargo, usando el mismo proceso de tinción, *Chlamydia* tiene perfiles más definidos, se trata de células ovaladas, pequeñas y pueden parecer glóbulos. Las células de *Brucella* spp. son más grandes (0,6–1,5 μm de largo \times 0,5–0,7 μm de ancho), más claramente definidas y se tiñen más intensamente. Se deben de usar portas con controles positivos de *C. burnetii*, *Chlamydia abortus* y *Brucella* para su comparación. El diagnóstico de casos clínicos realizado por microscopía, junto a los resultados serológicos positivos, suele ser adecuado a efectos de utilización sistemática. Cuando la tinción biológica no resulte concluyente, se debe utilizar algún otro método específico como prueba confirmativa. Los métodos basados en la PCR son los de elección.

1.3. Métodos específicos de detección

También puede lograrse la detección de *C. burnetii* en muestras mediante la inmunodetección específica (ELISA de captura, inmunohistoquímica), hibridación *in-situ* o amplificación del ADN (Jensen *et al.*, 2007; Thiele *et al.*, 1992). La inmunohistología se puede llevar a cabo con tejidos incluidos en parafina o en frotis fijados con acetona (Raoult *et al.*, 1994). El método es una prueba de inmunofluorescencia o inmunoperoxidasa en la que se utilizan anticuerpos policlonales específicos de *C. burnetii* producidos en animales de laboratorio (conejo o cobaya). Para visualizar la bacteria, a continuación se utiliza un conjugado anti-IgG obtenido en otra especie (conejo o cobaya), que esté marcado con ITCF o con peroxidasa. Se debe disponer de portas control positivos de antígeno de *C. burnetii* con fines de comparación. No existen anticuerpos específicos para inmunohistoquímica a nivel comercial.

Puede utilizarse hibridación *in-situ* fluorescente (FISH) mediante sondas de oligonucleótidos específicos dirigidas al ARNr de la subunidad 16S en tejidos incluidos en parafina, sobre todo en muestras de placenta (Jensen *et al.*, 2007).

Se han utilizado métodos basados en la PCR con éxito para detectar ADN de *C. burnetii* en cultivos celulares y en muestras biológicas. Antes de realizar la PCR, se pueden inactivar las muestras biológicas para garantizar la seguridad del personal de laboratorio calentándolas a 90°C entre 30 y 60 minutos, dependiendo de la naturaleza, el tamaño o el peso de la muestra. El proceso de inactivación debe comprobarse y validarse en condiciones locales, antes de cada uso. La PCR se puede realizar en los laboratorios debidamente equipados, usando cebadores derivados de varias dianas, como por ejemplo, una secuencia IS1111 de inserción de multicopias (número de acceso M80806), la más utilizada (Berri *et al.*, 2000). El uso de estos cebadores para la amplificación de la mencionada secuencia proporciona un aumento de la sensibilidad de la prueba debido a la presencia de varias copias en los genomas de *Coxiella*. Se ha publicado que los otros genes que pueden usarse como diana en la PCR específica de *C. burnetii* son: el gen de la superóxido dismutasa (sodB) (número de acceso M74242); el gen com1, que codifica una proteína de 27 kDa de la membrana externa (número de acceso AB004712); y el operón de choque térmico que codifica dos proteínas de choque térmico (htpA y htpB) (número de acceso M20482). La isocitrato deshidrogenasa (icd) (número de acceso AF069035); y la proteína potenciadora de la infectividad del macrófago (cbmip) (número de acceso U14170). Algunas de las secuencias de cebadores y sondas pueden obtenerse en la página web del centro nacional de referencia para la fiebre Q de Francia³.

La PCR en tiempo real constituye otro medio de detección y cuantificación (Klee *et al.*, 2006; Stemmler & Meyer, 2002). Como ocurre con la PCR convencional, se utilizan varios genes diana, como IS1111,

3 http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Fievre_Q.html#oc22

IS30, com1 e icd. A fin de cuantificar las bacterias en muestras biológicas mediante la utilización de la PCR en tiempo real, se recomienda amplificar una secuencia única y específica. De hecho, algunos datos recientes ponen de manifiesto que el número de secuencia de inserción (IS1111) varió mucho (entre 7 y 110) dependiendo de la cepa (Klee *et al.*, 2006). Aunque el uso de esta secuencia podría aumentar la sensibilidad de la prueba, puede que no sirva para obtener una cuantificación exacta cuando hay varias cepas involucradas. Sin embargo, es suficientemente informativa y exacta para obtener un diagnóstico en casos de aborto cuando hay grandes cantidades de bacterias (es decir, 10^4 por hisopo vaginal) (Sidi-Boumedine *et al.*, 2010). En cuanto a las matrices complejas, debe comprobarse si los eluatos de ADN son capaces de inhibir una PCR añadiendo un control de ADN interno (como una secuencia de GAPDH a modo de diana) o un control externo.

En el mercado existen kits listos para su uso, que permiten detectar las bacterias en varios tipos de muestras. Para el diagnóstico de abortos se han validado métodos cuantitativos específicos basados en kits de PCR, de acuerdo con una nueva norma francesa para la validación de la PCR en tiempo real (Rousset *et al.*, 2012). En el laboratorio de referencia nacional de Francia se dispone de material de referencia externo de bacterias cuantificadas, útil tanto para la validación del método como para un esquema de control destinado al seguimiento sistemático de la calidad de las pruebas.

1.4. Métodos de genotipificación

La epidemiología de la fiebre Q es compleja, como se deduce de su gran variedad de hospedadores, su capacidad de resistir en el ambiente y su multifactorial transmisión por el aire. Aunque la caracterización de las cepas parece necesaria para comprender las variaciones de la epidemiología de la fiebre Q en función de la zona geográfica, se está avanzando en la evaluación de los métodos de tipificación discriminatoria para la epidemiología molecular (Massung *et al.*, 2012; Sidi-Boumedine & Rousset, 2011). Estas herramientas son muy útiles para la investigación epidemiológica, sobre todo para aclarar los vínculos en cuanto a la fuente de la infección, para comprender mejor los factores epidemiológicos emergentes y, en menor medida, para evaluar las medidas de control.

Para la caracterización de las cepas de *C. burnetii* se han utilizado varios métodos de tipificación, como la endonucleasa de restricción del ADN genómico, la PFGE (electroforesis en gel de campo pulsátil), y el análisis de la secuencia y/o mediante PCR-RFLP (polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción) de los genes icd, com1 y mucZ. Más recientemente se han descrito dos métodos de tipificación basados en la PCR, el MLVA (análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable) y la tipificación de la secuencia multiespacio (MST), que permiten la tipificación de *C. burnetii* sin necesidad de aislar el microorganismo. Se sigue investigando para el desarrollo de nuevos métodos, como el polimorfismo de nucleótido único (SNP), y para comparar las capacidades de discriminación y el valor informativo.

Hasta la fecha, el MLVA y la MST se consideran los métodos más discriminantes para *C. burnetii*, que permiten la identificación de hasta 36 genotipos bien diferenciados. Además, se han establecido las bases de datos <http://mlva.u-psud.fr/MLVAnet/> y <http://ifr48.timone.univ-mrs.fr>, respectivamente, para el MLVA y la MST. La disponibilidad de estas bases de datos permite comparaciones entre laboratorios fácilmente, y ello conducirá a una mejor comprensión de la propagación de las cepas de *C. burnetii* o para identificar nuevas cepas emergentes. Además, cada vez se utilizan más para caracterizar muestras o cepas naturales y se deben potenciar los trabajos destinados a conseguir un esquema estandarizado para el MLVA (basado en decisiones comunes relativas a cómo denominar el alelo y a los conjuntos de marcadores que deben utilizarse), para que pueda listo en un futuro próximo (Massung *et al.*, 2012; Sidi-Boumedine & Rousset, 2011).

2. Pruebas serológicas

2.1. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Esta técnica presenta una gran sensibilidad y una buena especificidad según evaluaciones comparativas que se han realizado entre métodos (Emery *et al.*, 2014; Horigan *et al.*, 2011; Kittelberger *et al.*, 2009; Niemczuk *et al.*, 2014; Rousset *et al.*, 2007; 2009). Es fácil de realizar en laboratorios que tienen el equipo (un espectrofotómetro) y los reactivos necesarios. Es preferible el ELISA a la IFA o la FC, sobre todo en el diagnóstico veterinario, puesto que es cómodo para la detección a gran escala y es el más robusto. Existen kits comerciales listos para usar con los que se pueden detectar mezclas de anticuerpos de fase I y de fase II. El control de calidad de algunos kits ELISA se ha mejorado recientemente empleando un material de referencia externo, que puede conseguirse en el laboratorio de referencia nacional de Francia, demostrando la estandarización entre lotes de kits.

El antígeno de *Coxiella burnetii* para el EISA se prepara mediante crecimiento de cepas estándar en huevos de gallina embrionados o bien en cultivo celular, como se describe abajo el apartado sobre la IFA. Los pocillos de la microplaca se recubren con el antígeno inactivado de células enteras de *C. burnetii*. Se añaden a los pocillos muestras de suero diluido que reacciona con los antígenos unidos al soporte sólido. El material no unido se elimina mediante un lavado después de un período adecuado de incubación. El conjugado (Ig anti-rumiante marcada con peroxidasa de rábano) reacciona con los anticuerpos específicos unidos al antígeno. El exceso de conjugado que no reacciona se elimina mediante el lavado después de un período adecuado de incubación. Se añade el sustrato de la enzima. La velocidad de conversión del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos. La reacción se termina después de un período adecuado de tiempo y el color desarrollado se mide mediante espectrofotometría.

2.1.1. Materiales y reactivos

Placas de microtitulación con 96 pocillos de fondo plano, recién recubiertas o recubiertas de antemano con antígeno de *C. burnetii*; lector de microplacas (espectrofotómetro; filtros de 405 y/o 450 y/o 492 nm); incubador con humidificador a 37°C; pipetas de 8 y 12 canales con puntas desechables de plástico; agitador de microplacas (opcional).

Sueros control positivos y negativos; conjugado (anticuerpo anti-IgG de rumiante o proteína A/G marcados con peroxidasa); diluyente diez veces concentrado (PBS–Tween); agua destilada; sustrato o cromógeno (TMB tetrametilbenzidina), ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) para la peroxidasa]; peróxido de hidrógeno.

2.1.2. Procedimiento de la prueba

- i) Se diluyen las muestras de suero, incluyendo los sueros control, a una dilución apropiada (1/100 o 1/400 dependiendo del kit que se utilice) y se distribuyen por duplicado 0,1 ml por pocillo. Los sueros control son sueros positivos y negativos suministrados por el fabricante, y un suero positivo de referencia interna del laboratorio para comparar los títulos obtenidos entre distintas pruebas.
- ii) Se cubre la placa con la tapa y se incuba a temperatura ambiente durante 30–90 minutos. Se vacía el contenido y se lava tres veces a temperatura ambiente con solución de lavado.
- iii) Se añade a los pocillos la dilución adecuada de conjugado recién preparado (0,1 ml por pocillo).
- iv) Se cubre cada placa y se incuba como en el paso ii. Se lava de nuevo tres veces.
- v) Se añade a cada pocillo 0,1 ml de sustrato cromógeno recién preparado (por ejemplo: TMB en ácido acético 0,1 M y solución de H₂O₂ al 2% [0,2 µl/ml] al 30%; o ABTS 0,25 mM en tampón citrato fosfato, pH 5,0, y solución de H₂O₂ al 30% [0,1 µl/ml]).
- vi) Se agita la placa; se incuba según las recomendaciones de la casa comercial, se detiene la reacción añadiendo solución de parada a cada pocillo, por ejemplo 0,05 ml de ácido sulfúrico 2 M para la TMB o dodecilsulfato sódico al 10% para el ABTS.
- vii) Se lee la absorbancia de cada pocillo con el lector de microplacas a 405 nm (ABTS) o a 450 nm (TMB). Los valores de absorbancia se utilizan para calcular los resultados.

2.1.3. Interpretación de los resultados

En el caso de kits comerciales, las interpretaciones y los valores se suministran con el kit.

Por ejemplo: calcular la absorbancia (Ab) media de la muestra de suero y de los sueros control positivos (Ab_{pos}) y negativos (Ab_{neg}), y calcular el porcentaje para cada suero

$$\frac{Ab - Ab_{neg}}{Ab_{pos} - Ab_{neg}} \times 100$$

Interpretar los resultados del siguiente modo:

Ab <30% suero negativo
Ab >30% suero positivo

Se prepara un diagrama de control y se estima la incertidumbre de la medición alrededor del punto de corte para interpretar los resultados que se sitúen cerca de punto.

2.2. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFA)

En medicina humana, la IFAT adaptada como una técnica de micro-inmunofluorescencia es el método actual para el serodiagnóstico de la fiebre Q (Tissot-Dupont *et al.*, 1994). El procedimiento se puede adaptar para realizar una prueba de inmunoperoxidasa. En resumen, se utilizan antígenos de *C. burnetii* tanto de fase I como de fase II; el antígeno de fase II se obtiene cultivando la cepa de referencia *C. burnetii* Nine Mile (ATCC VR 615) en cultivo celular, mientras que el antígeno de fase I se obtiene del bazo de animales de laboratorio. El antígeno se diluye, se deposita en los pocillos de un porta de vidrio para microscopio, se deja secar y se fija con acetona. Las dos formas de la infección humana, la aguda y la crónica, presentan perfiles serológicos distintos: durante la fiebre Q aguda, los anticuerpos IgG aumentan solo contra la fase II, mientras que durante la fiebre Q crónica se observan niveles elevados de anticuerpos IgG contra las fases I y II de la bacteria (Tissot-Dupont *et al.*, 1994). Además, se pueden comprar a suministradores portas con pocillos antigenados con antígeno de fase II, o de fases I y II de *C. burnetii*. Estos se pueden adaptar cambiando el conjugado humano por un conjugado adaptado a la especie animal. No obstante, la interpretación como forma aguda o crónica no se ha validado para rumiantes.

2.2.1. Preparación del antígeno

A continuación se presenta un ejemplo de preparación de *C. burnetii* para el diagnóstico serológico basado en antígenos de fase II y de fase I, pero en todo el mundo se utilizan otros protocolos modificados. Pueden obtenerse cantidades considerables *C. burnetii* ($>10^{10}$ bacterias) de *C. burnetii* en 2-5 semanas mediante huevos embrionados o de cultivos celulares. Una infección en ratones puede requerir 7-14 días. La purificación de bacterias a partir de material del hospedador incluye centrifugaciones diferenciales y tarda 1 o 2 días.

Se cultivan *C. burnetii* Nine Mile de fase II en capas confluentes de células Vero o L929 en frascos de cultivo de 150 cm² a 35°C y un 5% de CO₂, con medio mínimo esencial (MEM) suplementado con L-glutamina 2 mM y suero fetal bovino al 4%. Se realiza un seguimiento de la infección mediante examen microscópico de las vacuolas intracelulares o recogiendo células de los sobrenadantes de los frascos y tiñéndolas con la tinción de Giménez. Para el seguimiento sistemático, ha resultado extremadamente útil una reciente PCR cuantitativa en tiempo real específica. Cuando se observa una infección intensa por *C. burnetii*, los sobrenadantes de 15 frascos se precipitan de manera individual mediante centrifugación (5000 g, 15 minutos), se resuspenden en 1 ml de PBS con formaldehído al 0,1% y se incuban durante 24 horas a 4°C. Tras combinarlos, las células restantes se rompen mediante sonicación. Los detritos celulares se eliminan mediante dos pasos sucesivos de centrifugación (100 g, 10 minutos cada uno). A continuación, la suspensión de 15 ml se centrifuga con 20 ml de PBS con sacarosa al 25% (6000 g, 30 minutos, sin pausa). El precipitado resultante se lava tres veces en PBS (6000 g, 10 minutos), se resuspende en el menor volumen posible de agua destilada estéril, y se ajusta a 2 mg/ml mediante espectroscopia UV. Se añade un conservante antibacteriano, como la azida sódica, a una dilución final del 0,1%, o tiomersal al 0,01%. El antígeno preparado de esta forma se congela a -20°C.

Para obtener antígeno de fase I, se inocula *C. burnetii* cultivado en células (principalmente en fase II) a ratones. Se extirpan los bazo 9 días después de la infección, y cada uno se tritura en 7,5 ml de MEM y se inocula en tres frascos de cultivo de 75 cm² que contengan monocapas de células L929 o Vero (2,5 ml por frasco). Durante 4 semanas, se lleva a cabo una amplificación de *C. burnetii* de fase I, con un cambio de medio de cultivo a la semana. A continuación, las células infectadas se recogen y las bacterias se purifican como se ha descrito anteriormente (principalmente en fase I).

El antígeno también puede producirse mediante cultivo de *C. burnetii* en huevos embrionados SPF. A los 6-7 días de edad, el microorganismo se inocula en el saco vitelino de los huevos embrionados, y se recoge a los 10-15 días de incubación. Los sacos vitelinos infectados tienen un color amarillo paja característico y unas manchas blancas, mientras que los no infectados son de color naranja y tienen una consistencia viscosa. Todos los embriones que hayan muerto antes de los 5 días de incubación se desechan. La cepa utilizada para la inoculación de los huevos es un homogenado a 1/100 de saco vitelino en PBS con penicilina (500 Unidades Internacionales/ml) y estreptomycin (0,5 mg/ml). Los sacos vitelinos se combinan y homogenizan con tres partes de PBS. La suspensión se inactiva exponiéndola a formaldehído al 1,6% durante 24 horas a 37°C. El líquido sobrenadante lipídico se desecha. A continuación, la suspensión se centrifuga a una velocidad moderada (~500 g) durante 30 minutos. Tras la extracción del sobrenadante, se añade más PBS y se repite la centrifugación. La suspensión final se diluye con PBS. Se añade azida sódica o tiomersal como conservante antibacteriano. La abundancia de *C. burnetii* y la ausencia de contaminantes bacterianos en los homogenados

de sacos vitelinos suspendidos en PBS se verifican mediante examen microscópico de un frotis en un portaobjetos, teñido con la tinción de Stamp. Para obtener antígeno de fase I, puede propagarse *C. burnetii* recuperado de bazo de animales de laboratorio infectados, ya que los extractos de bazo triturado a continuación se transfieren en los sacos vitelinos, dado que la cantidad de células en fase I sigue alta hasta el sexto pase por huevo.

La titulación del antígeno con al menos tres sueros conocidos diferentes (con títulos alto, moderado y bajo, respectivamente) es suficiente para determinar la dilución adecuada para posteriores pruebas de inmunofluorescencia.

2.2.2. Materiales y reactivos

Microscopio equipado para fluorescencia, incubador con humidificador, pila de lavado.

Se necesitan portas adecuados para el antígeno. Este puede prepararse en el laboratorio o comprarse a un proveedor (véase más arriba). El método descrito está adaptado del kit comercial de BioMérieux, y se indica a título de ejemplo. Los portas preparados contienen 12 pocillos cada uno, que miden 7 mm de diámetro y están recubiertos de antígeno de fase II obtenido de cultivos en células Vero; pueden guardarse a 4°C o a -20°C.

Conjugado fluorescente concentrado, para ser diluido cuando sea necesario con PBS + azul de Evans al 1%, a las diluciones recomendadas por la casa comercial.

PBS, glicerina tamponada, colorante azul de Evans en solución al 1%.

2.2.3. Procedimiento analítico

Sobre portaobjetos de inmunofluorescencia con pocillos previamente recubiertos con uno o ambos antígenos, se depositan diluciones a la mitad del suero problema. Si este contiene anticuerpos específicos, serán fijados por el antígeno. A continuación, el complejo se detecta mediante un examen con un microscopio de fluorescencia añadiendo un conjugado fluorescente que reconoce las inmunoglobulinas específicas de especie.

- i) Se realizan diluciones seriadas de los sueros en PBS de 1/40 a 1/640.
- ii) Se deja que los portas recubiertos con el antígeno alcancen la temperatura ambiente. No deben tocarse los pocillos.
- iii) Se depositan en los pocillos 20 µl de cada dilución de suero. Se añaden sueros de control positivo y negativo. A un pocillo, se añaden como control de antígeno 20 µl de PBS.
- iv) Se incuba en una cámara húmeda 30 minutos a 37° C. Se lava el porta dos veces con PBS durante 10 minutos cada vez. Se lava con agua destilada y se deja secar al aire.
- v) Se depositan en los pocillos, incluidos los controles, 20 µl del conjugado dirigido contra la especie en cuestión (por ejemplo, anticuerpo de conejo anti IgG de cabra o de oveja y conjugado con ITCF [H+L]), acabado de diluir en PBS + azul de Evans. Se incuba en una cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C. Se lava con agua destilada y se deja secar al aire. Se añaden unas cuantas gotas de glicerina tamponada y se tapa con un cubre. Se examina en un microscopio de fluorescencia con aumentos de x400 o más.

2.2.4. Interpretación de los resultados

Una reacción positiva se manifiesta por la presencia de pequeños puntos brillantes en un fondo oscuro. Hay que comprobar que el conjugado solo y el suero control negativo dan un resultado negativo (ausencia de los pequeños puntos brillantes). La fluorescencia inespecífica suele tomar forma de manchas de tamaño irregular. El control positivo debe dar el título conocido ± un orden de dilución.

2.3. Prueba de fijación de complemento (CF)

Como se ha mencionado anteriormente, la CF se considera menos sensible que el EISA o la IFA y en veterinaria se utiliza cada vez menos.

Este micrométodo de fijación en frío, semejante al desarrollado por Kolmer, se realiza en placas de microtitulación con 96 pocillos de fondo en forma de U. Mediante esta prueba, se detecta la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en el suero. En este método se utiliza antígeno de fase I con antígeno de fase II preparada a partir de una cepa humana o Nine Mile.

La reacción se lleva a cabo en dos etapas. Primero se mezcla el antígeno con los anticuerpos fijadores del complemento, y se incuban durante toda una noche a 4°C. Al día siguiente, se añaden eritrocitos de oveja que están sensibilizados por suero anti-eritrocitos de oveja. Durante el primer paso, la fijación del complemento por el complejo antígeno/anticuerpo no permite la lisis de los eritrocitos; por el contrario, si no existen anticuerpos fijadores del complemento, el complemento induce entonces la lisis de los eritrocitos sensibilizados. Por consiguiente, la velocidad de la hemólisis es inversamente proporcional al nivel de anticuerpos específicos que están presentes en la muestra de suero.

2.3.1. Reactivos

Tampón Veronal/calcio/magnesio (VB), pH 7,2

El sistema hemolítico: una mezcla a partes iguales de una suspensión de eritrocitos de oveja al 2% en VB; y suero hemolítico diluido en VB según un título específico.

Complemento: Un kit comercial liofilizado de suero fresco de cobaya.

Antígeno: Usar antígenos comerciales al título recomendado por el fabricante, si la titulación del antígeno se realiza por este método.

Sueros control positivos y negativos.

2.3.2. Pre-titulaciones

- i) Se diluyen los eritrocitos de oveja a una concentración final de 2% en VB.
- ii) Se titula el suero hemolítico en una microplaca: 25 µl de complemento a una concentración hemolítica conocida (por ejemplo, 1/30); 25 µl de diluciones crecientes de suero hemolítico + eritrocitos de oveja al 2%. Se incluyen los controles sin complemento. Se incuba 30 minutos a 37°C. Se establece la dilución equivalente a 2 unidades hemolíticas.
- iii) Se diluye el antígeno como recomienda el fabricante. El antígeno también puede titularse: se hacen diluciones crecientes de antígeno (25 µl horizontalmente) y un suero positivo de título conocido (25 µl verticalmente). Se añaden 25 µl de la suspensión de eritrocitos sensibilizados y se incuba 30 minutos a 37°C. El título del antígeno es la dilución más alta que produce una reacción positiva con la dilución más alta del suero. Se debe comprobar la ausencia de actividad anti-complementaria del antígeno a diferentes diluciones.
- iv) Se titula el complemento en una microplaca: se hacen diluciones seriadas del complemento o del suero de cobaya en VB, por ejemplo de 1/15 a 1/200. A cada pocillo con 25 µl de esta dilución, se añaden 25 µl de antígeno y 25 µl del sistema hemolítico. Se incuba 30 minutos a 37°C y se establece la dilución equivalente a 2 unidades hemolíticas de complemento.

2.3.3. Procedimiento analítico

- i) En seis pocillos se hacen diluciones a la mitad, de 1/10 a 1/320, del suero problema inactivado y en otros cuatro pocillos diluciones de 1/10 a 1/80 para detectar actividad anti-complementaria (25 µl por pocillo).
- ii) Se añaden 25 µl de antígeno diluido o 25 µl de VB a los pocillos de suero control.
- iii) Se añaden 25 µl de complemento a todos los pocillos. Se cubre la placa con una lámina de plástico adhesivo y se incuba 18 horas a 4°C.
- iv) Se sacan las placas de la nevera, se deja que alcancen la temperatura ambiente, y se añaden 25 µl de sistema hemolítico recién preparado. Se incuban a 37°C durante 30 minutos. Se centrifugan las placas a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Se examinan los controles y se leen los resultados.

2.3.4. Interpretación de los resultados

Los títulos comprendidos entre 1/10 y 1/40 son característicos de una infección latente. Los títulos de 1/80 o más, en uno o más sueros de un grupo de cinco a diez animales, revelan una fase evolutiva de la infección.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

C1. Vacuna inactivada

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Para el control de la infección por *C. burnetii*, tanto en humanos como en animales, se pueden vacunar los rumiantes empleando vacunas contra *C. burnetii* inactivadas. El objetivo de esta vacunación es reducir la excreción de la bacteria y el riesgo de aborto. Por ahora, contra *C. burnetii* solo se dispone de vacunas inactivadas. Las vacunas inactivadas que están a la venta derivan de cepas de *C. burnetii* en fase I (Nine Mile) o en fase II, pero se ha comprobado científicamente que el antígeno protector de *C. burnetii* es el LPS de fase I de longitud completa (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Okimoto *et al.*, 2004; Ormsbee *et al.*, 1964; To *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1992). Para generar una respuesta inmunitaria adecuada y al mismo tiempo minimizar las amenazas a la seguridad, la producción de vacuna, si se desea que sea eficiente, debe ir encaminada a vacunas que contengan antígeno de fase I (Elliott *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013).

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

La cepa de *C. burnetii* que vaya a incluirse en las vacunas deberá estar bien caracterizada, proceder de un origen conocido, ser pura y pertenecer exclusivamente a la fase escogida. Para consultar las directrices sobre los inóculos primarios, véase el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Los inóculos de *Coxiella burnetii* deben constituir cultivos puros y estar libres de bacterias contaminantes y de hongos (véase el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*). La producción debe llevarse a cabo siguiendo el sistema de lotes de siembra (véase el capítulo 1.1.8). El método de producción de los inóculos es el mismo que el de la producción de antígeno hasta el paso de la inactivación. Los inóculos pueden liofilizarse o bien conservarse a temperaturas inferiores a los -40°C. En los inóculos se realizan pruebas de título vivo, de identidad y de pureza (véase el capítulo 1.1.9).

2.1.3. Validación como cepa vacunal

La idoneidad como cepa vacunal se comprueba mediante pruebas de eficacia y de inocuidad.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Dado que las cepas que se utilizan actualmente en la producción de la vacuna derivan de cepas naturales virulentas, la propagación de bacterias vivas debe llevarse a cabo aplicando los procedimientos de bioseguridad y bioprotección apropiados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). El personal involucrado en esta tarea deberá haber recibido la correspondiente formación y estar vacunado contra la fiebre Q.

El proceso de producción incluye el cultivo de *C. burnetii* en membrana de saco vitelino de pollo embrionado libre de patógenos específicos (SPF). Tras 5-9 días de incubación, los huevos se ponen a enfriar y los sacos vitelinos se recolectan. El material recolectado se homogeneiza, se diluye en tampón y se inactiva con un agente inactivante adecuado (como el formaldehído) para asegurar que no quede ningún microorganismo vivo. El antígeno inactivado se somete a una concentración a 5-10x, seguida de una combinación de pasos de extracción química y centrifugación para que el huevo no arrastre tanto material de la matriz. Ello dará lugar a un antígeno más purificado y evitará reacciones post-vacunales en las especies de destino vacunadas con el producto final.

El antígeno purificado concentrado se diluye y se formula a la dosis protectora establecida. La formulación vacunal se basa en la cuantificación del antígeno (por ejemplo, por peso o ELISA) y puede contener tiomersal como conservante.

En algunos laboratorios se están desarrollando otros procesos de producción de antígeno de la fiebre Q empleando cultivos celulares o crecimiento celular en medios axénicos (Lockhart *et al.*, 2013; Omsland *et al.*, 2009). También se han publicado estudios de desarrollo de antígeno peptídico mimético (Peng *et al.*, 2012).

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Véase el capítulo 1.1.8.

2.2.3. Controles durante el proceso

Como se hace con todas las vacunas inactivadas, se determina el título vivo antes de la inactivación, con el fin de garantizar que sea inferior al valor máximo para el cual se validó el proceso de inactivación. El título se puede determinar mediante inoculación en huevo o por PCR cuantitativa. La pureza microbiológica de los cultivos se determina en todas las etapas de producción antes de la inactivación. El éxito de la inactivación debe determinarse mediante la prueba del cultivo utilizando medios lo suficientemente sensibles (como huevos embrionados o cultivos celulares).

Dado que es esencial diferenciar entre antígenos de fase I y antígenos de fase II, desde el inicio del proceso de desarrollo de la vacuna debe determinarse qué métodos analíticos se utilizarán. Véase el apartado A.2 de este capítulo. Estos métodos deben incluir pruebas de control de la calidad para realizar tanto durante el proceso como en el producto final. En el caso de las vacunas de Fase I, son muy importantes tanto la diferenciación como la cuantificación del antígeno de fase I. A nivel celular, se puede diferenciar entre antígenos de fase I y de fase II ya sea mediante PCR o mediante ELISA, y a nivel de antígeno purificado o de vacuna, mediante métodos inmunológicos (por ejemplo, con transferencia de puntos, ELISA o IFA) empleando antisueros específicos de fase. El método cualitativo más sencillo para este fin es la comprobación cruzada de la muestra mediante transferencia de puntos con antisueros específicos de fase I y de fase II. Los antisueros de fase I contienen anticuerpos específicos tanto de antígenos de fase I como de antígenos de fase II, mientras que los antisueros de fase II solo contienen anticuerpos específicos de fase II. Así pues, las bacterias de fase I darán un doble resultado positivo en la transferencia de puntos, mientras que las bacterias de fase II darán positivo solo con los antisueros de fase II. La PCR y ciertos métodos inmunológicos también puede servir como sistemas de identificación.

La cuantificación del antígeno purificado para la formulación de la vacuna puede determinarse por peso, por densidad óptica o mediante un ELISA. La mejor opción para cuantificar el antígeno es el ELISA, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Dado que estas pruebas no son fáciles de conseguir, deben ser los propios fabricantes de vacuna los que las desarrollen y validen.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad/pureza

En el producto final se realizan pruebas de esterilidad. Cada lote debe superar unos requisitos de esterilidad, por ejemplo, los indicados en la monografía de la Farmacopea Europea 2.6.1 (véase también el capítulo 1.1.9).

ii) Identidad

La identidad de los antígenos de los productos inactivados se garantiza gracias al concepto lotes de siembra y a los controles establecidos por las buenas prácticas de

fabricación. La identidad y el tipo de fase deben validarse en distintos puntos de todo el proceso de producción, por ejemplo, mediante ELISA o PCR.

iii) Inocuidad

En muchas regiones, para poner en circulación los lotes no se precisan pruebas de inocuidad en las especies de destino. Cuando sí se precisan, en general se llevan a cabo procedimientos estándar empleando menos animales que en las pruebas de seguridad exigidas para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras, y animales de la menor edad de vacunación recomendada.

iv) Potencia del lote

La efectividad de las vacunas de uso veterinario contra la fiebre Q se demuestra mediante la vacunación y la posterior exposición a la bacteria en las especies de destino, empleando una cepa heteróloga durante la fase central de la gestación. Por motivos evidentes de seguridad, estos estudios deben llevarse a cabo en instalaciones para animales aplicando procedimientos de bioseguridad y bioprotección apropiados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4.). Los dos parámetros principales a evaluar son: una disminución significativa en la tasa de abortos y una disminución en la excreción de la bacteria. Las pruebas de potencia de los lotes que se utilizan se correlacionan con la dosis mínima protectora garantizada y con el periodo de validez de la vacuna. Los métodos *in vitro* de determinación de la potencia son preferibles a las pruebas *in vivo*. Se prefieren las pruebas que permiten al mismo tiempo la cuantificación de la potencia y la obtención de una identificación a nivel de especie (como el ELISA).

v) Contenido en formaldehído

En las vacunas inactivadas con formaldehído se realizan pruebas para comprobar el nivel de formaldehído residual.

2.3. Requisitos para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras

El siguiente apartado se basa en los requisitos establecidos en la Unión Europea en cuanto a las vacunas inactivadas contra *C. burnetii*. Es posible que en otros países haya requisitos ligeramente distintos.

2.3.1. Proceso de fabricación

El fabricante debe demostrar que el método de producción preserva la antigenicidad protectora y que el procedimiento empleado para inactivar la bacteria es suficiente para una inactivación completa. El proceso de inactivación debe comprobarse al máximo título antigénico posible. La sensibilidad de la prueba de inactivación debe demostrarse en la matriz antigénica de tal forma que se evidencie que la prueba podría detectar título antigénico por debajo de la dosis mínima infecciosa. Debe demostrarse la inactivación en todos los lotes de producción.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

La inocuidad del producto debe demostrarse durante la fase de desarrollo de la vacuna administrando a animales de la especie de destino una dosis normal, sobredosis y dosis repetidas, así como en estudios de campo a gran escala con animales de la mínima edad de vacunación y animales gestantes. Todas las pruebas de laboratorio relativas a la inocuidad se llevan a cabo en animales de la edad mínima recomendada para la primovacunación. Los animales de esta edad se consideran los más sensibles a todos los posibles signos de intolerancia a la vacuna.

Las pruebas de laboratorio se llevan a cabo en entornos controlados, mientras que los estudios de campo se realizan en las condiciones de uso normal de la vacuna con pocos animales no tratados o animales control tratados con placebo. La inocuidad de la vacuna se demuestra tras descartar signos de reacciones locales y signos generales durante 21 días tras la primovacunación.

El impacto de la vacunación en el rendimiento reproductivo se valora en función de datos obtenidos en estudios de campo y de las cifras de partos de animales vacunados durante las distintas etapas de la gestación con vacuna contra *Coxiella* o con placebo. Si se

utilizan cantidades de animales estadísticamente relevantes, no debe haber diferencias estadísticamente significativas entre los datos de los animales tratados con placebo y los de los animales vacunados con vacuna contra *Coxiella*.

- ii) Reversión a la virulencia de las vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

No es aplicable.

- iii) Precauciones (peligros)

Es frecuente observar una reacción palpable de algunos centímetros de diámetro en el punto de inyección. Esta reacción se reduce y desaparece sin más en cuestión de pocos días. Es frecuente que se produzca un ligero aumento de la temperatura rectal durante un periodo de hasta 4 días tras la vacunación.

2.3.3. Requisitos de eficacia

La eficacia de las vacunas debe demostrarse en las especies de destino. El lote de producto utilizado en el estudio de desafío debe ser representativo del proceso de producción industrial final con el máximo número permitido de pases desde el inóculo primario. La eficacia del producto se demuestra por una diferencia estadísticamente significativa en los datos relativos a abortos y excreción de la bacteria entre el grupo vacunado y el grupo control. Por ejemplo, en el caso de los pequeños rumiantes, se puede aplicar el siguiente protocolo: los animales seronegativos se vacunan en el momento más cercano posible (permitido) a la inseminación artificial (por ejemplo, 3 semanas antes). Estos animales se exponen por vía subcutánea a media gestación a una cepa de desafío heteróloga calibrada en ratones y cabras. Se realiza un seguimiento de los niveles de anticuerpos específicos mediante ELISA a partir de los sueros durante la gestación y a partir de la leche tras el parto, con el fin de demostrar la aparición de inmunidad protectora. Se realiza un seguimiento semanal de la excreción de la bacterias mediante PCR a partir de muestras de heces durante la gestación, y tras el parto, a partir de moco vaginal y leche, o placenta en caso de aborto. Se comprueba la tasa de abortos del grupo vacunado y del grupo no vacunado. El grupo vacunado debe presentar una reducción estadísticamente significativa de la excreción de la bacteria y de la tasa de abortos respecto a las del grupo control no vacunado.

Las afirmaciones en cuanto a eficacia también pueden estar respaldadas por estudios de campo a gran escala cuando se cuenta con una exposición a una cepa natural, mediante un análisis estadístico de la excreción de la bacteria y de las tasas de abortos y empleando métodos analíticos similares a los que se aplican en los estudios de laboratorio. Guatteo *et al.* (2008) demostraron con éxito que el ganado vacuno no gestante vacunado presentaba una probabilidad cinco veces menor de ser excretor de la bacteria que los animales no vacunados.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

No es aplicable a esta enfermedad.

2.3.5. Duración de la inmunidad

La duración de la inmunidad se puede demostrar mediante datos serológicos, por desafío o mediante datos de fertilidad obtenidos en estudios de campo.

2.3.6. Estabilidad

La estabilidad de la vacuna se valida mediante pruebas de puesta en circulación de la vacuna a intervalos periódicos durante el periodo de validez previsto para el producto. Para demostrar estabilidad, deben utilizarse al menos tres lotes de producto representativos.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON A., BIJLMER H., FOURNIER P.E., GRAVES S., HARTZELL J., KERSH G.J., LIMONARD G., MARRIE T.J., MASSUNG R.F., MCQUISTON J.H., NICHOLSON W.L., PADDOCK C.D. & SEXTON D.J. (2013). Diagnosis and management of Q fever – United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm. Rep.*, **62** (RR-03), 1–30.

- ARRICAU-BOUVERY N., SOURIAU A., BODIER C., DUFOUR P., ROUSSET E. & RODOLAKIS A. (2005). Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine*, **23**, 4392–4402.
- BEARE P.A., UNSWORTH N., ANDOH M., VOTH D.E., OMSLAND A., GILK S.D., WILLIAMS K.P., SOBRAL B.W., KUPKO J.J. 3RD, PORCELLA S.F., SAMUEL J.E. & HEINZEN R.A. (2009). Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect. Immun.*, **77**, 642–656.
- BERRI M., LAROUCAU K. & RODOLAKIS A. (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **72**, 285–293.
- DRANCOURT M. & RAOULT D. (2005). Genus I. *Coxiella*. In: *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. & Garrity G.M., eds. Springer-Verlag, East Lansing, MI, USA, 237–241.
- DE CREMOUX R., ROUSSET E., TOURATIER A., AUDUSSEAU G., NICOLLET P., RIBAUD D., DAVID V. & LE PAPE M. (2012). *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **64**, 120–122.
- ECDC (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL) (2010). Panel with Representatives from the Netherlands, France, Germany, United Kingdom, United States of America. Risk assessment on Q fever. *ECDC Technical Report*, 40 pp. doi:10.2900/28860. Available online: www.ecdc.europa.eu
- ELLIOTT A., SCHOENLAUB L., FRECHES D., MITCHELL W. & ZHANG G. (2015). Neutrophils play an important role in protective immunity against *Coxiella burnetii* infection. *Infect. Immun.*, **83**, 3104–3113.
- EMERY M.P., OSTLUND E.N., AIT ICHOU M., BALLIN J.D., MCFARLING D. & MCGONIGLE L. (2014). *Coxiella burnetii* serology assays in goat abortion storm. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **26**, 141–145.
- GIMENEZ D.F. (1964). Staining rickettsiae in yolk-sack cultures. *Stain. Technol.*, **39**, 135–140.
- GUATTEO R., BEAUDEAU F., JOLY A. & SEEGERS H. (2007). *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.*, **38**, 849–860.
- 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**, 4320–4338.
- HEINZEN R.A., HACKSTADT T. & SAMUEL J.E. (1999). Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.*, **7**, 149–154.
- HORIGAN M.W., BELL M.M., POLLARD T.R., SAYERS A.R. & PRITCHARD G.C. (2011). Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **23**, 924–931.
- JENSEN T.K., MONTGOMERY D.L., JAEGER P.T., LINDHARDT T., AGERHOLM J.S., BILLE-HANSEN V. & BOYE M. (2007). Application of fluorescent *in situ* hybridisation for demonstration of *Coxiella burnetii* in placentas from ruminant abortions. *APMIS*, **115**, 347–353.
- KERSH G.J., WOLFE T.M., FITZPATRICK K.A., CANDEE A.J., OLIVER L.D., PATTERSON N.E., SELF J.S., PRIESTLEY R.A., LOFTIS A.D. & MASSUNG R.F. (2010). Presence of *Coxiella burnetii* DNA in the environment of the United States (2006–2008). *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 4469–4475.
- KITTELBERGER R., MARS J., WIBBERLEY G., STING R., HENNING K., HORNER G.W., GARNETT K.M., HANNAH M.J., JENNER J.A., PIGOTT C.J. & O'KEEFE J.S. (2009). Comparison of the Q fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants: Recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *NZ Vet. J.*, **57**, 262–268.
- KLEE S.R., TYCZKA J., ELLERBROK H., FRANZ T., LINKE S., BALJER G. & APPEL B. (2006). Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiol.*, **6**, 2.
- LANG G.H. (1990). Coxiellosis (Q fever) in animals. In: *Q Fever. Volume I: The Disease*, Marrie T.J., ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 23–48.

- LOCKHART M.G., ISLAM A., FENWICK S.G., GRAVES S.R. & STENOS J. (2013). Growth yields of four *Coxiella burnetii* isolates in four different cell culture lines. *Adv. Microbiol.*, **3**, 88–90.
- MASSUNG M.F., CUTLER S.J. & FRANGOULIDIS D. (2012). Molecular typing of *Coxiella burnetii* (Q fever). *Adv. Exp. Med. Biol.*, **984**, 381–396.
- MINNICK R.F. & RAGHAVAN R. (2012). Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **984**, 231–248.
- NIEMCZUK K., SZYMAŃSKA-CZERWIŃSKA M., ŚMIETANKA K. & BOCIAN Ł. (2014). Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. *Vet. Microbiol.*, **171**, 147–152.
- OKIMOTO N., ASAOKA N., OSAKI K., KURIHARA T., YAMATO K., SUNAGAWA T., FUJITA K., OHBA H., NAKAMURA J. & NAKADA K. (2004). Clinical features of Q fever pneumonia. *Respirology*, **9**, 278–282.
- OMSLAND A., COCKRELL D.C., HOWE D., FISCHER E.R., VIRTANEVA K., STURDEVANT D.E., PORCELLA S.F. & HEINZEN R.A. (2009). Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 4430–4434.
- O'NEILL T.J., SARGEANT J.M. & POLJAK Z. (2013). A systematic review and meta-analysis of Phase I inactivated vaccines to reduce shedding of *Coxiella burnetii* from sheep and goats from routes of public health importance. *Zoonoses Public Health*, **61**, 519–533.
- ORMSBEE R.A., BELL E.J., LACKMAN D.B. & TALLENT G. (1964). The influence of phase on the protective potency of Q fever vaccine. *J. Immunol.*, **92**, 404–412.
- PENG Y., ZHANG Y., MITCHELL W.J. & ZHANG G. (2012). Development of a lipopolysaccharide-targeted peptide mimic vaccine against Q fever. *J. Immunol.*, **189**, 4909–4920.
- QUINN P.J., CARTER M.E., MARKEY B. & CARTER G.R. (1994). Bacterial pathogens: microscopy, culture and identification. *In: Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, Mosby-Year Book Europe Limited, 21–30.
- RAOULT D., LAURENT J.C. & MUTILLOD M. (1994). Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, **101**, 318–320.
- RAOULT D., VESTRIS G. & ENEA M. (1990). Isolation of 16 strains of *Coxiella burnetii* from patients by using a sensitive centrifugation cell culture system and establishment of the strains in HEL cells. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2482–2484.
- ROUSSET E., BERRI M., DURAND B., DUFOUR P., PRIGENT M., DELCROIX T., TOURATIER A. & RODOLAKIS A. (2009). *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 428–433.
- ROUSSET E., DURAND B., BERRI M., DUFOUR P., PRIGENT M., RUSSO P., DELCROIX T., TOURATIER A., RODOLAKIS A. & AUBERT M.F. (2007). Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. *Vet. Microbiol.*, **124**, 286–297.
- ROUSSET E., PRIGENT M., AMEZIANE G., BRUGIDOU R., MARTEL I., GROB A., LE GALL G., KERNINON S., DELAVAL J., CHASSIN A., VASSILOGLIOU B., AULAGNON S., VALOGNE A., OGIER M., AUDEVAL C., COLOCCI F., PERENNES S., CAZALIS L., NICOLLET P., MAINGOURT C. & SIDI-BOUMEDINE K. (2012). Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. *Euroreference*. **No. 8**, 21–27. Available online: <https://pro.anses.fr/euroreference/Documents/ER08-Meth-FievreQAvortEN.pdf>
- SCOTT G.H., WILLIAMS J.C. & STEPHENSON E.H. (1987). Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 691–700.
- SESHADRI R., PAULSEN I.T., EISEN J.A., READ T.D., NELSON K.E., NELSON W.C., WARD N.L., TETTELIN H., DAVIDSEN T.M., BEANAN M.J., DEBOY R.T., DAUGHERTY S.C., BRINKAC L.M., MADUPU R., DODSON R.J., KHOURI H.M., LEE K.H., CARTY H.A., SCANLAN D., HEINZEN R.A., THOMPSON H.A., SAMUEL J.E., FRASER C.M. & HEIDELBERG J.F. (2003). Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5455–5460.

SIDI-BOUMEDINE K. & ROUSSET E. (2011). Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. *EuroReference*, **No. 5**, 30–37. Available online: <http://www.ansespro.fr/euroreference/numero5/PNB010.htm>

SIDI-BOUMEDINE K., ROUSSET E., HENNING K., ZILLER M., NIEMCZUCK K., ROEST H.I.J. & THIÉRY R. (2010). Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. *EFSA Scientific Report on Question No EFSA-Q-2009-00511.*, 48 pp. Available online: www.efsa.europa.eu

STEMMLER M. & MEYER H. (2002). Rapid and specific detection of *Coxiella burnetii* by LightCycler PCR. *In: Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis*, Reisch U., Wittwer C. & Cockerill F., eds. Springer, Berlin, Germany 149–154.

THIELE D., KARO M. & KRAUSS H. (1992). Monoclonal antibody based capture ELISA/ELIFA for detection of *Coxiella burnetii* in clinical specimens. *Eur. J. Epidemiol.*, **8**, 568–574.

TISSOT-DUPONT H., THIRION X. & RAOULT D. (1994). Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1**, 189–196.

TO H., HTWE K.K., KAKO N., KIM H.J., YAMAGUCHI T., FUKUSHI H. & HIRAI K. (1998). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 859–861.

VAN ASSELDONK M.A., PRINS J. & BERGEVOET R.H. (2013). Economic assessment of Q fever in the Netherlands. *Prev. Vet. Med.*, **112**, 27–34.

WILLIAMS J.C., PEACOCK M.G., WAAG D.M., KENT G., ENGLAND M.J., NELSON G. & STEPHENSON E.H. (1992). Vaccines against coxiellosis and Q fever. Development of a chloroform:methanol residue subunit of phase I *Coxiella burnetii* for the immunization of animals. *Ann. NY Acad. Sci.*, **653**, 88–111.

ZHANG G., PENG Y., SCHOENLAUB L., ELLIOTT A., MITCHELL W. & ZHANG Y. (2013). Formalin-inactivated *Coxiella burnetii* phase I vaccine-induced protection depends on B cells to produce protective IgM and IgG. *Infect. Immun.*, **81**, 2112–2122.

*

* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la Fiebre Q

(puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE Para obtener más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Fiebre Q

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2015 (SOLO EL APARTADO SOBRE DIAGNÓSTICO) Y 2018 (APARTADO SOBRE VACUNAS).