

Abortos por *Coxiella Burnetti* en el Ganado Ovino y Caprino

FUENTE: cuencarural.com (29-05-2005)

AUTOR: VILLA ESPINOSA, A.; FERNADEZ ROS, A.B.; GRACIA CURRAS, E.

Presentado en el Congreso de la SEOC, Septiembre 2002.

Coxiella burnetii es el agente etiológico de la fiebre Q, una zoonosis de amplia distribución mundial. Es una gamma proteo bacteria única en su género que posee dos fases antigénicas, mas de 40 reservorios en la naturaleza y una gran importancia económica y sanitaria.

Resumen

Coxiella burnetii es el agente etiológico de la fiebre Q, una zoonosis de amplia distribución mundial. Es una gamma proteo bacteria única en su género que posee dos fases antigénicas, mas de 40 reservorios en la naturaleza y una gran importancia económica y sanitaria. En el presente trabajo se presentan los resultados de la detección de las fases I y II de *Coxiella burnetii* en 362 exudados endocervicales y 194 placentas de fetos ovinos y caprinos abortados, aplicando anticuerpos monoclonales. También se discute la utilización del antígeno de fase II para evaluar la respuesta serológica y detectar a los animales portadores como elemento clave del control epidemiológico.

Coxiella burnetii se diagnosticó en 36 casos de abortos ovinos de 444 estudiados y en 12 de 112 caprinos. El antígeno se encontró en vacuolas intracitoplasmáticas de neutrófilos, trofoblastos y macrófagos. Las placentas ovinas exhibían gran cantidad de células positivas con una fuerte tinción.

Los animales serológicamente positivos se discriminaron con títulos de anticuerpos de fase I y II superiores a 1:80. Entre los 175 sueros estudiados, de rebaños con y sin diagnóstico de aborto por *Coxiella*, se encontraron 35 sueros positivos (20%).

Palabras clave: Aborto, *Coxiella burnetii*, anticuerpos monoclonales.

Introducción

Coxiella burnetii es el agente etiológico de la Fiebre Q, una enfermedad infecciosa y una zoonosis de amplia distribución mundial; se trata de una enfermedad febril que afecta a los humanos y a varias especies de animales. En el ganado bovino, ovino y caprino provoca abortos. (OIE, 1992).

El género *Coxiella* pertenece a la subdivisión gamma de las Protobacterias junto al género *Legionella*, *Francisella* y *Rickettsiella*, donde ha sido clasificada de acuerdo al análisis secuencial del 16S rRNA (Weisburg et al, 1989; Stein et al, 1993). Es una bacteria de vida intracelular obligada y pared celular similar a las bacterias Gram negativas. Las células diana de su multiplicación in vivo son los monocitos, macrófagos y las células endoteliales vasculares, estas bacterias invaden y penetran en la célula huésped utilizando como receptores específicos las integrinas, y se internalizan en fagolisosomas formando una gran y única vacuola citoplasmática.

Los reservorios de *C. burnetii* en la naturaleza incluyen una gran variedad de aves, mamíferos domésticos y salvajes (gatos, perros, conejos, cerdos, caballos, camellos, búfalos de agua, ratas y ratones) y mas de 40 especies de artrópodos que están naturalmente infectados, y entre los que se encuentran: *Amblyomma* sp, *Dermacentor* sp, *Haemophysalis* sp, *Myalomma* sp, *Ixodes* sp, *Ornithodoru* sp, *Rhipicephalu* sp, *Otobius*, entre otros. (Scanlan, 1991; Maurin y Raoult, 1999). El rol de los artrópodos en el ciclo natural de *C. burnetii* es aún desconocido.

C. burnetii es la única especie del género. Esta bacteria posee variaciones antigénicas fásicas debido a variaciones mutacionales de los carbohidratos que conforman el LPS, similar a las enterobacteriaceae. Esta variabilidad es un factor de virulencia y comportan dos fases antigénicas de la enfermedad, denominadas fase I y II (Maurin y Raoult, 1999). La fase I es altamente infecciosa, y es la fase natural encontrada en los animales, humanos y artrópodos infectados. La fase II no es muy infecciosa y procede de cepas obtenidas en laboratorios después de varios pases en cultivos de tejido o huevos embrionados.

La bacteria puede ser aislada de sangre, pulmones, bazo, hígado, tracto genital, los tejidos de los fetos abortados y la placenta en la fase aguda de la infección (Moeller, 2001). Los síntomas de la infección crónica en los animales, son el aborto y el bajo peso de las crías al nacimiento. El sitio de localización de las infecciones crónicas son el útero y las glándulas mamarias. Los animales crónicamente infectados eliminan las bacterias por heces, orina, tracto genital y la

leche (Berry et al, 2000; 2001). *C. burnetii* también induce infecciones persistentes asintomáticas en humanos y animales, pero cuando ocurre la gestación, la infección se hace invasiva en la placenta, provocando contingencias repentinas de abortos. La vía transplacentaria de transmisión provoca la infección congénita. (Stein y Raoult, 1998). El objetivo de este trabajo es abordar la detección directa de las fases I y II de *Coxiella burnetii* en exudados endocervicales y placentas de fetos ovino y caprinos abortados, aplicando anticuerpos monoclonales y la serología para la confirmación diagnóstica y la detección de los animales portadores.

Material y métodos

Entre los años 1999 y 2001 se recibieron en el laboratorio 444 casos de abortos ovinos y 112 de abortos caprinos para estudios de *C. burnetii*. Las muestras remitidas consistían en exudados endocervicales recogidos en hisopos estériles de animales recién abortados, placentas fetales (294 hisopos y 150 placentas ovinas), (68 hisopos y 44 placentas caprinas) y 175 sueros de animales abortados y otros asintomáticos dentro de los rebaños comprometidos. Los tejidos de las placentas fueron disgregados y estandarizados con el sistema automatizado Medimachine - Medicon de 50 µm (Becton Dickinson 340588- 340592), en cabina de flujo laminar. Las células obtenidas de los hisopos y placentas se lavaron dos veces con PBS 0,01M mediante centrifugación, fijándose en láminas porta objeto multi esferas a razón de 10⁶ células / ml con acetona a -20° C, con tratamiento posterior de 3 minutos con H₂O₂ al 3% seguido de lavados con PBS-NP 40. Para la demostración específica de los antígenos en las células fueron empleados los anticuerpos monoclonales anti *C. burnetii*, clones CB1-B2 (del Profesor Raoult, Director de la Unidad de Rickettsia de la Facultad de medicina en Marsella, Francia), en dilución 1:100 con incubación de 60 minutos a 37° C. Para completar el sándwich se aplicó el conjugado anti IgG de ratón Fab específico marcado con peróxidasa (Sigma A-2304), durante 60 min a 37° C. La reacción fue revelada con AEC-DMF (Sigma A-6926 / D-4254), con contraste de Hematoxilina de Mayer.

La evaluación de los anticuerpos específicos contra *C. burnetii* se realizó frente a antígenos de fase II obtenido en células Vero y fijadas sobre láminas porta objetos (BioMérieux 75 921). Los sueros de ovinos y caprinos procedentes de animales abortados con diagnóstico confirmado de *C. burnetii* (categoría I) y de los clínicamente sanos (categoría II), fueron estudiados en diluciones de 1:80, aplicando el método indirecto de inmunoperóxidasa, con un conjugado monoclonal anti IgG ovino-caprino marcado con peróxidasa (Sigma A-9452) con sustrato AEC-DMF y el contraste de Hematoxilina de Mayer. En todas las pruebas se incluyeron controles negativos y positivos.

Resultado y discusión

C. burnetii se diagnosticó en 36 de los 444 casos de abortos ovinos (8,1%) y en 12 de los 112 abortos caprinos (10,7%; tabla 1)

La incorporación de los anticuerpos monoclonales al diagnóstico de *C. burnetii* garantizó la especificidad de la detección. Cuando el estudio se realiza sólo con la tinción de Stamp, se pueden confundir con *Chlamydia* sp y *Brucella* sp, dos entidades de obligatoria inclusión en el diagnóstico diferencial cuando no se emplean anticuerpos específicos o no se contrastan los resultados con la serología. (OIE, 1992).

Los trabajos de Moeller (2001) aseguran que *Chlamydia psittaci* y *C. burnetii* constituyen el 23% de todos los abortos caprinos en California.

Los abortos ovinos y caprinos por *C. burnetii* están asociados con abundante acumulación de antígenos, sobre todo en las placentas, que generalmente no presentan lesiones macroscópicas aparentes, aunque en ocasiones se pueden observar severas placentitis purulentas necrotizantes. (Van Moll et al, 1993).

Los anticuerpos monoclonales clones CB1-B2 reaccionan con el LPS de *C. burnetii* en fase I y II ya sean cuadros agudos o crónicos (Dilbeck y McElwain, 1994; Yu y Raoult, 1994). Nosotros detectamos gran cantidad de células positivas con fuerte tinción en las placentas y cantidades variables en las muestras de exudados, el antígeno de *Coxiella* fue localizado en vacuolas intracitoplasmáticas de trofoblastos y macrófagos

Las placentas infectadas poseen mas de 10⁹ bacterias / gramo, que permanecen viables durante largos períodos de tiempo contaminando las áreas donde los animales infectados han estado presentes con supervivencias reportadas de un año o más (McDADES, 1991; Van Moll et al, 1993) porque *C. burnetii* posee un alto grado de resistencia a los agentes físicos y químicos similar al de las bacterias esporuladas de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*.

La vía sanguínea y la vía digestiva son epidemiológicamente importante para los programas de control. Las garrapatas infectadas eliminan *C. burnetii* en sus heces y transmiten la infección al

picar a los animales susceptibles, pero la transmisión de *C. burnetii* entre los animales domésticos y el hombre no depende de los artrópodos. La vía digestiva resulta principalmente de la ingestión de calostros y leche de animales infectados (Durand, 1993), restos de placentas, roedores infectados, o el consumo de huevos de aves contaminados.

Los resultados serológicos en nuestro estudio arrojó un total de 20% de reactores positivos, 35 sueros entre los 175 evaluados. En la tabla N° 2 se presentan las dos categorías en las que se agruparon los mismos y los resultados por especie y reactividad frente al antígeno de fase II de *C. burnetii*.

En nuestros resultados 2 ovejas y 3 cabras con detección positiva de antígeno eran seronegativas (títulos inferiores a 1:80) y 2 cabras y 3 ovejas asintomáticas eran seropositivas. En el primer caso hubiera sido necesario determinar las IgM y en el segundo caso el estado de portador. Los trabajos de Berry et al (2001) plantean la relación entre los hallazgos de *C. burnetii* en muestras de exudados vaginales con PCR, los signos clínicos y la respuesta serológica con el ELISA y la IFI, ellos encontraron un 44% de positivos con el PCR, de los cuales solo el 24 -32% eran reactores positivos.

Los estudios epidemiológicos indican que la fiebre Q tiene que ser considerada un problema de salud pública en España (Téllez et al, 1988; Palau et al, 1989; Ruiz-Beltrán et al, 1990; Nebreda et al, 2001). La fiebre Q se ubica entre las enfermedades ocupacionales de trabajadores vinculados con los animales domésticos y el personal de laboratorio y existen casos esporádicos en personas de áreas urbanas después del contacto con el ganado, principalmente los ruminantes donde la infección según confirmamos en este trabajo, se mantiene prevalente aunque raramente se incluya en las analíticas solicitadas.

Tabla 1 Detección de *C. burnetii* en muestras de animales abortados

Especies	Muestras estudiadas		Muestras positivas		% Muestras positivas
	hisopos	placentas	hisopo	placentas	
					10,7
Cabras	68	44	11	1	8,1
Ovejas	294	150	28	8	
Totales	362	194	39	9	8,63

Tabla 2 Estudio serológico de *C. burnetii* en animales abortados y asintomáticos

Especie	Sueros estudiados	Categoría I: 35 sueros de an. abortados y <i>C. burnetii</i> detectada		Categoría II: 140 sueros de an. asintomáticos		reactores positivos
		Serología positiva	Serología negativa	Serología positiva	Serología negativa	
Cabras	40	9	3	2	26	11 / 40
Ovejas	135	21	2	3	109	24 / 135,
totales	175	30	5	5	135	35 / 175
		85,71%	14,28%	3,57%	96,42%	20%