



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Detección y caracterización de *Coxiella burnetti* en bovinos de predios
de pequeños productores de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos**

Cristóbal Alberto Carrillo Ahumada

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: CARLOS NÚÑEZ POBLETE

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2023



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Detección y caracterización de *Coxiella burnetti* en bovinos de predios
de pequeños productores de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos**

Cristóbal Alberto Carrillo Ahumada

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:....

Profesor Guía:	Dr. Carlos Nuñez Poblete
Profesor Corrector:	Dr. Patricio Retamal Merino
Profesor Corrector:	Dra. Consuelo Borie Polanco

Firma

.....
.....
.....


SANTIAGO, CHILE

2023

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Características de <i>Coxiella burnetti</i>	5
Presentación de la enfermedad en rumiantes.....	5
Presentación de la enfermedad en humanos.....	6
Contexto internacional respecto a la bacteria.....	7
Situación nacional en Los Ríos y Los Lagos.....	7
Detección de la bacteria.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Encuesta y toma de muestra.....	11
Extracción de DNA.....	12
PCR convencional anidado.....	12
Electroforesis.....	13
Secuenciación.....	13
Bioseguridad.....	13
RESULTADOS.....	15
DISCUSIÓN.....	16
CONCLUSIÓN.....	20
ANEXOS.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

Múltiples estudios se han desarrollado de manera global para comprobar la presencia de *Coxiella burnetti* en predios de productores de leche rumiantes mediante el uso de distintas técnicas de detección de la bacteria.

Si bien existen investigaciones en torno a su trazabilidad en Chile, es escasa la información precisa con relación a su distribución, por ello el objetivo principal de esta memoria de título ha sido detectar la presencia de *Coxiella burnetti* en bovinos por medio de muestras de sangre de rebaños localizados en las regiones de Los ríos y Los Lagos, datos que también han sido utilizados para su caracterización genética.

Con la finalidad de responder a estos objetivos se realizó una prueba de PCR anidada a la región IS1111 de 78 muestras provenientes de 9 predios de pequeños productores de las regiones anteriormente mencionadas. Posteriormente, se efectuó electroforesis a los productos de la PCR, en donde las muestras positivas del total fueron secuenciadas genéticamente.

Finalmente, los resultados señalan que 7 muestras fueron positivas mediante electroforesis a la prueba de PCR, siendo éstas provenientes de ambas regiones. Sin embargo, no se pudo caracterizar genéticamente las muestras positivas debido a la irregularidad en los resultados. Estos datos buscan ser un aporte para aproximaciones posteriores en la detección de *C. burnetti* que se desarrollen particularmente en las regiones de Los Ríos y Los Lagos.

Palabras claves: *Coxiella burnetti*, pequeños productores, PCR anidada, IS11.

ABSTRACT

Multiple studies have been developed globally to verify the presence of *Coxiella burnetti* in farms of ruminant dairy farmers using different detection techniques for the bacteria.

Although there is research on its traceability in Chile, there is little precise information regarding its distribution, for this reason the main objective of this title report has been to detect the presence of *Coxiella burnetti* in bovines through blood samples of herds located in the Los Ríos and Los Lagos regions, data that have also been used for their genetic characterization.

In order to meet these objectives, a nested PCR test was performed on the IS1111 region of 78 samples from 9 small-scale farms in the aforementioned regions. Subsequently, electrophoresis was performed on the PCR products, where the positive samples of the total were genetically sequenced.

Finally, the results indicate that 7 samples were positive by electrophoresis to the PCR test, these being from both regions. However, the positive samples could not be genetically characterized due to the irregularity in the results. These data seek to be a contribution for later approaches in the detection of *C. burnetti* that are developed particularly in the Los Ríos and Los Lagos regions.

Keywords: *Coxiella burnetti*, small producers, nested PCR, IS1111.

INTRODUCCIÓN

El término Fiebre Q proviene de “*query fever*”, este se le dio cuando apareció por primera vez esta enfermedad en Queensland, Australia, y cuya causa aún no había sido identificada (Sykes y Norris, 2013). Actualmente, se sabe que es una zoonosis causada por la bacteria *Coxiella burnetii*, que se encuentra alrededor de todo el mundo excepto en Nueva Zelanda (Vanderburg *et al.*, 2014). Los rumiantes domésticos son considerados los principales reservorios para Fiebre Q en humanos, sin embargo, otras especies incluidos los animales de compañía, aves y reptiles, pueden comportarse también como reservorios de la bacteria (Roest *et al.*, 2011).

En humanos, la presentación aguda de la Fiebre Q se caracteriza por ser una enfermedad febril, similar a la influenza, con dolores de cabeza y a veces afección pulmonar y hepática. Sin embargo, la infección es asintomática en el 60% de los infectados (Sykes y Norris, 2013).

En Sudamérica ha sido publicada poca información epidemiológica y los estudios sistemáticos son escasos. Particularmente en Chile, ha sido detectada mediante test de ELISA y la infección se encuentra entre las enfermedades animales de declaración obligatoria desde su primera detección serológica el 2006 (Weitzel *et al.*, 2016). El primer brote de Fiebre Q en humanos fue detectado en 1998 en la Estación Cuarentenaria Pecuaria, Complejo Lo Aguirre, con 36 personas con reacción positiva a Inmunofluorescencia Indirecta (González y Moreira, 2003). En el último brote de la enfermedad, en octubre de 2017 en la región de Los Lagos, se notificaron 48 personas positivas a Fiebre Q. Los casos correspondían principalmente a hombres (68%), con un rango de edad entre 10 a 55 años (mediana de 30 años). De éstos, 37 eran trabajadores pecuarios o relacionados (77%), 7 familiares de trabajadores (15%) y 3 trabajadores de la salud asociados a la atención médica de los casos (6%), en los hospitales de Puerto Octay (n=1) y Osorno (n=2) (MINSAL, 2017).

Dado el escaso conocimiento de la distribución de *C. burnetti* en rumiantes del sur de Chile, esta memoria de título tiene por objetivo identificar y secuenciar el gen IS1111 de *C. burnetti* en rebaños bovinos de predios de pequeños productores de las regiones de los Ríos y de los Lagos. Los resultados obtenidos contribuirán como una base para futuras investigaciones, considerando los problemas para la salud pública que puede llegar a generar, sumado a las potenciales pérdidas económicas, teniendo en cuenta que aproximadamente 327.686

personas viven en zonas rurales y existe una masa ganadera de 1.668.792 cabezas de bovinos aproximadamente en las Regiones de Los Ríos y Los Lagos (INE, 2007; INE, 2017).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CARACTERÍSTICAS DE *C. burnetti*

Coxiella burnetii es un bacilo Gram negativo de entre 0,3-1,0 µm de tamaño. Vive en las vacuolas ácidas de macrófagos y monocitos, inhibiendo su actividad fagocítica y los mecanismos de apoptosis, siendo además capaz de formar de manera extracelular pseudoesporas metabólicas inactivas (Fariñas y Collado, 2010).

C. burnetii crece usualmente en dos etapas morfológicamente diferentes llamadas variante celular larga (LCV) y la variante celular pequeña (SCV). La LCV es la forma intracelular metabólicamente activa de *C. burnetii*. La SCV es liberada durante la lisis de células infectadas resultando en las pseudoesporas nombradas anteriormente (Pexara *et al.*, 2018). Esta forma extracelular se encuentra en la leche, orina y heces en grandes concentraciones (10^9 ID₅₀/g) en placenta y líquido amniótico, Es resistente al calor, desecación y muchos desinfectantes comunes, manteniéndose viable por semanas a años en el ambiente (Plummer, 2015). Por ejemplo, *C. burnetti* puede vivir hasta un año en la lana, cuatro meses en el polvo y un mes en expectoraciones deshidratadas (Pexara *et al.*, 2018). Cuando se aísla de animales y humanos infectados de forma natural, o en el laboratorio, *C. burnetii* está en fase I, que es la forma altamente infecciosa. En subcultivos se produce un cambio a fase II, la cual no es infecciosa. Esta expresión antigénica diferente se emplea para distinguir serológicamente los estados agudo y crónico de la enfermedad (Fariñas & Muñoz, 2010).

En años recientes ha aumentado el número de animales que han sido reportados como reservorios de la bacteria, incluyendo mascotas, reptiles, garrapatas, roedores y aves. Sin embargo, los principales reservorios de *C. burnetti* son los bovinos, ovinos y caprinos (Domenico *et al.*, 2018). Una vez que un rumiante está infectado, *C. burnetti* puede localizarse en glándula mamaria, linfonodos supra mamarios, placenta y útero, desde donde puede excretarse en subsecuentes productos del parto y lactancias (Plummer, 2015).

PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN RUMIANTES

Las infecciones con *C. burnetti* en la mayoría de los rumiantes son asintomáticas, es decir, que no presentan una infección clínica, incluyendo la ausencia de fiebre, pero pudiendo provocar abortos tardíos (Angelakis y Raoult, 2010; Plummer, 2015; Van den Brom *et al.*, 2015). No está claro si la presencia de *C. burnetti* en otros órganos, que no sea la placenta,

tenga efecto sobre la función de estos. En predios que experimentan abortos causados por *C. burnetti* se ve aumentada la incidencia de metritis y también se han reportado casos de nacimientos de animales con peso subóptimo (Van den Brom *et al.*, 2015). Las placentas infectadas pueden presentar inflamación con exudado purulento café amarillento y fibrosis de los espacios intercotiledonarios (Van dem Brom *et al.*, 2015; Angelakis y Raoult, 2010). Los abortos ocurren frecuentemente al final de la preñez, sin antecedentes de signología clínica. Los fetos abortados parecen ser normales, principalmente frescos, pero ocasionalmente autolíticos (Van den Brom *et al.*, 2015). Hay evidencia de asociación de *C. burnetii* con mastitis subclínica en vacas lecheras (Plummer, 2015).

PRESENTACIÓN DE LA ENFERMEDAD EN HUMANOS

La vía aérea es la principal ruta de infección de la Fiebre Q, siendo los fluidos del parto o material placentario las fuentes de infección más frecuentes debido a las altas cargas bacterianas que estos contienen. También se puede contagiar por contacto directo con animales infectados debido a abortos, partos, orina, heces, saliva o leche, siendo así los humanos muy susceptibles a la infección por Fiebre Q, pudiendo 10 o menos UFC de *C. burnetii* provocar una infección desde un bovino (Pexara *et al.*, 2018).

Dentro de las personas más susceptibles a contagio están los agricultores, cuidadores, médicos veterinarios y personal de mataderos. Sin embargo, se han reportado casos de personas contagiadas en comunidad que no tienen contacto con animales, debido a que la bacteria puede movilizarse por el aire pudiendo viajar grandes distancias, incluso llegando a generar brotes en la población humana (Pexara *et al.*, 2018). Un estudio de Woldehiwet (2004), evidenció un brote de Fiebre Q que afectó a más de 400 residentes de un valle en Suiza. En este caso, el brote fue atribuido a una exposición indirecta a aerosoles contaminados, generados por ovejas infectadas que viajaban regularmente por el valle.

La presentación clínica y evolución de la enfermedad dependen de diversos factores del hospedero, particularmente el estado inmunitario de los pacientes además de la vía de contagio de la infección (Fariñas y Collado, 2010).

El periodo de incubación va desde los siete a los cuarenta días y depende de la dosis del inóculo de *C. burnetii* (Pexara *et al.* 2018). La infección inicial resulta en un 50-60% de los

pacientes con un cuadro asintomático. Una presentación aguda de Fiebre Q, con sintomatología similar a la influenza (fiebre y dolor de cabeza) a veces complicada con neumonía o hepatitis, se desarrolla en un 40-50% de las infecciones. Se han reportado entre uno y cinco por ciento de pacientes que desarrollan una presentación crónica de Fiebre Q, con endocarditis e infección vascular de un aneurisma aórtico o una reconstrucción vascular central como las manifestaciones más comunes (Kampschreur *et al.*, 2013). Esta presentación crónica se manifiesta principalmente durante el primer año después de la infección, pero también se puede presentar varios años después de la infección inicial. La mortalidad ocurre en el 1 al 11% de los pacientes con presentación crónica (Hogema *et al.*, 2012). Condiciones predisponentes como una enfermedad valvular preexistente, anormalidades vasculares e inmunosupresión aumentan el riesgo de endocarditis (Karakousis & Trucksis, 2006).

CONTEXTO INTERNACIONAL RESPECTO A LA BACTERIA

La Fiebre Q se ha presentado como un problema a nivel mundial, con brotes reemergentes a través de todo el mundo. Posterior a la Segunda Guerra Mundial, una alta prevalencia de Fiebre Q se observó en la población europea y norteamericana asociado a un alto consumo de productos lácteos sin pasteurizar. Trescientos casos de Fiebre Q en Los Ángeles, EE. UU. fueron relacionados con consumo de leche cruda y un total de 1117 casos fueron reportados en un estudio epidemiológico en Reino Unido entre 1984-1994 (Pebody *et al.*, 1996). En Francia se presentó un brote de 61 casos entre pacientes y empleados de una institución psiquiátrica por consumo de alimentos contaminados (Pexara *et al.*, 2018). El año 2007, un brote de Fiebre Q se presentó en los Países Bajos y considerado como uno de los más largos brotes reportados en la literatura (Van Asseldonk *et al.*, 2015).

SITUACION REGIONES DE LOS RIOS Y LOS LAGOS

La situación zoonótica de Fiebre Q en Chile es incierta ya que estudios epidemiológicos no han sido publicados. La Organización Mundial para la Salud Animal (OIE) lista a Chile entre los países que reportan Fiebre Q en animales, basándose en los resultados serológicos en 5 de 98 ovejas asintomáticas en la Región de Los Lagos en el sur de Chile en 2006 (Weitzel *et al.*, 2016).

Según resultados del último censo, en la Región de Los Ríos existe una población total de 384.837 personas, siendo un 71,7% de área urbana y una 28,3% de área rural. En la Región

de Los Lagos existe una población total de 828.708, de la cual un 73,6% reside en área urbana y un 26,4% en área rural (INE, 2017). Y según el censo del INE (2007) existen en la Región de Los Lagos un total de 1.047.194 cabezas de bovinos, 315.198 cabezas de ovinos y 11.134 cabezas de caprinos; mientras que en la Región de Los Ríos existen un total de 621.598 cabezas de bovinos, 116.149 cabezas de ovinos y 9.328 cabezas caprinos, estando ambas regiones dentro de las principales zonas productivas de bovinos del país.

A mediados de julio de 2017 en la provincia de Osorno, región de Los Lagos, se detectó un brote que afectó a trabajadores de una lechería de la zona, a algunos familiares y a trabajadores de la salud que atendieron los casos. El primer afectado fue un hombre de 32 años trabajador de la lechería. A febrero de 2019, se registraban 346 casos ingresados a vigilancia de Fiebre Q (MINSAL, 2019), de los cuáles:

- 134 casos (39% del total) se encontraban confirmados.
- 45 casos (13% del total) se encontraban pendientes los resultados de laboratorio.
- 167 casos (48% del total) se encontraban descartados a la fecha.

DETECCIÓN DE LA BACTERIA

El diagnóstico de rutina de la Fiebre Q usualmente está basado en la detección de anticuerpos específicos con test de fijación del complemento, inmunofluorescencia y enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). El aislamiento de *C. burnetti* es riesgoso, dificultoso, lento y, además, requiere laboratorios con bioseguridad nivel 3 debido a la naturaleza zoonótica del microorganismo (Parisi *et al.*, 2006). Sin embargo, dado que pueden presentarse reacciones cruzadas con otros géneros tales como *Bartonella*, *Rickettsia* y *Legionella*, se recomienda emplear técnicas diagnósticas combinadas donde se acompañen los estudios serológicos con pruebas de otro tipo (Álvarez *et al.*, 2020). Actualmente, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta útil para la detección de *Coxiella burnetti* en muestras biológicas ya que es más sencillo de realizar y más seguro para el personal de laboratorio. Un ensayo de PCR con partidores basados en elementos repetitivos similares a transposones (TRANS-PCR) ha probado ser altamente

especifico y sensible para el diagnóstico de laboratorio de infecciones de *Coxiella burnetti*, ya que permite detectar muy pocas copias de una secuencia de DNA específica (Kirkan *et al.*, 2008; Parisi *et al.*, 2006). Incluso la PCR convencional anidada ha exhibido mayor sensibilidad, presentando las ventajas del TRANS-PCR mientras minimiza los riesgos que es la contaminación de este último (Parisi *et al.*, 2006). Se ocupa principalmente el transposón del elemento de la secuencia de inserción (IS por sus siglas en inglés) del gen IS1111, el cual funciona como buen marcador al ser de los genes que se encuentra con mayor cantidad, 20 copias, dentro del genoma de *Coxiella burnetti* (Klee *et al.*, 2006).

Considerando lo anteriormente expuesto, el presente estudio intenta aportar datos a partir de una técnica distinta a las corrientemente utilizadas ya que es de los primeros estudios en Chile que intenta aislar y caracterizar a *C. burnetti* a través de muestras de sangre proveniente de bovinos en predios de pequeños productores del sur de Chile.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar y caracterizar la presencia de *Coxiella burnetii* en bovinos de pequeños productores de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar la presencia de *C. burnetii* en muestras de sangre de bovinos proveniente de predios de pequeños productores de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos.
2. Confirmar y caracterizar genéticamente las cepas de *C. burnetii* identificadas en bovinos de pequeños productores de las Regiones de Los Ríos y de Los Lagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Encuesta y toma de muestra

Para el estudio se obtuvieron muestras de sangre de bovinos provenientes de 9 predios de pequeños productores de las Regiones de Los Ríos y 2 predios de la región de Los Lagos, (Anexo 1), los cuales fueron seleccionados por conveniencia dentro del marco de las prácticas profesionales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en el mes de enero del 2018.

En la misma visita a cada predio se realizó la extracción de sangre a los bovinos, ocupando el protocolo de arreo, manejo y toma de muestra de la Universidad Of British Columbia (2020), en donde se arrean a los animales con un mínimo de dos operarios y con el equipamiento correspondiente, creando un camino libre que puedan seguir hacia los bretes donde están los dispositivos de sujeción de cabeza para realizar la toma de muestra. Se les extrajo 6 mL de sangre de la vena coccígea a los bovinos con una jeringa de 10 mL CRANBERRY®, traspasando 4 mL a un tubo sin anticoagulante IMPROVE® y siendo registrado y rotulado con la fecha de extracción, el número de registro y el predio de donde se obtuvo (Anexo 2).

Las muestras fueron almacenadas en una nevera con hielo artificial refrigerante mientras se transportan al Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile (UACH) donde fueron mantenidas a -20°C hasta que se realizaron las extracciones de DNA. En total fueron recolectadas 78 muestras provenientes de los 11 predios seleccionados. El laboratorio cuenta con un nivel de bioseguridad apto según se muestra en el certificado (Anexo 3) que según se detalla en el escrito de Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos, requiere un nivel 3.

Todos los productores debieron firmar una hoja de consentimiento dando cuenta que se les informa del proceso de toma de muestra y la utilización de éstas con fines de investigación. (Anexo 4)

Extracción de DNA

Las muestras congeladas de sangre sumado a un control positivo que fue una muestra proveniente de Alemania de una vaca positiva a Fiebre Q y un control negativo que fue agua destilada, fueron descongeladas a temperatura ambiente para luego realizar la extracción de DNA usando el E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit, según instrucciones del fabricante, para obtener 100 microlitros de DNA purificado.

PCR convencional (c) anidada

Las 78 muestras más los controles fueron sometidas a PCR anidada para amplificar una región de 203 pares de bases (bp) del gen IS1111 de *C. burnetti*. La primera amplificación marcara una región de 687 bp del gen. La mezcla de la reacción estuvo compuesta de 5µL de Gotaq® Green Master Mix, 0,5µL de cada partidador externo (Trans 1 y Trans 2), 2µL de agua libre de nucleasas y 2µL de muestra, sumando un volumen total de 10µL. El protocolo térmico fue: 37° C por 10 min., 94° C por 10 min., 40 ciclos de 94° C por 30 seg., 62° C por 30 seg. y 72°C por 1 min., finalmente una extensión de 72° C por 5 min. Posteriormente se realizó la segunda PCR para marcar la región de 203 bp del gen IS1111. La mezcla de la reacción estuvo compuesta de 5µL de Gotaq® Green Master Mix, 0,5 µL de cada partidador interno (261 F y 463 R), 2µL de agua libre de nucleasas y 2µL de muestra, formando un volumen total de 10µL. El protocolo térmico fue: 37° C por 10 min., 94° C por 10 min., 35 ciclos de 94° C por 30 seg., 47,7° C por 30 seg., 61° C por 30 seg. y 72° C por 1 min., finalmente una extensión de 72° C por 5 min (Parisi *et al.*, 2006).

Tabla 1. Resumen de información de los partidores usados en PCR

Partidor	Gen objetivo	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (bp)
-----------------	---------------------	------------------------	---------------------------------

Trans 1	IS1111 <i>Coxiella</i>	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	687
Trans 2	<i>burnetti</i>	CCCAACAACACCTCCTTATTC	
261 F	IS1111 <i>Coxiella</i>	GAGCGAACCATTGGTATCG	203
463 R	<i>burnetti</i>	CTTTAACAGCGCTTGAACGT	

Electroforesis

Los productos del PCR fueron separados por electroforesis en gel agarosa al 2% (LE Agarose Seakem®) teñido con tinte SYBR® Safe DNA (Thermo Scientific®) a 90 V por 30 minutos. Se utilizó un marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (MAESTROGEN®) que permite identificar fragmentos de DNA desde los 100bp hasta los 1500bp. Posteriormente los geles fueron puestos en un Transiluminador UV BIOBASE ©. La lectura se consideró como positiva cuando la muestra presentó el mismo peso molecular que el control positivo.

Secuenciación

Los productos positivos de la electroforesis de *C. burnetti* fueron purificados con el producto comercial *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit*® siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente fueron enviadas al Laboratorio AUSTRAL-omics para su secuenciación, luego la secuencia resultante fue analizada en BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool), un programa informático de alineamiento de secuencias, de DNA, RNA o de proteínas, para confirmar comparativamente con la base de datos la presencia del gen IS1111.

Bioseguridad

Las medidas de bioseguridad ocupadas para la obtención de muestras de sangre fueron la utilización de overol, botas de goma y guantes de nitrilo desechables. La extracción de DNA se realizó en una primera habitación en un gabinete de bioseguridad con delantal manga larga y guantes de nitrilo. Posteriormente el PCR se realizó en una habitación con una cabina PCR de flujo laminar vertical donde se utilizó cubre calzado, delantal manga larga y guantes de nitrilo. La tercera etapa, de electroforesis, se realizó en un habitación distinta a las anteriores donde se trabajó con delantal manga larga, mascarilla y guantes de nitrilo. Por último, la

etapa de purificación del gel de electroforesis fue realizada en una cuarta habitación, ocupándose también guantes de nitrilo y delantal manga larga.

RESULTADOS

De las 78 muestras recolectadas, 7 muestras (8,9%) resultaron positivas a *C. burnetti* mediante PCR presentando el mismo peso molecular que el control positivo (Anexo 5). De ellas, 3 muestras provenían de la Región de Los Lagos y las 4 restantes de la Región de Los Ríos. Para la caracterización se realizaron secuenciaciones genéticas de las siete muestras positivas, de las cuales seis presentaron cantidades de pares de bases menor a 200 pb, lo cual se considera insuficientes para presentar algún tipo de concordancia con las secuencias comparativas de BLAST ®. La última muestra pese a que presenta un Query de 97%, tiene una identidad de 77,64% siendo no muy confiable para poder confirmar y caracterizar genéticamente la cepa de *Coxiella burnetti* (Anexo 6).

DISCUSIÓN

En este estudio se recolectaron 78 muestras de sangre bovina en enero de 2018 con el fin de aislar e identificar *Coxiella burnetti*. De los resultados obtenidos se encontraron 7 muestras positivas para *C. burnetti* mediante PCR, dando cuenta de la presencia de la bacteria en ambas regiones estudiadas, coincidiendo estos hallazgos con el reporte del MINSAL respecto al brote ocurrido en 2017. Además, se evidenció que de los 11 predios de donde se tomaron las muestras, 5 presentaron animales positivos, de los cuales, 2 tuvieron más de 1 muestra positiva. No se encontró ningún patrón específico de distribución espacial en los predios positivos (Anexo 7), lo que podría indicar que la bacteria se encuentra ampliamente diseminada como se ha reportado por parte de Weitzel *et al* en su estudio del 2016 y sumado a los últimos hallazgos encontrados por Cornejo *et al.* (2020).

Relacionado al tipo de muestra que se obtuvo, pese a que fueron de sangre por la facilidad de obtenerlas independiente del momento productivo en que se encontraban las vacas, hubiese sido más conveniente realizar PCR en muestras de leche. Mohammed *et al.* (2014) y Rabaza *et al.* (2021) sostienen que la detección de DNA de *C. burnetti* debe realizarse en leche ya que esta es la principal vía de transmisión, pudiendo ser excretada hasta por 13 meses. Según Rabaza *et al.* (2021) han sido identificados 2 patrones de diseminación en bovinos de leche, siendo estos diseminadores persistentes o diseminadores esporádicos. Basándose en estos patrones de diseminación heterogéneos, la recolección de muestras compuestas, como las del estanque de leche, constituyen una fuente útil y de fácil acceso de recolección, sumándose a lo que señala Mohammed *et al.*, 2014, donde el uso de un muestreo repetitivo puede reducir la probabilidad de identificar erróneamente rebaños como negativos a fiebre Q.

En discusión estaría si es que la glándula mamaria, que es de las principales zonas de reserva de la bacteria, excreta constantemente durante todo el periodo de lactancia como afirma Cooper *et al.* (2011) o si es una excreción intermitente como afirma Rabaza *et al.* (2021) al igual que la sangre, donde la bacteremia es a menudo transitoria en los animales (Cooper *et al.*, 2011) y el PCR solo la comienza a detectar en sangre 2 semanas post transmisión (Blut *et al.* 2013) generando que la detección de *C. burnetti* en sangre dependa significativamente del momento de muestreo (Mohammed *et al.* 2014). Los resultados negativos en PCR pueden producirse en infecciones crónicas o incluso en las 2 primeras semanas luego del inicio de la

enfermedad aguda, debido a niveles indetectables de la infección o ausencia de bacteremia (Sykes & Norris, 2013). Por otro lado, la muestra de sangre sería una muy buena opción para detectar en terneros y toros en predios que los mantienen en cercanía o con las vacas, 2 semanas post pariciones (o abortos), ya que este es el momento donde aumenta en gran medida la posibilidad de contagio por aumento de la bacteria. Lo anterior es de importancia, pues si bien el total de muestras positivas de este estudio fueron provenientes de hembras, no se debe descartar que machos puedan ser portadores, especialmente en el caso de pequeños productores que aún mantienen machos como reproductores, a diferencia de grandes lecherías que utilizan técnicas de inseminación artificial. De igual manera cabe señalar que se ha encontrado la presencia de la bacteria en pajuelas de semen tales como indican Kruszezwska *et al* en su estudio de 1997 en la aislación de *C. burnetti* desde semen de toro fresco y en muestras de semen congelado para inseminación artificial que encontró Yatsentyuk *et al* el 2019.

Respecto al uso del trans-PCR y uno anidado, el PCR anidado puede mejorar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas al tiempo que ofrece un tamaño de amplicón adecuado para la secuenciación. En estudios realizados por Mares-Guia *et al.* (2018) se hicieron diluciones seriadas para probar el límite de detección, y el resultado fue una detección de 10 veces el DNA de *C. burnetti* con cebadores internos en el PCR anidado en comparación con el trans-PCR.

Es necesario considerar que la realización de PCR es más costosa que ELISA, por ello que la European Food Safety Authority generó un documento donde desarrolla un esquema para el monitoreo y el reporte de Fiebre Q en animales, donde uno de los puntos que considera es el costo monetario del monitoreo de la enfermedad, generando así protocolos tanto de búsqueda pasiva como de búsqueda activa, el cual sugiere realizar la búsqueda pasiva en predios con:

- 2 o más abortos en 1 mes o 3 abortos durante 1 año para predios con menos de 3 bovinos y más del 4% en 1 año en predios con más de 100 bovinos.

- En predios con abortos ocupar mucus vaginal por hisopo y/o muestras del feto abortado, al menos 1 o 2. En el caso de mucus vaginal que no sea más allá de 8 días post aborto, se realizará PCR de estas muestras. Muestras de sangre de al menos 6 vacas, que hayan abortado hace más de 15 días o de vacas que estén presentando problemas reproductivos, en este caso se trabajara con ELISA.

En cambio, se realizará una búsqueda activa de la bacteria:

- En predios sin aborto se podrá trabajar con muestreo del tanque de la leche, buscando la bacteria mediante PCR.

Se sugiere realizar esta combinación de pruebas en base a ELISA y PCR, como comenta Szymańska-Czerwińska *et al.* (2019) ya que un gran porcentaje de las muestras positivas son obtenidas del estanque de leche debido a la alta afinidad de *C. burnetti* por la glándula mamaria, y sucede que ocasionalmente los diseminadores pueden mantenerse seronegativos al diseminar el patógeno de forma intermitente o esporádica a través de la leche. Es lo mismo que confirma Astobiza *et al.* (2012) al obtener varias muestras del estanque de leche negativas a ELISA y positivas a PCR, indicando la presencia de un pequeño número de diseminadores en el rebaño que no seroconvirtieron. En otros estudios realizados, se observó que dependiendo de la prueba de ELISA utilizada (CHEKIT ®) podía ser ineficiente en detectar anticuerpos fase II. Esto es importante ya que la reactividad de la fase II ha sido asociada significativamente con la detección de *C. burnetti* mediante PCR. Los anticuerpos de fase II son esenciales para el diagnóstico serológico de Fiebre Q (Böttcher & *et al.* 2011)

Finalmente, los diseminadores mayoritariamente persistentes se mantuvieron seropositivos, esto debido a la fuerte estimulación inmune. Este descubrimiento sugiere que los testeos serológicos seriados podrían ser una herramienta confiable, previo al uso del PCR, en un esquema de control para los diseminadores persistentes (Guatteo & *et al.*, 2007).

Respecto de los resultados de las secuenciaciones, 6 de las 7 muestras positivas mediante PCR presentaron una cantidad muy variable y menor a 203 pares de bases, lo cual fue insuficiente para poder realizar un emparejamiento, solo obteniéndose una muestra que pudo ser secuenciada que presentó un tamaño mayor a 203 pares de bases, es por esto que los resultados obtenidos son poco confiables ya que al ingresar la secuencia a BLAST ® se

obtienen asociaciones con muchas secuencias que no corresponden a *C. burnetti*, esto podría deberse a una mala extracción de DNA, como explica Boesenberg-Smith *et al.* (2012) donde las habilidades de los operarios y los laboratorios para extraer eficientemente DNA puro son extremadamente crítica, aunque a menudo este factor se pasa por alto.

Otro punto para considerar es que la extracción de DNA puede no haber sido efectiva, debido a que se debe determinar de manera precisa la concentración de ácidos nucleicos de las muestras, siendo este segundo proceso de extrema importancia. Las aplicaciones posteriores a menudo tienen un objetivo específico o un intervalo de concentración de ácido nucleico que se requiere para funcionar de manera óptima. Si bien la mayoría de los sistemas de extracción automatizados garantizan que la purificación del DNA esté optimizada para la mayoría de los protocolos, existe variabilidad según tipos de muestras y otros agentes que pueden generar alteraciones. A veces, es esencial conocer la concentración exacta de una muestra de ácido nucleico, ya que ayuda a prevenir el uso de muestra innecesaria, mejorar la reproducibilidad, mejorar la amplificación de objetivos difíciles y estandarizar los protocolos posteriores, como la secuenciación. La cuantificación inexacta puede aumentar la variabilidad en los ensayos posteriores, lo que conduce a una menor confianza en los resultados. De manera similar a los requisitos para los métodos de extracción, la escalabilidad de alto rendimiento y los análisis de datos son consideraciones importantes. (Boesenberg-Smith *et al.*, 2012)

Lo anterior fue un punto crítico que se pasó por alto previo a la secuenciación de las muestras, el cual no realizamos, solo se efectuó la purificación de las muestras que resultaron positivas post electroforesis y fueron enviadas directamente a secuenciación. Una forma rápida y efectiva de cuantificar, a la cual tenía acceso el laboratorio era la espectrofotometría UV tradicional, el cual es un método de cuantificación de DNA común y simple porque no requiere el uso de una gran cantidad de muestra purificada. Según Boesenberg-Smith *et al.*, 2012 la extracción adecuada maximiza el uso de cantidades de muestra importante y proporciona el material de ácido nucleico más útil para su uso en las aplicaciones moleculares posteriores como podría haber sido la secuenciación de las muestras.

CONCLUSIÓN

A través de la investigación desarrollada en esta memoria de título se pudo identificar la presencia de *Coxiella burnetti* por medio de PCR a muestras de sangre en bovinos procedentes de predios de pequeños productores de las regiones de Los Ríos y Los Lagos.

Respecto a la discusión precedente sobre qué tipo de muestra debe ser priorizada para la detección de la bacteria podemos sostener que debe privilegiarse la muestra de leche.

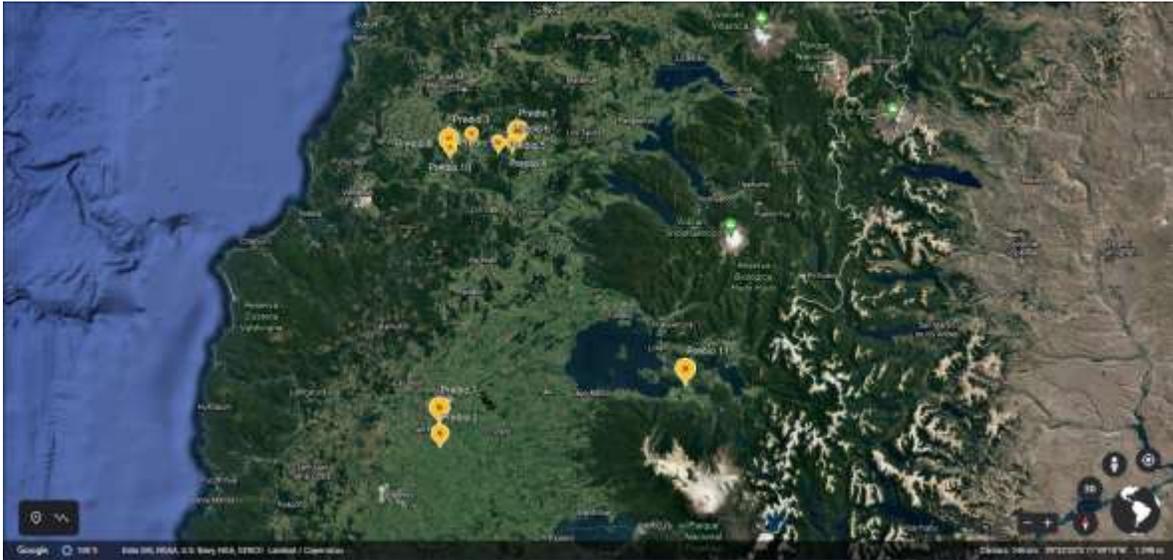
Si bien se obtuvieron resultados positivos por medio de PCR para identificar la presencia de *Coxiella burnetti*, esta no pudo ser caracterizada de manera concluyente dado errores en el procesamiento post electroforesis.

Finalmente, la intención de esta memoria de título es poder aportar con antecedentes para conocer de manera más eficiente y efectiva la distribución de *Coxiella burnetti* en nuestro país. Igualmente, busca ser parte de las bases de datos disponibles para investigaciones futuras, las que espero sean parte de programas de prevención y detección temprana del contagio entre bovinos.

En este sentido, es necesario seguir fortaleciendo el cuerpo de investigación en torno a la distribución precisa de *Coxiella burnetti*, ya que ésta sigue siendo un peligro latente para los rebaños de nuestro país y un asunto crucial de salud pública, puesto que están expuestos a su contagio tanto a operarios que trabajan con animales como a comunidades que viven en la cercanía de predios.

ANEXOS

Anexo 1. Ubicación geográfica de los predios muestreados



Anexo 2. Registro de animales muestreados, sus datos y el ID del/los tubo/s asociado/s.

Fecha		Predio			n°	
Hora		Dueño				
ID	DIIO/Crotal	Categoría	Edad	Raza	Sexo	ID Tubos
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						

Anexo 3. Informe de Bioseguridad que permite ratifica el nivel 3 de bioseguridad con el que cuenta el laboratorio.



Universidad Austral de Chile
Conocimiento y Naturaleza

N° 0026 / 19

INFORME DE BIOSEGURIDAD

El Comité Institucional de Bioseguridad de la Universidad Austral de Chile, constituido el 28 de Octubre del 2003, según Decreto N° 355 de la Universidad Austral de Chile, deja constancia de estar en proceso de revisión el Proyecto:

"Bartonella henselae in healthy and febrile naturally infected cats: Are there differences between genotypes, bacteremia and bacterial shedding?", cuyo investigador es la Dra. Ananda Muller P. del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

El proyecto se desarrollará en el Laboratorio de Patología Clínica Veterinaria del Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias en la Universidad Austral de Chile, el que deberá dar cumplimiento a lo establecido en el Manual de Normas de Bioseguridad del Comité Nacional de Biotecnología de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica y en el Manual de Procedimientos para el Manejo de Residuos de la UACH, lo que será fiscalizado por el Comité Institucional de Bioseguridad de la Universidad Austral de Chile.

Se extiende el presente documento para ser presentado a FONDECYT.

Ing. Juan Claudio Rodríguez G.
Comité Institucional de Bioseguridad

Valdivia, 13 de Mayo del 2019

Comité Institucional de Bioseguridad
Avda. Las Encinas 0220 - Campus Isla Teja - Valdivia - Chile
Fono 63 2221254 - E-mail cib@uach.cl

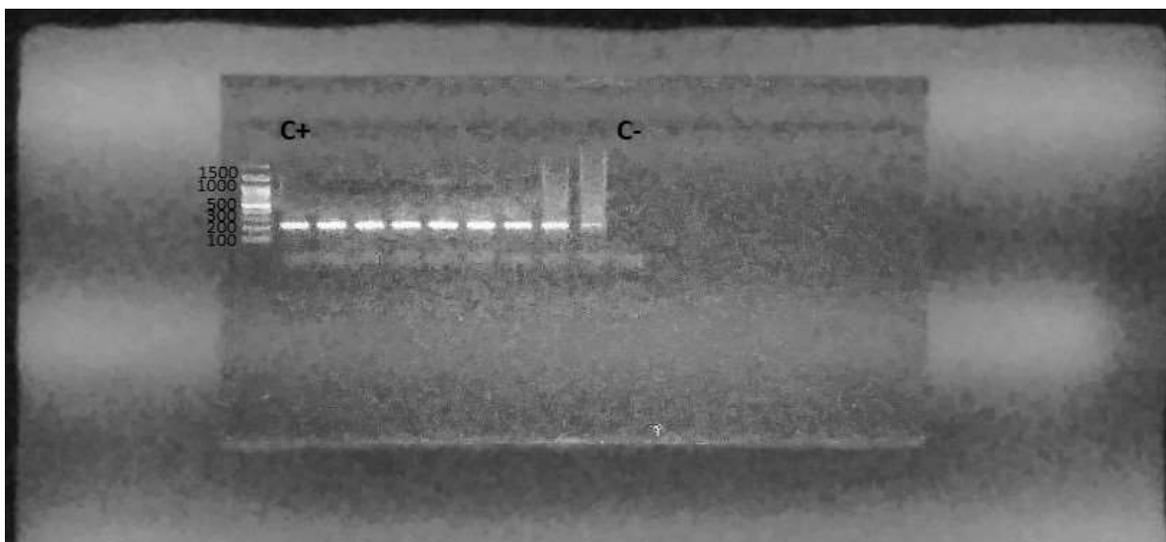
Anexo 4. Consentimiento informado que debieron firmar los productores.

Consentimiento informado

Yo,, declaro haber sido informado sobre el proceso de toma de muestras y la utilización de éstas con fines de investigación. Asimismo, consiento participar en esta investigación que busca identificar y caracterizar al agente causante de la Fiebre Q, liderado por los Drs. Ananda Müller, María José Navarrete y Luis Pablo Hervé.

Firma y RUT

Anexo 5. Fotografía de electroforesis de las muestras positivas.



BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ, A.; PARRA, M.; MONTOYA, C. 2020. Acercamiento de la situación epidemiológica de *Coxiella burnetii* en Suramérica. Trabajo de grado Microbiólogo. Santiago, Chile. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias. 12 p.

ANGELAKIS, E; RAOULT, D. 2010. Q fever. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4):297–309.

ASTOBIZA, I.; PIÑERO, A.; BARANDIKA J. F.; HURTADO, A. 2012. 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.

BATTHYANY K.; CABRERA, M.; ALSINA, L.; BERTONI, M.; MASCHERONI, P.; MOREIRA, N.; PICASSO, F.; RAMIREZ, J.; ROJO, V. 2011. Metodología de la investigación en Ciencias Sociales. Apuntes para un curso inicial. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 86p.

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. *Vet Microbiol.* 151(3-4): 291-300.

BLUT, A.; BEWERTUNG, U.; KRANKHEITSERREGER, B. 2014. *Coxiella burnetii* – Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *Transfus Med Hemother* 41:60–72.

COOPER, A.; STEPHENS, J.; KETHEESAN, N.; GOVAN, B. 2011. Detection of *Coxiella burnetii* DNA in Wildlife and Ticks in Northern Queensland, Australia.

CORNEJO, J; ARAYA, P; IBÁÑEZ, D; HORMAZABAL, J.C.; RETAMAL, P.; FRESNO, M; HERVE, L.P.; LAPIERRE, L. 2020. Identification of *Coxiella burnetii* in Tank Raw Cow Milk: First Findings from Chile. *20(3):228–230*.

DOMENICO, M. DI; CURINI, V; LOLLO, V Di; MASSIMINI, M; GIALLEONARDO, L DI; FRANCO, A; CAPRIOLI, A; BATTISTI, A; CAMMAÀ, C. 2018. Genetic diversity of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in central Italy. *BMC Veterinary Research: 8-14*.

FARIÑAS, M. T. F.; MUÑOZ, C. M. 2010. Infección por *Coxiella burnetii* (Fiebre Q). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica, 28:29–32*.

GARCÍA, J. D.; AGÜERO J.; PARRA, J.A.; SANTOS, M.F. 2010. Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. *Medicine, 10(49):3251-64*.

GONZÁLEZ, C.; MOREIRA, R. 2003. Epidemiologic study of an outbreak of Q fever in the Lo Aguirre livestock quarantine station, Agriculture and Livestock Service (Chile). 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics

GUATTEO, R.; BEAUDEAU, F.; JOLY, A.; SEEGER, H. 2007. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res. 38 (2007): 849–860*.

HOGEMA, B. M.; SLOT, E.; MOLIER, M.; SCHNEEBERGER, P. M.; HERMANS, M. H.; VAN HANNEN, E. J.; VAN DER HOEK, W.; CUIJPERS, T.; ZAAIJER, H. 2012. *Coxiella burnetii* infection among blood donors during the 2009 Q- fever outbreak in The Netherlands, *52:144–150*.

Instituto Nacional de Estadísticas. 2007. Censo Agropecuario y Forestal 2007. [en línea] <<http://www.ine.cl/estadisticas/censos/censo-agropecuario-y-forestal-2007>> [consulta: 13-06-2018]

Instituto Nacional de Estadísticas. 2017. Resultados censo 2017. [en línea]. <<https://resultados.censo2017.cl/>> [consulta: 13-06-2018].

KAMPSCHREUR, L. M., HAGENAARS, J. C. J. P., WIELDERS, C. C. H., ELSMAN, P., LESTRADE, P. J., KONING, O. H. J., OOSTERHEERT, J.J., RENDERS, N., WEVER, P. C. 2013. Screening for *Coxiella burnetii* seroprevalence in chronic Q fever high-risk groups reveals the magnitude of the Dutch Q fever outbreak. *Epidemiology and Infection*, 141(4):847–851.

KARAKOUSIS, P. C.; TRUCKSIS, M. 2006. Chronic Q fever in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:2283–2287.

KRUSZEWSKA, D.; TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, S. 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science* 62:299-300.

MARES-GUIA, M. M.; GUTERRES, A.; ROZENTAL, T.; FERREIRA M. DOS S.; LEMOS, E. 2018. Clinical and epidemiological use of nested PCR targeting the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene from *Coxiella burnetii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1):138–143.

MINSAL. 2017. Informe brote Fiebre Q en Provincia de Osorno y medidas de vigilancia y tratamiento. <en línea http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/10/Ord-FiebreQ-Oct.2017_fin4.pdf > [consulta: 10-01-2019].

MINSAL. 2019. Actualización reporte breve – Brote Fiebre Q – Provincia de Osorno, Región de los Lagos. [en línea]. <<http://epi.minsal.cl/wp->

[content/uploads/2019/02/Minuta_brote_fiebre_Q12022019.pdf](#) > [consulta: 15-03-2019].

MOHAMMED, O.; JARELNABI, A.; ALJUMAAH, R.; ALSHAIKH, M.; BAKHIET, A.; OMER, S.; ALAGAILI, A.; HUSSEIN, M. 2014. *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever in Saudi Arabia: molecular detection from camel and other domestic livestock. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7(9):715–719.

PARISI, A.; FRACCALVIERI, R.; CAFIERO, M.; MICCOLUPO, A.; PALADINO, I.; MONTAGNA, C.; CAPUANO, F.; SOTTILI, R. 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR, *Veterinary Microbiology*. 118(1–2): 101–106.

PEBODY, R.; WALL, P.; RYAN, M.; FAIRLEY, C. 1996. Epidemiological features of *Coxiella burnetii* infection in England and Wales: 1984 to 1994. *PubMed* 6(9): 28-32.

PEXARA, A., SOLOMANKOS, N., GOVARIS, A. 2018. Q fever and prevalence of *Coxiella burnetii* in milk. *Trends in Food Science and Technology*. 71:65–72.

PLUMMER, P. 2015. Overview of Coxiellosis. [en línea] <<https://www.msdrvmanual.com/generalized-conditions/coxiellosis/overview-of-coxiellosis> > [consulta: 20-02-2018]

ROEST, H. I. J., TILBURG, J. J. H. C., VAN DER HOEK, W., VELLEMA, P., VAN ZIJDERVELD, F. G., KLAASSEN, C. H. W., RAOULT, D. 2011. The Q fever epidemic in the Netherlands: History, onset, response and reflection. *Epidemiology and Infection*, 139(1):1–12.

SYKES, J.; NORRIS, J. 2013. Coxiellosis and Q Fever. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Inc. 320-325.

SZYMANSKA-CZERWINSKAA, M; JODELKOA, A; NIEMCZUKA, K. 2019. Occurrence of *Coxiella burnetii* in Polish dairy cattle herds based on serological and PCR tests. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 67(2019): 101377

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA. 2020. Standard operating procedures [en linea]. <<https://dairycentre.landfood.ubc.ca/operations/standard-operating-procedures>> [consulta: 15-03-2021]

VAN ASSELDONK, M. A. P. M.; BONTJE, D. M.; BACKER, J. A.; VAN ROERMUND, H. J. W.; BERGEVOET, R. H. M. 2015. Economic aspects of Q fever control in dairy goats. *Prev. Vet. Med.* 121(1–2):115–122.

VAN DEN BROM, R. VAN ENGELEN, E; ROEST, H. I. J; VAN DER HOEK, W; VELLEMA, P. 2015. *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: An opinionated review, *PLoS ONE.* 181(1–2):119–129.

VANDERBUG, S., RUBACH, M. P., HALLIDAY, J. E. B., CLEVELAND, S., REDDY, E. A., CRUMP, J. A. 2014. Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A One Health Systematic Review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4).

WEITZEL, T.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; EDOUARD, S.; PAROLA, P.; ABARCA, K. 2016. Absence of convincing evidence of *Coxiella burnetii* infection in Chile: A cross-sectional serosurvey among healthy adults in four different regions, *BMC Infect. Dis.* 16(1):1–6.

WOLDEHIWET, Z. 2004. Q fever (coxiellosis): Epidemiology and pathogenesis. *Research in Veterinary Science.* 77(2):93-110.

YATSENTYUK, S.; LAZAREVA, E.; GORBACHEVA, N.; KRASNIKOVA, M.; KOZLOVA, A. 2019. PCR detection of *Coxiella burnetii* from bull semen samples used for

artificial insemination. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.
92:293-295.