

Diagnosi e controllo della Febbre Q negli allevamenti bovini

> LINEE GUIDA

LG in VET4





LGINVET - Collana a cura di

GADDO VICENZONI

Direttore

Dipartimento di patologia animale e sanità pubblica

SCT1 Verona e Vicenza

Testo redatto da

ANTONIO BARBERIO

Dirigente veterinario

SCT1 Verona e Vicenza

Laboratorio diagnostica clinica Vicenza

Responsabile Gaddo Vicenzoni

ALDA NATALE

Direttore *ad interim*

SCT3 Padova e Adria

Diagnostica in sanità animale

Layout e impaginazione

SCS7 Comunicazione e conoscenza per la salute

Laboratorio comunicazione della scienza

Responsabile Licia Ravarotto

Foto

ARCHIVIO IZSVe

Nonostante l'attenzione dedicata alla stesura della pubblicazione e i controlli effettuati sulle immagini e sui contenuti, qualche errore potrebbe essere sfuggito alle nostre verifiche. Ce ne scusiamo con i lettori e li invitiamo a trasmetterci eventuali osservazioni.

1ª edizione: agosto 2017

Copyright © 2017 by Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Riproduzione vietata ai sensi di legge (art. 171 della legge 22 aprile 1941, n° 633)

Pubblicazione non in vendita

I lettori che desiderano informazioni e aggiornamenti sulle attività dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie possono visitare il sito web www.izsvenezie.it

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Diagnosi e controllo della Febbre Q negli allevamenti bovini

> LINEE GUIDA LG *in* VET4

Antonio Barberio* - Alda Natale*

ENTI PROMOTORI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

REFEREE

Marco Martini
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS)
Università di Padova

Marcella Mori
Department of Genitopathology Veterinary and Agrochemical Research Center
Bruxelles

Si ringraziano il prof. Marco Martini e la dott.ssa Marcella Mori per il tempo e l'impegno profusi nel lavoro di revisione delle presenti Linee guida

PRESENTAZIONE

La Febbre Q è stata descritta per la prima volta nel 1935 in Australia in un gruppo di macellatori che presentavano una sindrome febbrile sconosciuta, da cui il nome Q Fever, che sta per "query fever" (febbre sconosciuta). In realtà l'infezione era già presente in Europa e nel continente americano, tant'è che due ricercatori americani, Davis and Cox, nel 1938, rilevarono la comparsa di febbre e splenomegalia in delle cavie infettate in laboratorio con alcune zecche raccolte in prossimità del Nine Mile Creek, nel Montana (USA).

In seguito i due gruppi di ricercatori, americani ed australiani, scambiandosi informazioni e materiale patologico, dimostrarono che l'agente causale della "Query fever" australiana e della "Nine Mile fever" era lo stesso microrganismo, che venne denominato *Coxiella burnetii* in onore dei due ricercatori che avevano contribuito alla sua scoperta, l'australiano Burnett e l'americano Cox. La presenza dell'infezione in Europa venne rilevata durante la seconda guerra mondiale, quando fra il 1944 ed il 1945 diversi focolai della malattia colpirono le truppe alleate di stanza in Italia ed in Grecia. Lo studio di questa malattia ebbe grande impulso nel dopoguerra nell'Europa mediterranea per la diffusione dell'infezione negli animali domestici e per i numerosi casi di malattia registrati nell'uomo. Successivamente il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie degli allevamenti e la riduzione della popolazione rurale hanno determinato una forte riduzione dei casi di Febbre Q nell'uomo ed un minore interesse nei confronti di questa malattia sia negli animali che nell'uomo, anche se in realtà i radicali cambiamenti subiti dall'allevamento bovino a partire dagli anni 80 hanno determinato una maggiore diffusione dell'infezione in tutti i paesi a zootecnia avanzata. Un nuovo interesse per lo studio della Febbre Q è stato generato dalla ricomparsa di gravi focolai della malattia nell'uomo occorsi negli ultimi anni, in particolare va menzionato il caso olandese con più di 4.000 persone colpite dalla malattia. L'applicazione di nuove tecniche di laboratorio, in particolare di sofisticate metodologie biomolecolari ha consentito in pochi anni di accrescere notevolmente le conoscenze riguardo a questa malattia, sia dal punto di vista eziopatogenetico, che per le misure di controllo.

Le attività di ricerca sulla Febbre Q negli animali, in particolare nei ruminanti, hanno coinvolto anche il nostro Istituto per gli aspetti relativi ai metodi diagnostici ed all'epidemiologia di quest'infezione.

Si è ritenuto quindi importante trasferire ai veterinari pubblici e liberi-professionisti le nuove conoscenze emerse in questi ultimi anni al fine di migliorare le capacità diagnostiche ed operative di tutti i colleghi che seguono, con diverse funzioni, gli allevamenti di bovine da latte.

La presente linea guida pertanto illustra in modo sintetico lo stato dell'arte delle attuali conoscenze sulla febbre Q e contiene una serie di raccomandazioni e consigli

operativi pratici derivanti dall'analisi delle evidenze scientifiche pubblicate su riviste internazionali. L'obiettivo finale è fornire ai colleghi veterinari una serie d'informazioni che possano essere d'aiuto nel processo diagnostico e nella gestione dei casi di Febbre Q riscontrati durante la loro attività lavorativa.

Gli autori ritengono doveroso ringraziare il Ministero della Salute che ha finanziato le attività di ricerca su questa patologia, i Servizi Veterinari Regionale del Veneto e della provincia autonoma di Trento che ci hanno supportato nello svolgimento delle attività di ricerca.

Infine un particolare ringraziamento va i colleghi veterinari dipendenti delle Aziende sanitarie e libero-professionisti che hanno generosamente prestato la loro collaborazione per la realizzazione delle ricerche da noi effettuate su questa malattia.

Antonio Barberio, DVM, PhD

Alda Natale, DVM, PhD

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

INDICE

Introduzione	11
--------------	----

Guida ai livelli di prova e alla forza delle raccomandazioni	12
--	----

Capitoli

1. Caratteristiche microbiologiche	14
------------------------------------	----

2. Patogenesi	18
---------------	----

3. Sintomi clinici e lesioni anatomico-patologiche	22
--	----

4. La Febbre Q nell'uomo	26
--------------------------	----

5. Epidemiologia	29
------------------	----

5.1 Vie di escrezione e trasmissione del microrganismo	30
--	----

5.2 Resistenza del microrganismo nell'ambiente	33
--	----

5.3 Fattori di rischio per la diffusione ed in mantenimento dell'infezione	34
--	----

5.4 Distribuzione dell'infezione	37
----------------------------------	----

6. Diagnosi di laboratorio	42
----------------------------	----

6.1 Isolamento del microrganismo	43
----------------------------------	----

6.2 Esame microscopico diretto	44
--------------------------------	----

6.3 Polimerase Chain Reaction (PCR)	44
-------------------------------------	----

6.4 Metodi per la rilevazione degli anticorpi	45
---	----

6.5 Fissazione del complemento	46
--------------------------------	----

6.6 ELISA	46
-----------	----

7. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni	48
8. Diagnosi di allevamento	52
8.1 Protocollo diagnostico in caso di aborto/ipofertilità	53
8.2 Protocollo diagnostico per indagini conoscitive sulla circolazione di <i>C. burnetii</i> nelle aziende	55
8.3 Interpretazione dei risultati diagnostici	56
9. Controllo della malattia	58
9.1 Controllo dell'infezione in allevamento	59
9.2 Vaccinazione	62
9.3 Trattamento con antimicrobici degli animali infetti	63
10. Quadro normativo aziendale	64
Bibliografia consultata	66
Norme tecniche e legislative citate	79





Introduzione

La febbre Q è una malattia infettiva contagiosa causata da *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*), un batterio intracellulare obbligato. E' una zoonosi diffusa in tutto il mondo ed è considerata una patologia emergente o riemergente in molti paesi. *C. burnetii* è in grado d'infettare un ampio numero di ospiti, e le specie animali sensibili alla malattia includono mammiferi domestici e selvatici, uccelli selvatici, rettili e anche zecche (Raoult et al., 2005). Il più importante serbatoio d'infezione è rappresentato dai ruminanti domestici da cui il microrganismo può passare all'uomo mediante inalazione di aerosol contaminati (ECDC, 2012).

Nei bovini l'infezione è spesso asintomatica, in alcuni casi possono manifestarsi aborti tardivi, natimortalità o altre patologie dell'apparato riproduttore, ritenzioni placentari, metriti, riassorbimenti (Arricau-Bouvery e Rodolakis, 2005). La disseminazione di *C. burnetii* nell'ambiente avviene di solito dopo il parto o l'aborto, ma il patogeno viene eliminato con cariche batteriche più basse, anche nel latte, nelle feci e nell'urina (Angelakis E. e Raoult D., 2010). L'escrezione nei diversi fluidi biologici può essere sporadica o persistente: in alcuni animali l'eliminazione del batterio nel latte può perdurare anche per molti mesi (Guatteo et al., 2007). La diagnosi della malattia può essere eseguita solo attraverso il ricorso al laboratorio e, purtroppo, negli animali le metodologie non sono ancora pienamente standardizzate come nell'uomo, per cui l'individuazione degli allevamenti e dei soggetti infetti resta un punto critico per il controllo di questa patologia. Numerose tecniche diagnostiche sono disponibili sia di tipo diretto, con l'identificazione dell'agente eziologico, che indiretto con la determinazione degli anticorpi anti *C. burnetii*. Purtroppo nessuna di queste metodiche è stata riconosciuta come test ufficiale dall'OIE, per cui la diagnosi della malattia deve prevedere l'impiego combinato di più metodologie su più soggetti, ed i risultati diagnostici vanno valutati a livello aziendale più che a livello individuale.

Negli ultimi anni le conoscenze scientifiche sulla Febbre Q nei bovini si sono notevolmente accresciute e sono stati illustrati molti aspetti poco chiari della patologia, nell'ambito dei criteri diagnostici, dei fattori che influenzano la diffusione dell'infezione e dei rischi di trasmissione dal bovino all'uomo.

L'obiettivo della presente linea guida è pertanto fornire delle indicazioni sulle modalità di diagnosi e controllo dell'infezione da *C. burnetii* basate sulle migliori evidenze presenti in letteratura.

Guida ai livelli di prova e alla forza delle raccomandazioni

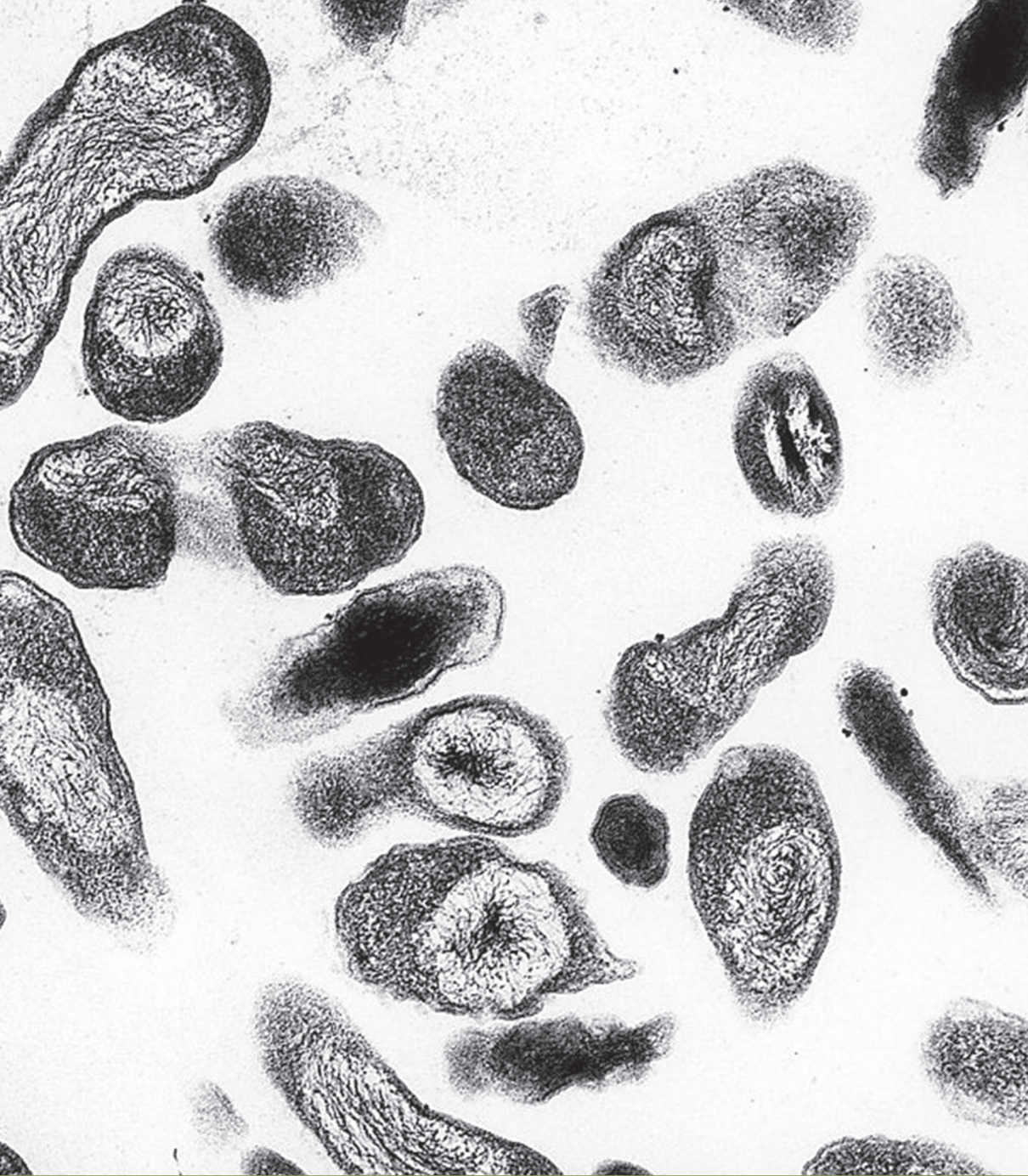
Nelle linee guida, le raccomandazioni vengono qualificate con un certo grado di forza della raccomandazione (FDR) e di livello di prova (LDP), espressi rispettivamente in lettere (da A a E) e in numeri romani (da I a VI). Con FDR ci si riferisce alla probabilità che l'applicazione nella pratica di una raccomandazione sia utile ai fini sanitari. Con LDP ci si riferisce alla probabilità che un certo numero di conoscenze sia derivato da studi pianificati e condotti in modo tale da produrre informazioni valide e prive di errori sistematici.

Esistono diversi sistemi di gradazione per le prove di efficacia e per la forza delle raccomandazioni riportate in letteratura. Il sistema adottato in questa Linea Guida si basa sulla rielaborazione messa a punto dal Centro per la valutazione dell'efficacia dell'assistenza sanitaria (CeVEAS) di Modena. Questo sistema ha come principale caratteristica il fatto che la forza delle raccomandazioni non si basa soltanto sul tipo di disegno di studio, ma tiene conto anche di altri fattori, quali la fattibilità, l'accettabilità e l'economicità dell'intervento.

Forza delle raccomandazioni		Livelli di prova delle raccomandazioni	
A	comportamento o intervento fortemente raccomandato	I	in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche
B	comportamento o intervento raccomandato	II	in base ad almeno uno studio clinico randomizzato
C	comportamento o intervento da considerare, ma di impatto incerto	III	in base a studi di coorte
D	comportamento o intervento da disincentivare	IV	in base a studi caso-controllo
E	fortemente sconsigliato	V	in base a studi su serie di casi senza gruppo di controllo
		VI	in base a opinioni di esperti

Gli obiettivi di queste Linee guida sono:

1. Riassumere le conoscenze di base relative alla malattia, con una particolare attenzione dedicata a quelle con dirette ed importanti ricadute nella pratica quotidiana clinica, diagnostica e di controllo della malattia: questo al fine di permettere al lettore (tipicamente: il veterinario di campo) di trovare in un unico documento le risposte alle principali domande che la pratica quotidiana può porgli
2. Definire una serie di raccomandazioni, in particolar modo per la diagnostica ed il controllo della malattia, articolando le linee guida in modo tale da consentire di trovare al suo interno le ragioni che stanno alla base delle raccomandazioni suddette: questo per evitare di far assumere alle raccomandazioni il valore di postulato



1. Caratteristiche microbiologiche

1. Caratteristiche microbiologiche

C. burnetii è un cocco-bacillo pleomorfo, di piccole dimensioni (0.2–0.4 µm larghezza, 0.4–1.0 µm lunghezza), con una membrana esterna simile a quella dei Gram negativi e che necessita dell'ambiente intracellulare per la sua replicazione. (Maurin e Raoult, 1999). Il batterio era stato classificato inizialmente nell'ordine dei Rickettsiales, ma oggi, a seguito dell'analisi del genoma è stato riclassificato nella famiglia delle *Coxiellaceae* nell'ordine *Legionellales* della subdivisione gamma dei *Proteobacteria* (Raoult et al., 2005).

C. burnetii si replica all'interno di un vacuolo parassitoforo della cellula eucariota che lo ospita (Mertens e Samuel, 2007) ed ha un ciclo di sviluppo intracellulare che coinvolge 3 distinti tipi di cellule: "large cell variant" (LCV), "small-cell variant" (SCV) e "small dense cell" (SDC) (Angelakis e Raoult, 2010). Queste 3 forme cellulari si differenziano fra loro per morfologia, composizione antigenica, caratteristiche metaboliche e, soprattutto, caratteristiche di resistenza agli agenti fisici e chimici (Heinzen e Hackstadt, 1999). Le LCV sono più grandi delle altre due forme, hanno una membrana citoplasmatica esterna analoga a quella dei Gram-negativi con antigene lipopolisaccaridico (LPS) sulla superficie, e sono la forma intracellulare metabolicamente attiva di *C. burnetii* (Arricau-Bouvery e Rodolakis, 2005). Le LCV vanno incontro ad una differenziazione sporogonica per produrre le altre due forme, SDC e SCV che sono molto più resistenti, simili a spore, in grado di sopravvivere nell'ambiente extracellulare (Angelakis e Raoult, 2010). Le SCV e SDC sono molto simili dal punto di vista morfologico, ma le SDC hanno una maggiore stabilità agli agenti fisici come la pressione, e sono in grado di sopravvivere anche ad un trattamento con un valore pressorio pari a 350.000 kiloPascal (KPa) (Samuel et al., 2003). Le forme SCV e SDC penetrano all'interno della cellula eucariota formando un fagosoma, poi si differenziano nella forma LCV e si moltiplicano. A seguito della fusione del fagosoma con il lisosoma il pH si acidifica fino a valori di 4,5, consentendo la differenziazione in forma LCV e la loro replicazione. Le forme LCV si replicano in modo esponenziale per 4-6 giorni, per poi entrare in fase stazionaria che coincide con la ricomparsa delle SCV (Rodolakis, 2011).

C. burnetii ha la capacità di modificare le caratteristiche antigeniche della membrana esterna in modo analogo a quanto fanno i Gram-negativi che mutano dalla forma liscia a quella rugosa. Questa mutazione è correlata alla modifica dello strato lipopolisaccaridico, cioè l'antigene LPS (Woldehiwet, 2004). Infatti dopo diversi passaggi seriali su uova embrionate o colture cellulari, l'antigene LPS si modifica nella popolazione batterica e *C. burnetii* passa dalla sua forma virulenta, detta "fase I", alla sua forma avirulenta, detta "fase II", che corrisponde alla forma rugosa dei

batteri Gram-negativi. Le cellule batteriche di *C. burnetii* in fase I esprimono un antigene LPS completo, sono altamente infettive e sono quelle che vengono isolate in natura da animali, uomo e zecche, mentre quelle in fase II sono avirulente e caratterizzate da un antigene LPS incompleto, a cui manca tutta la catena polisaccaridica dell'antigene O (Mertens e Samuel, 2007). La presenza dell'antigene LPS completo sembra conseguire un effetto di mascheramento dei batteri, riducendo la capacità di rilevazione dei batteri da parte dei Toll-like receptors type 2 (Mertens e Samuel, 2007).





2. Patogenesi

2. Patogenesi

Gli animali ed anche l'uomo acquisiscono normalmente l'infezione inalando l'aerosol contaminato da forme extracellulari di *C. burnetii* eliminate dai soggetti infetti (Tissot-Dupont e Raoult, 1992; Porter et al., 2011; Piñero et al., 2013), ma nei bovini è considerata come via d'infezione anche quella orale, per la quale la porta d'entrata è l'orofaringe (McQuiston e Childs, 2002).

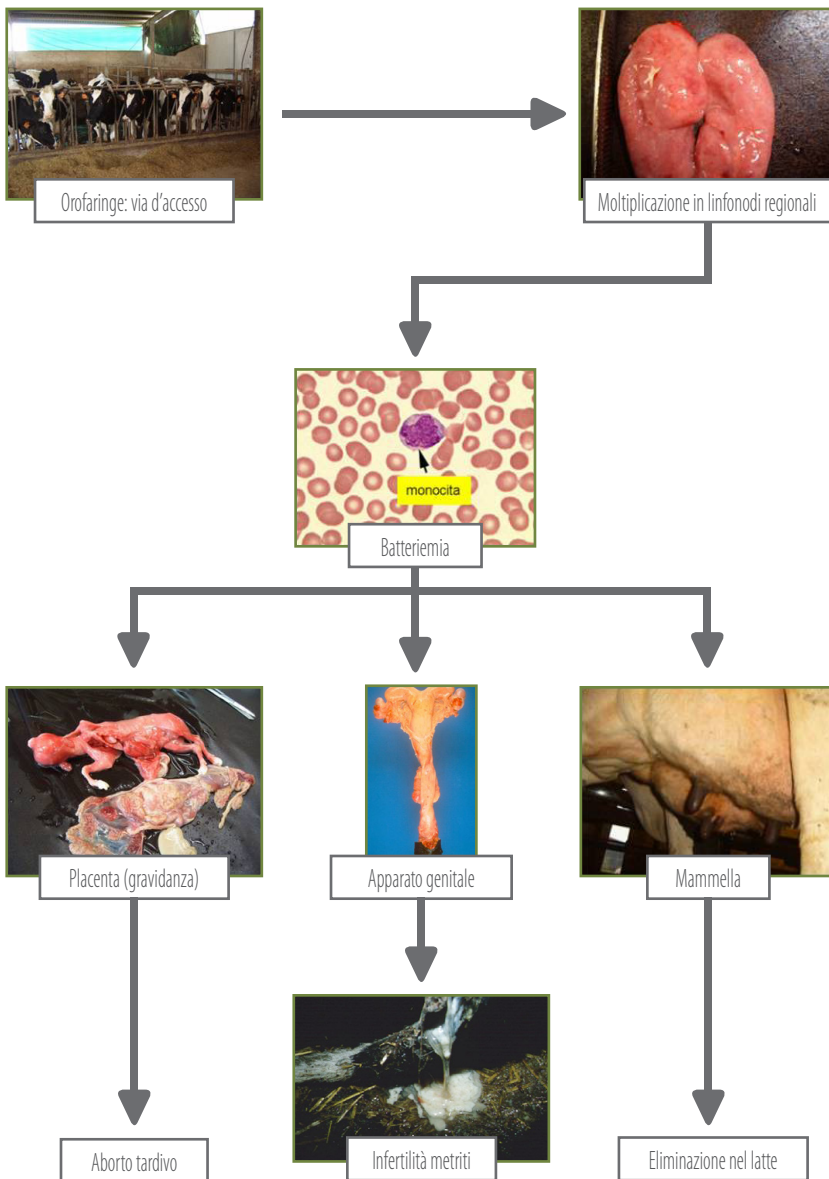
Una volta inalate o ingerite le forme extracellulari di *C. burnetii* si legano alla membrana cellulare dei monociti/macrofagi, e vengono trasferite all'interno della cellula ospite per meccanismi di fagocitosi (Capo et al., 1999). Il fagosoma contenente le cellule batteriche si fonde con i lisosomi presenti all'interno della cellula dando luogo alla formazione di un fagolisosoma che presenta un pH acido. *C. burnetii* ha sviluppato la capacità di adattarsi alle condizioni chimico-fisiche del fagolisosoma ed è in grado di moltiplicarsi all'interno del vacuolo acido in quanto l'acidità è necessaria al suo metabolismo, favorendo l'assimilazione e la sintesi degli acidi nucleici e degli aminoacidi (Rodolakis, 2011). Dopo una prima replicazione nei linfonodi regionali prossimi alla porta d'ingresso dell'infezione, si ha una batteriemia che dura da 7 a 21 giorni a seguito della quale l'organismo si localizza nella ghiandola mammaria e nella placenta degli animali infetti (Forland et al., 2010). Nei bovini solitamente l'infezione si propaga ad animali recettivi tramite l'ambiente contaminato da un animale infetto che spesso elimina il microrganismo al momento del parto: i nuovi infetti sviluppano l'infezione primaria con pochi o nulli sintomi clinici ma il batterio, dopo l'iniziale fase acuta, può persistere nell'organismo dando luogo ad un'infezione cronica, ed essere eliminato in grandi quantità nell'ambiente quando la bovina persistentemente infetta partorisce. Alcuni studi sperimentali hanno evidenziato che, nel primo periodo di gravidanza, *C. burnetii* può essere isolata da fegato, milza, rene, midollo, linfonodi ed intestino fino a 13 settimane di gestazione, mentre la placenta s'infetta solo subito prima del parto. Al termine della gravidanza la placenta consente al microrganismo di replicarsi fino ad alti titoli e al parto esso viene escreto nell'ambiente tramite il liquido amniotico e gli altri fluidi fetali (Harris et al., 2000). Al momento e subito dopo il parto grandi quantità di batteri sono escrete in forma di aerosol contaminando l'ambiente e il livello di anticorpi, in particolare le IgG aumentano di concentrazione nel sangue. Nelle gravidanze successive la bovina ha una escrezione più bassa o addirittura nulla di batteri al parto, ma può continuare ad eliminare il microrganismo nel latte per un lungo periodo di tempo (Woldehiwet, 2004). Nei bovini cronicamente infetti non è stato ancora chiarito dove e in che modo sopravvive *C. burnetii* durante il periodo in cui non sono gravidi, e quale sia il meccanismo che attiva la moltiplicazione del batterio nella placenta, anche se è ben noto il fatto che la gravidanza determina una modulazione del sistema immunitario che facilita la replicazione del microrganismo (Polydourou, 1981). Una

correlazione significativa è stata rilevata fra il livello di anticorpi contro *C. burnetii* e le concentrazioni di cortisolo, progesterone e pregnancy-associated glycoproteins (PAG). Questi dati suggeriscono che l'infezione da *C. burnetii* può modificare i "patterns" endocrini durante la gestazione ed indurre in questo modo dei danni placentali ed una diminuzione dei livelli di PAG nel sangue (Garcia-Ispuerto et al., 2010).

La gravidanza è un evento cruciale nel determinare l'esito finale dell'infezione nelle vacche in quanto durante la gestazione si manifesta una variazione dell'assetto del sistema immunitario verso un'attività di tipo TH2, caratterizzata dalla secrezione di alti livelli di una citochina immunosoppressiva, l'IL-10 (Böttcher et al 2011; Nogareda et al., 2012). La polarizzazione del sistema immunitario verso una risposta di tipo TH2 porta la risposta immunitaria ad essere poco efficace nel controllare un parassita intracellulare come *C. burnetii* e la soppressione del sistema immunitario dovuta alla secrezione di IL-10 può addirittura attivare la replicazione del microrganismo negli animali cronicamente infetti (Böttcher et al., 2011).

Patogenesi dell'infezione da *Coxiella burnetii* nel bovino

(modificato da Gestione clinica della riproduzione bovina, 1a edizione a cura di Giovanni Sali. Edito da Le Point Veterinarie Italie, Milano)





3. Sintomi clinici e lesioni anatomo-patologiche

3. Sintomi clinici e lesioni anatomo-patologiche

La sintomatologia clinica nei ruminanti è spesso aspecifica e di lieve entità. Nonostante sia stata riportata inizialmente da alcuni autori (Babudieri, 1953; Aitken, 1989) anche nei ruminanti la comparsa di sintomatologia respiratoria, attualmente la principale manifestazione clinica sicuramente ascrivibile a *C. burnetii* negli animali domestici è l'aborto (Woldehiwet, 2004). Nei bovini, rispetto a pecore e capre l'aborto è meno frequente, mentre è maggiore l'impatto dell'infezione sulla riduzione della fertilità nelle bovine da latte (Lang et al., 1991). Nelle vacche da latte gli altri sintomi clinici riportati in letteratura oltre agli aborti sono la ritenzione di placenta, la metrite e la mastite. Una correlazione positiva fra la sieropositività nelle vacche e la ritenzione di placenta è stata descritta da Lopez-Gatius et al. (2012). Alcuni autori hanno rilevato un incremento nella prevalenza di metriti negli animali sieropositivi (To et al., 1998), mentre altri studi non hanno evidenziato correlazioni fra questa patologia e l'infezione da *C. burnetii* (Muskens et al., 2011). In uno studio effettuato negli USA in un'azienda infetta, l'eliminazione di *C. burnetii* nel latte era significativamente associata alla presenza di mastiti croniche subcliniche in vacche negative per la presenza di altri agenti microbici di mastite (Barlow et al, 2007).

Negli animali infetti da *C. burnetii* la presenza di lesioni anatomopatologiche significative è abbastanza rara. Di solito sono del tutto assenti alterazioni macroscopiche nel feto, mentre a livello istologico è descritta raramente la comparsa di aggregati linfocitari a livello peribronchiolare, renale, parte midollare, ed epatico, in corrispondenza degli spazi periportal (McGavin e Zachary, 2006). Le placenti infette possono evidenziare la presenza di alcune alterazioni istopatologiche soprattutto nel corion, quali l'infiltrazione di cellule mononucleate nello stroma, la necrosi dei trofoblasti e la presenza di multifocali foci di essudazione fibrinosa ed infiltrazione di neutrofili. Una correlazione statisticamente significativa è stata rilevata fra la presenza di queste lesioni in caso di aborto nel bovino e l'evidenziazione di *C. burnetii* nella placenta mediante immunoistochimica (Bildfell et al., 2000). In un altro studio (Hansen et al., 2011) condotto mediante esame microscopico di sezioni di cotiledoni prelevate da placenti infette non sono invece state rilevate lesioni analoghe e tutte le placenti osservate presentavano assenza o presenza solo di lesioni lievi. Questi risultati dimostrano che *C. burnetii* causa solo raramente delle lesioni significative alla placenta, pertanto la presenza di disfunzioni placentali non è la causa degli aborti a termine che compaiono nella specie bovina e spiega perché nei bovini infetti non sono mai

stati descritti casi di natimortalità come nelle pecore e nelle capre (Hansen et al., 2011). In quest'ultima specie invece le lesioni placentari sono più frequenti ed acute, determinando una placentite necrotico-suppurativa a partire da 130 giorni di gestazione (Sanchez et al., 2006).





4. La Febbre Q nell'uomo

4. La Febbre Q nell'uomo

La Febbre Q è stata descritta per la prima volta nell'uomo nel 1935 tra il personale di uno stabilimento di macellazione della città di Brisbane (Australia), che manifestava una sindrome febbrile diffusa ad un numero elevato di lavoratori (Derrick EH, 1973). Lo stesso agente eziologico è stato poi ritrovato nelle zecche ad Hamilton, Montana, USA da Davis e Cox nel 1938 (Cox et al., 1947). I ruminanti domestici, in particolare pecore e capre, costituiscono il principale *reservoir* del microrganismo per l'uomo che s'infetta per inalazione degli aerosol infetti o per contatto diretto, o tramite la disseminazione del patogeno operata dal vento (Porter et al., 2011). Per quest'ultima modalità di trasmissione particolare importanza rivestono l'eliminazione di *C. burnetii* con le feci e la conseguente contaminazione delle deiezioni animali e le condizioni ambientali (Arricau-Bouvery e Rodolakis, 2005; EFSA, 2010; Roest et al, 2011a).

Nell'uomo la malattia è a tutt'oggi endemica in molti paesi europei e nella popolazione delle aree rurali si rileva una sieroprevalenza che varia dal 10 al 30% (Georgiev et al., 2013). Recentemente si è avuta in Olanda, nella regione del Nord-Brabante, una grave epidemia nell'uomo con un totale di 4.026 casi diagnosticati fra il 2007 ed il 2010 (Roest et al., 2011a; Schneeberger et al., 2014). Gli allevamenti intensivi di capre da latte presenti nella zona sono stati individuati come la fonte del contagio per l'uomo. In particolare il numero elevato di aborti caprini occorsi nel 2007 in associazione il clima caldo e secco della stagione primaverile sembra abbiano favorito la trasmissione aerogena di particelle di polvere contaminata nei centri abitati situati nell'area, con la diffusione dell'infezione in un numero altissimo di persone (van der Hoek et al., 2012).

La principale caratteristica della Febbre Q nell'uomo è il polimorfismo dei sintomi clinici per cui la diagnosi clinica è difficoltosa ed il ricorso alla conferma di laboratorio un passo obbligato del processo diagnostico. Va inoltre ricordato che anche nell'uomo l'infezione può manifestarsi in forma subclinica con assenza di sintomi clinici. Dal punto di vista clinico e patogenetico si distinguono due forme della malattia: acuta e cronica (Tissot-Dupont e Raoult, 1992; Maltezou e Raoult, 2002).

Forma acuta

Il periodo d'incubazione è variabile e può arrivare anche ad alcuni mesi, anche se di solito la malattia si manifesta entro 14–39 giorni dall'infezione. Anche i sintomi clinici possono variare notevolmente da paziente a paziente. La manifestazione clinica più frequente è la febbre (91% dei casi) associata spesso a mal di testa, mialgie, artralgie e tosse. Può comparire anche una polmonite atipica che si manifesta nel 27% dei pazienti, caratterizzata da tosse non produttiva e lievi alterazioni del murmure rilevabili

all'auscultazione, per cui la diagnosi di polmonite si basa essenzialmente sul reperto radiografico (Tissot-Dupont et al., 2007). In alcuni pazienti la polmonite si può manifestare invece con un'insufficienza respiratoria grave associata anche a versamento pleurico (Raoult et al., 2005).

Fra le altre manifestazioni cliniche causate dalla malattia vi è l'epatite che può presentarsi in forma acuta con ittero, febbre, nausea, dolorabilità addominale, o in forma più lieve ed addirittura subclinica (Marrie e Raoult, 1987; Marrie, 1988). In ogni caso l'epatite da Febbre Q è caratterizzata dalla presenza di granulomi nel parenchima epatico che presentano un aspetto caratteristico, in quanto hanno uno spazio centrale vuoto circondato da un anello di fibrina, da cui la definizione di granulomi a forma di "doughnut" (Tissot-Dupont e Raoult, 2007).

la comparsa di lesioni cutanee, rush, è stata descritta in una percentuale variabile fra il 5 ed il 20% dei pazienti (Maurin, 1999), mentre più raramente compaiono forme cardiache (miocardite, endocardite) (Fournier et al., 2001) o neurologiche, che possono determinare encefaliti, meningoencefaliti o neuropatie periferiche (Bernit et al., 2002).

La sintomatologia acuta si risolve spontaneamente nella maggior parte dei casi dopo 2-6 settimane, ma il microrganismo può rimanere nel midollo osseo e causare la successiva comparsa della forma cronica della malattia, evoluzione che interessa circa il 2% dei pazienti colpiti dalla Febbre Q. Va sottolineato che anche i pazienti asintomatici possono sviluppare la forma cronica (Frode-Forland et al., 2010).

Forma cronica

La forma cronica della malattia può comparire da alcuni mesi ad anni dopo l'infezione. Si manifesta esclusivamente in pazienti che presentano dei fattori predisponenti quali patologie delle valvole cardiache, alterazioni vascolari, neoplasie maligne e immunosoppressione. Le donne in gravidanza hanno un elevato rischio di sviluppare la forma cronica (Fenollar et al., 2001). La manifestazione clinica più importante (48% dei casi) della forma cronica è una endocardite che può risultare negativa all'esame batteriologico (Houpikian e Raoult, 2005). Altre manifestazioni cliniche sono la ricomparsa di granulomi a livello epatico e la cosiddetta sindrome da affaticamento post-infezione (QFS) che può colpire fino al 60% dei pazienti e persistere per un periodo di 6-12 mesi (Ayres et al., 1998).

La diagnosi della malattia si basa sui test sierologici che permettono di differenziare le forme acute da quelle croniche, poiché la presenza di antigeni in fase I e in fase II varia in funzione dell'evoluzione clinica della patologia (Tissot-Dupont e Raoult, 2007). Nella forma acuta la risposta immunitaria determina un maggior incremento delle IgM e delle IgG dirette contro l'antigene in fase II, mentre nella forma cronica si ha un incremento maggiore delle IgG dirette contro l'antigene in fase I (Maurin e Raoult, 1999).

Dal punto di vista diagnostico un titolo di IgG > 200 e di IgM > 50 anti antigene in fase II è indicativo di un'infezione acuta, mentre un titolo di IgG > 800 anti antigene in fase I è indicativo d'infezione cronica (Fournier et al, 1998), anche se alcune recenti pubblicazioni hanno evidenziato la presenza di casi di endocardite cronica con titoli anticorpali di IgG anti antigene in fase I < 800 (Santos, 2017). La persistenza di alti livelli di anticorpi anti fase I o la loro ricomparsa dopo il trattamento terapeutico evidenziano lo sviluppo di una forma cronica (Tissot-Dupont e Raoult, 2007).

Terapia

La terapia antibiotica viene usata con successo per mitigare la sintomatologia clinica. L'antibiotico di elezione è la doxiciclina che viene somministrata per 14 giorni in caso forma acuta (Dumler et al., 2002), salvo nelle donne in gravidanza. Il trattamento delle forme croniche, in particolare di quelle caratterizzate da endocardite prevede un trattamento con doxiciclina e cloroquina per 18 mesi. La cloroquina viene impiegata in quanto ha un effetto sinergico con la doxiciclina perchè aumenta il pH del fagolisoma riducendo la capacità di replicazione di *C. burnetii* (Maurin e Raoult, 1999; Raoult et al., 2005).



5.Epidemiologia

5. Epidemiologia

5.1 Vie di escrezione e trasmissione del microrganismo

C. burnetii viene escreta nell'ambiente soprattutto al momento del parto mediante il liquido amniotico, le lochiazioni, la placenta e le altre secrezioni uterine, ma l'eliminazione del microrganismo avviene anche dopo il parto tramite il latte, le urine, le feci e lo sperma dei bovini infetti (Hilbink et al., 1993; Kruszezwska e Tylewska-Wierzbansowska, 1997; Heinzen et al, 1999; Guatteo et al., 2007; Rodolakis, 2009). Il microrganismo è presente in concentrazioni molto elevate nei liquidi ed invogli fetali eliminati dalle bovine infette al momento del parto, che costituisce il momento di maggior rischio per la trasmissione dell'infezione ad altri animali o all'uomo. Inoltre gli invogli fetali possono mantenere la loro pericolosità per la diffusione del microrganismo se lasciati all'aperto in quanto l'aerosol infetto si può trasmettere a distanza con il vento (Arricau-Bouvery e Rodolakis, 2005).

Dopo il parto *C. burnetii* viene eliminata nel muco vaginale per un periodo di circa 14 giorni che, solo in pochi soggetti, può prolungarsi fino a 30 giorni (Guatteo et al., 2012). L'escrezione vaginale è spesso sporadica ed intermittente per cui non tutti i soggetti infetti risultano positivi per il microrganismo nel muco vaginale (Guatteo et al., 2006; Guatteo et al, 2007; Guatteo et al., 2012).

Per questo motivo il prelievo delle secrezioni vaginali per la diagnosi diretta dell'infezione deve essere effettuato al massimo entro 7 giorni dal parto per avere un'adeguata attendibilità diagnostica (Sidi-Boumedine et al., 2010).

**A
I**

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

La presenza di *C. burnetii* a livello intrauterino è stata evidenziata dopo il parto in vacche affette da metrite (Muskens et al., 2011), anche se questa patologia non è compresa fra le principali cause di metrite nella vacca da latte.

C. burnetii può infettare anche l'embrione bovino: studi "in vitro" hanno dimostrato che il microrganismo è in grado di aderire e penetrare nelle cellule embrionali e di persistere nell'embrione anche dopo il protocollo standard di lavaggio degli embrioni previsto per le pratiche di embryo transfer dalla International Embryo Transfer Society for bovine embryos. pertanto le procedure di embryo transfer possono essere un potenziale

rischio di trasmissione dell'infezione dalle vacche donatrici alle riceventi (Alsaleh et al., 2014).

Nelle vacche *C. burnetii* viene frequentemente eliminata anche nel latte e tale via d'escrezione può coesistere con quella vaginale (Guatteo et al., 2012). L'escrezione di *C. burnetii* nel latte non è collegata direttamente al parto ed in alcuni soggetti può iniziare anche 3 mesi dopo il parto. Inoltre, a differenza degli altri ruminanti, le vacche eliminano il batterio nel latte per molti mesi, in alcuni casi anche per tutto il corso della lattazione (Guatteo et al., 2007; Rodolakis et al., 2007). L'escrezione del batterio nel latte può essere sporadica o persistente e la proporzione di escrettrici persistenti può raggiungere il 25% delle bovine infette (Guatteo et al., 2006).

La presenza di DNA di *C. burnetii* nel latte vaccino non è un metodo appropriato per individuare i soggetti clinicamente infetti in quanto è poco specifico a causa della presenza di un certo numero di vacche sane, che non manifestano sintomi clinici, ma che eliminano *C. burnetii* nel latte anche per periodi di tempo prolungato (Kim et al., 2005; Rodolakis et al., 2007; Guatteo et al., 2007).

D
II

Comportamento o intervento da disincentivare In base ad almeno uno studio clinico randomizzato

Negli allevamenti infetti alcune vacche possono eliminare a lungo e persistentemente il microrganismo nel latte anche in carica abbastanza elevata. Questi soggetti probabilmente hanno una risposta immune alterata nei confronti di *C. burnetii*, analogamente a quanto avviene nell'uomo, e sono importanti dal punto di vista epidemiologico in quanto mantengono la presenza dell'infezione in allevamento (Guatteo et al., 2007; Guatteo et al., 2012). La maggior parte delle vacche eliminatrici croniche ha un livello elevato di anticorpi che determina elevata sieropositività al test ELISA (Guatteo et al., 2007) ed al test di fissazione del complemento (Natale et al., 2012). Inoltre questi soggetti evidenziano un profilo sierologico diverso dagli eliminatori sporadici di *C. burnetii*, se si valutano in modo differenziale gli anticorpi in fase I e quelli in fase II (Böttcher et al., 2011; Lucchese et al., 2015).

L'elevata frequenza di escrezione di *C. burnetii* nel latte delle vacche pone il problema del possibile ruolo di questo alimento nella trasmissione dell'infezione all'uomo. I lavori presenti in letteratura sull'argomento hanno dato risultati contraddittori. Alcuni autori hanno evidenziato una connessione fra il consumo di latte crudo e l'insorgere della malattia nell'uomo (Beck e Bell, 1949; Marmion e Stoker, 1958; Fishbein e Raoult, 1992; Signs et al. 2012) mentre altri, in prove sperimentali che prevedevano la somministrazione di latte infetto a dei volontari, non hanno rilevato la comparsa di segni clinici, ma

solo di sieroconversione limitata ad alcuni soggetti (Benson et al., 1963; Krumbiegel e Wisniewski, 1970). Riguardo al rischio di trasmissione all'uomo di *C. burnetii* tramite il latte ed i suoi derivati il parere emesso da European Food safety Authority (EFSA, 2010) ha definito quanto segue:

a) Il consumo di latte e suoi derivati contenenti *C. burnetii* può determinare la comparsa di sieroconversione nell'uomo, mentre non vi sono chiare evidenze che possa indurre la comparsa della forma clinica di Febbre Q

b) Il consumo di latte crudo o prodotti derivati al latte crudo costituisce un rischio di esposizione *C. burnetii* a relativamente più elevato rispetto al consumo di prodotti che abbiano subito un trattamento termico appropriato

E
I

Comportamento o intervento fortemente sconsigliato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

L'eliminazione di *C. burnetii* nelle feci è poco frequente e solo sporadica nel bovino rispetto alla pecora (Guatteo et al., 2006; Rodolakis et al., 2007). Questa differenza potrebbe spiegare in parte perché la maggior parte dei focolai di malattia nell'uomo derivano da capre e pecore e non dal bovino (Rodolakis et al., 2007), considerata l'importanza del materiale fecale nella diffusione dell'infezione all'uomo (Tissot-Dupont et al., 2004; Roest et al., 2011a; van der Hoek et al., 2012). Va comunque tenuto presente che la contaminazione di liquami in aziende infette è stata rilevata con la PCR in alcuni casi (Piñero et al., 2013), per cui non si può escludere che la trasmissione fecale possa avere un ruolo, ancorché limitato, nella diffusione e mantenimento dell'infezione.

5.2 Resistenza del microrganismo nell'ambiente

C. burnetii è un microrganismo dotato di elevata resistenza agli agenti fisici e chimici che può sopravvivere a lungo nell'ambiente esterno e negli alimenti. Le sue forme libere (SCV, SDC) sono resistenti all'acidità (fino a pH 4,5), al calore (resistono anche 30 minuti a 62° C), alle radiazioni UV, e alle alte pressioni (fino a 300.000 kPa) (EFSA, 2010). Questo comporta una loro persistenza in forma infettante per tempi prolungati nel latte (fino a 42 mesi a 4-6°C), nella lana (fino a 16 mesi) nella polvere (fino a 49 giorni), nelle urine (fino a 30 giorni), nel sangue rappreso (6 mesi). *C. burnetii* viene inattivata dalle soluzioni di: cloroformio al 5%, perossido d'idrogeno (H₂O₂) al 5%, ipoclorito allo 0,5%, etanolo al 70% a seguito di un tempo di contatto di almeno 30 minuti. La pastorizzazione a 72°C per 15 secondi inattiva *Coxiella burnetii* e rende sicuro il latte per l'utilizzo alimentare (EFSA, 2010).

5.3 Fattori di rischio per la diffusione ed il mantenimento dell'infezione

I fattori che influenzano maggiormente la diffusione ed il mantenimento dell'infezione nella popolazione bovina possono essere suddivisi in 3 gruppi principali:

- a. quelli relativi alle caratteristiche dell'agente patogeno, in particolare alla virulenza e morbilità dei singoli ceppi
- b. quelli relativi alle caratteristiche intrinseche dell'ospite, cioè razza, età, sesso, tipologia produttiva
- c. quelli relativi all'ambiente comprendendo la gestione dell'allevamento

Fattori relativi all'agente eziologico

Le possibili relazioni fra genotipo e virulenza sono al momento tutte da chiarire e vi sono ancora pochi dati sulle caratteristiche genetiche dei ceppi di *C. burnetii* isolati dal bovino per trarre delle conclusioni. Nei caprini a seguito dei focolai degli anni 2007-2011 occorsi in Olanda, è stata individuata la presenza di uno genotipo predominante in tutti gli allevamenti di capre analizzati. Questa scoperta ha fatto sospettare la diffusione di un clone specifico fra gli allevamenti con caratteristiche specifiche di morbilità e virulenza (Roest et al., 2011b).

In uno studio condotto su campioni di latte e derivati di origine bovina prelevati in 28 stati diversi, Tilburg et al. (2012a) hanno rilevato un elevato grado di somiglianza fra i genotipi bovini, e la presenza di due ceppi predominanti, definito con le lettere "J" e "I". Analoghi risultati sono emersi da uno studio condotto in Spagna in 36 aziende: anche in questo caso i due genotipi predominanti erano "J" e "I". (Piñero et al., 2015). Un'alta similitudine genetica fra i ceppi di *C. burnetii* isolati nei bovini è stata evidenziata anche da altri autori (Astobiza et al., 2012a; Mori et al., 2013; Frangoudilis et al., 2014; Ceglie et al., 2015; Prigent et al., 2015), mentre una maggiore eterogenicità è stata descritta negli ovicaprini, spesso correlata a ceppi coinvolti nelle infezioni dell'uomo (Roest et al., 2011b; D'Amato et al., 2016).

Allo stato attuale delle conoscenze si può quindi affermare che i ceppi di *C. burnetii* isolati dal bovino evidenziano una maggiore correlazione fra loro rispetto ai ceppi isolati in altre specie animali. I ceppi di origine bovina sono nella maggior parte dei casi geneticamente molto diversi da quelli isolati dall'uomo, per cui si ritiene che il bovino abbia un ruolo limitato rispetto alla comparsa di patologia nell'uomo (Astobiza et al., 2012a; Tilburg et al., 2012a; Georgiev et al., 2013; Pearson et al., 2014; Piñero et al., 2015).

Fattori relativi all'ospite

Il tipo di ospite può influenzare fortemente le caratteristiche dell'infezione, in partico-

lare per quanto attiene alla sintomatologia, alle modalità di diffusione ed al rischio di trasmissione all'uomo. Ad esempio l'aborto è più frequente nelle capre e nelle pecore rispetto ai bovini, nei quali l'infezione è per lo più asintomatica o legata alla comparsa di infertilità e ritenzione di placenta (Lang et al., 1991; Lopez-Gatius et al., 2012). Numerosi studi hanno evidenziato che l'infezione da *C. burnetii* è influenzata da specifici fattori individuali quali razza, età, numero di lattazioni e tipologia produttiva (McCaughey et al., 2010; Ryan et al., 2011; Paul et al., 2012).

La razza, o meglio la tipologia produttiva, è un importante fattore di rischio per l'infezione: le vacche da latte hanno normalmente una sieroprevalenza significativamente più elevata dei bovini da carne (McCaughey et al. 2010; Ryan et al., 2011; Alvarez et al., 2012). La maggiore recettività delle bovine da latte all'infezione è probabilmente legata alla metodologia d'allevamento più che ad una minore resistenza genetica intrinseca, sebbene sia stato rilevato anche un effetto legato specificamente alla razza. Le vacche di razza Frisona infatti presentano una maggiore e statisticamente significativa presenza di soggetti sieropositivi a *C. burnetii* rispetto alle altre razze da latte (McCaughey et al., 2010; Paul et al., 2012).

L'età e il numero di lattazioni sono due fattori di rischio individuali fortemente associati con la sieroprevalenza (McCaughey et al., 2010; Böttcher et al., 2011; Muskens et al., 2011; Alvarez et al., 2012; Paul et al., 2012). Le vacche con età superiore a 4 anni hanno una probabilità di essere sieropositive fino a 4 volte più elevata rispetto alle manze (McCaughey et al., 2010; Paul et al., 2012). Questo dato è spiegabile alla luce della maggior probabilità d'infezione degli animali nei box parto ed asciutta, visto che durante il parto le bovine infette eliminano una notevole quantità di batteri (EFSA, 2010; Alvarez et al., 2012). Pertanto si può ipotizzare che il mantenimento dell'infezione in azienda è dovuto principalmente alla circolazione di *C. burnetii* fra le vacche adulte.

Il sesso degli animali è un fattore di rischio che non è stato molto valutato fra i bovini, probabilmente perché la maggior parte delle indagini è stata effettuata in stalle da latte. Uno studio condotto in Irlanda del Nord, che comprendeva anche bovini da carne, ha evidenziato una maggiore probabilità di essere sieropositive nelle femmine rispetto ai maschi (McCaughey et al., 2010). Va comunque considerato il possibile "bias" derivante dalla diversa età degli animali fra maschi e femmine.

Fattori ambientali e gestionali

Sono numerosi i fattori ambientali in grado influire sulla diffusione e mantenimento dell'infezione negli allevamenti bovini. Fra essi spiccano molti aspetti gestionali, ma non devono essere trascurati anche specifici fattori climatici come il vento e la siccità (EFSA, 2010).

Dai numerosi studi epidemiologici effettuati i due principali fattori di rischio per la

diffusione dell'infezione sono l'acquisto di nuovi capi e la dimensione dell'allevamento (McCaughey et al., 2010; EFSA, 2010; Ryan et al., 2011; Taurel et al., 2011; Alvarez et al., 2012; Paul et al., 2012; Agger e Paul, 2014; Schimmer et al., 2014; van Engelen et al., 2014).

L'acquisto di animali è un fattore di rischio ben conosciuto e comune a molte altre patologie: nel caso dei *C. burnetii*, la carenza di test che permettono d'individuare in modo certo la presenza di soggetti infetti, è un ulteriore elemento di pericolo, per cui l'applicazione della quarantena per le nuove vacche introdotte nell'allevamento è l'unica efficace misura di controllo (Paul et al., 2012).

La presenza dell'infezione è risultata fortemente correlata all'aumentare della dimensione dell'allevamento: in uno studio effettuato in Danimarca le aziende con più di 150 vacche avevano una probabilità di essere infette 17,9 volte più alta rispetto alle aziende con meno di 80 capi (Agger e Paul, 2014). Seppure con livelli di probabilità più bassi, tutti gli altri studi epidemiologici effettuati in altri paesi europei hanno confermato l'importanza della numerosità della mandria come fattore di rischio per la diffusione di *C. burnetii* (Alvarez et al., 2012; Taurel et al., 2011; Ryan et al., 2011). Un allevamento di maggiori dimensioni è esposto ad un rischio più elevato sia per il maggior numero di contatti fra gli animali sia per la presenza di un numero più alto di soggetti recettivi all'infezione (van Engelen et al., 2014). Inoltre anche le modalità di stabulazione e gestione degli animali negli allevamenti di grandi dimensioni possono favorire la diffusione dell'infezione. Ad esempio la stabulazione libera è risultata significativamente associata alla presenza d'infezione rispetto alla stabulazione fissa (Paul et al., 2012). Gli altri fattori gestionali associati ad un maggior rischio di diffusione dell'infezione da *C. burnetii* nella mandria sono: scarsa pulizia delle cuccette e della lettiera, box parto sporco e non disinfettato dopo il parto di una bovina, introduzione nella mandria senza quarantena degli animali acquistati, mancata adozione di adeguate procedure igieniche da parte del veterinario prima di entrare in azienda (Taurel et al., 2011; Paul et al., 2012; van Engelen et al., 2014).

L'uso del sistema di mungitura volontaria robotizzata è risultato invece un fattore che riduce la presenza dell'infezione nella mandria (van Engelen et al., 2014). Considerando che con questo tipo d'impianto si evita di raggruppare gli animali due o anche tre volte al giorno per la mungitura, si può ipotizzare che questa diversa gestione degli animali possa determinare una minor presenza e diffusione dell'infezione da *C. burnetii*.

I fattori climatici possono ricoprire un ruolo importante nella diffusione dell'agente eziologico: ad esempio nell'uomo il vento ha reso possibile il trasporto anche a lunga distanza di *C. burnetii* e la conseguente trasmissione dalle pecore all'uomo anche in ambiente urbano (Tissot-Dupont et al., 2004). Anche nei bovini il vento è risultato essere un fattore di rischio per la diffusione dell'infezione. In Svezia ad esempio nelle isole di Gotland and Öland è stata rilevata una prevalenza di aziende sieropositive per

C. burnetii molto più elevata che nel resto del paese (Ohlson et al, 2014). Lo spirare di forti venti in queste isole è stato identificato come il principale fattore di rischio per la diffusione dell'infezione (Nusinovici et al., 2015).

Uno studio condotto nel nord-ovest della Francia ha evidenziato che la trasmissione aerogena era responsabile del 92% dei casi di nuova infezione riscontrati negli allevamenti non infetti, mentre solo l'8% dei casi era attribuibile all'introduzione di nuovi capi di bestiame. Lo stesso studio ha però messo in luce che i nuovi focolai derivanti da trasmissione aerogena erano effimeri nella durata e coinvolgevano un numero ristretto di animali, mentre nei nuovi focolai derivanti dall'introduzione di capi positivi per *C. burnetii*, l'infezione era più persistente e diffusa ad un maggior numero di capi (Pandit et al., 2016).

Fra i fattori climatici anche la siccità può influenzare la diffusione di *C. burnetii*. La presenza di precipitazioni continue e ravvicinate nel tempo è risultata essere in Svezia un fattore di protezione che riduceva il rischio di presenza dell'infezione negli allevamenti. Tale fenomeno è probabilmente da ascrivere alla riduzione di cellule batteriche aerosolizzate nell'aria (Nusinovici et al., 2015).

5.4 Distribuzione dell'infezione

L'infezione da *C. burnetii* è presente in tutto il mondo, indipendentemente dalle diverse condizioni climatiche e geografiche (Hilbink et al., 1993; Woldehiwet, 2004). La reale prevalenza dell'infezione nei bovini, così come nelle altre specie e nell'uomo, è sottostimata in molti paesi a causa della preponderanza dei casi asintomatici rispetto a quelli clinici e per la mancanza di metodi diagnostici pienamente efficaci per la diagnosi della malattia (EFSA, 2010; Porter 2011).

In uno studio di revisione della bibliografia condotto da Guatteo et al. (2011) è stata evidenziata una notevole variabilità nelle indagini di prevalenza sull'infezione condotti da vari autori, che andava dallo 0% al 100% per i dati di prevalenza fra gli animali e dal 4,45% al 100% per i dati di prevalenza fra gli allevamenti.

In Africa gli studi di prevalenza effettuati principalmente in Chad, Egitto, Sudan, Tunisia, SudAfrica ed Africa occidentale hanno evidenziato una prevalenza variabile fra il 4 ed il 55% (Vanderburg et al., 2014).

In Asia i principali studi sulla diffusione dell'infezione sono stati realizzati in Cina, Giappone, India e Iran.

In Cina gli studi di prevalenza effettuati hanno evidenziato una percentuale media di sieroprevalenza variabile fra il 9 ed il 18%. Le aree del paese dove l'infezione da *C. burnetii* è maggiormente presente sono le provincie poste a nord (Jilin 36%, Inner Mongolia 32%) ed al centro (Xinjiang, 29.9%) del paese (El-Mahallawy et al., 2015).

In Giappone un'indagine effettuata su bovine da latte con problemi riproduttivi ha evidenziato su questi soggetti alti livelli di sieropositività (60%) (To et al. 1998), confermando i dati ottenuti in precedenza da Htwe et al. (1992), che avevano descritto una prevalenza pari al 47% utilizzando campioni di sangue prelevati per il piano di controllo della brucellosi.

In India un'indagine effettuata su bovine da latte e bufale mediante esecuzione di PCR su tamponi vaginali, latte e feci ha evidenziato una prevalenza d'infezione pari al 12% nelle vacche ed al 15% nei bufali (Vaidya et al., 2010).

In Iran, un'indagine sierologica effettuata impiegando il test ELISA sul latte di massa, ha evidenziato una percentuale di aziende sieropositive pari al 45% (Khalili et al., 2011), mentre per quanto riguarda la presenza di *C. burnetii* nel latte di massa delle aziende infette, uno studio effettuato da Rahimi et al., (2010), con l'impiego della PCR ha messo in luce una percentuale di aziende positive pari al 18%.

Negli Stati Uniti d'America (USA) la prevalenza dell'infezione a livello di allevamento è risultata superiore al 90% (Kim et al., 2005; Pearson et al., 2014).

In Europa l'infezione da *C. burnetii* nei bovini è diffusa in un numero elevato di paesi sulla base delle indagini sierologiche effettuate nell'ultimo decennio (EFSA, 2010). I dati delle indagini più recenti (tabella 1) hanno evidenziato che la percentuale di allevamenti sieropositivi arrivava fino al 73% in Francia, e la percentuale di bovini sieropositivi negli allevamenti era pari al 21% in Olanda e Bulgaria, al 19% in Germania ed al 15% in Francia (Georgiev et al., 2013). Le indagini sulla prevalenza dell'infezione effettuate testando il latte di massa hanno messo in luce come questo agente eziologico sia diffuso in tutti gli allevamenti di bovini da latte, con percentuali pari al 79% riscontrato in Olanda e Danimarca, (Muskens et al., 2011; Agger e Paul, 2014), al 71% nel Belgio meridionale (Czaplicki et al., 2009), al 65% in Irlanda del Nord (McCaughey et al., 2010), al 67% in Spagna (Astobiza et al., 2012a), e al 61% in Portogallo (Pimenta et al., 2015). Solo in Finlandia (0,2%) ed in Svezia (8%) la percentuale di allevamenti sieropositivi è risultata più bassa rispetto agli altri paesi, tenendo conto che comunque in Svezia nelle isole di Gotland e Öland la prevalenza di allevamenti infetti era molto più elevata, rispettivamente pari al 59 ed al 35%, e comparabile con quella degli altri paesi europei (Autio et al., 2010; Ohlson et al., 2014).

In Italia il rilevamento di *C. burnetii* nei feti abortiti è stato riportato in diverse regioni con prevalenze variabili fra il 3% del Veneto (Barberio et al., 2009) e il 12% della Basilicata (Parisi et al., 2006). L'infezione è stata rilevata anche nel bufalo con una percentuale di aborti positivi abbastanza elevata, pari al 18% (Perugini et al., 2009).

Un'indagine condotta da Cabassi et al. (2006), confrontando vacche da latte senza problemi al parto con vacche che avevano abortito, ha evidenziato in quest'ultime una sieroprevalenza pari al 45%, e al 22% nelle altre vacche.

Nazione	Anno indagine	N. capi testati	N. aziende testate	Animali positivi (%)	Aziende positive (%)	Test diagnostico	Riferimento bibliografico	Criteri selezione campioni
Albania	1995-1997	311	-	10,9	-	ELISA	Cekani et al., 2008	random
Albania	1999	552	-	8,5	-	ELISA	Cekani et al., 2008	random
Belgio	2008	-	1.137	-	71,2	ELISA	Czaplicki et al., 2009	random
Bulgaria	1989-2006	95,737	-	5,4	-	FDC	Martinov 2007	random
Bulgaria	2004	120	-	20,8	-	IFA	Panaiotov et al., 2009	focolaio umano di Febbre Q
Cipro	NA	75	-	24	-	IFA	Psaroulaki et al., 2006	random
Cipro Nord	2008-2009	51	51	35	-	PCR	Cantas et al., 2011	random
Danimarca	2007	-	742	-	57	ELISA-latte	EFSA 2010	random
Danimarca	2008	-	100	-	59	ELISA-latte	Agger et al., 2010	random
Danimarca	2012	-	120	-	79,2	ELISA-latte	Agger et al., 2014	random
Finlandia	2008-2009	-	1.238	-	0,2	ELISA-latte	Autio et al., 2010	random
Francia	2005-2006	-	37	-	84	PCR-latte	Guatteo et al., 2011	azienda infetta
Francia	2007	336	6	37,5	-	ELISA	Guatteo et al., 2008	azienda infetta
Germania	1991	1.095	21	11,8	81	ELISA	Rehacek et al., 1993	random
Germania	1996-1997	826	38	14,3	-	ELISA	Sting et al., 2000	vacche con ipofertilità
Germania	1998-2000	1.167	-	2	-	ELISA	Sting et al., 2002	vacche con ipofertilità
Germania	2005-2006	21.051	603	14,8	72,3	ELISA	Böttcher et al., 2011	random
Ungheria	2010-2011	150	15	38	100	ELISA	Gyuranecz et al., 2012	random
Ungheria	2010-2012	-	15	-	66,7	PCR-latte	Gyuranecz et al., 2013	random
Italia	1994	711	99	4,4	13,1	FDC	Martini et al., 1994	random
Italia	1998	1.188	-	14,4	-	IFA	Capuano et al., 2004	random
Italia	-	650	-	44,9	-	ELISA	Cabassi et al., 2006	vacche con aborti
Italia	-	600	-	22	-	ELISA	Cabassi et al., 2006	vacche sane
Italia	2008	-	489	-	59	ELISA-latte	Barberio et al., 2010	random
Olanda	1987	1.160	234	21	37	ELISA	Muskens et al., 2007	focolaio umano di Febbre Q
Olanda	2007	2.936	341	16	78,6	ELISA	Muskens et al., 2011	random
Portogallo	2013	-	90	-	61,1	ELISA-latte	Pimenta et al., 2015	random
Rep. d'Irlanda	2008	469	290	4,7	37,9	ELISA	Ryan et al., 2011	random
Spagna	2007-2008	626	42	6,7	42,9	ELISA	Ruiz-Fons et al., 2010	random
Spagna	2009-2010	2.462	178	6,7	66,9	ELISA	Astobiza et al. 2012	random
Svezia	2008-2009	-	1.537	-	8,2	ELISA	Ohlson et al, 2014	random
Regno Unito	2009-2010	-	155	-	69,7	PCR-latte	Valergakis et al., 2012	random
Regno Unito Irlanda Nord	2009	5,182	273	6,2	48,4	ELISA	McCaughy et al., 2010	random

Tabella 1: Prevalenza dell'infezione da *C. burnetii* nella popolazione bovina dell'Europa a livello individuale e a livello aziendale, espressa rispettivamente come percentuale di animali positivi o di aziende positive rilevate nel corso delle indagini effettuate. Sono indicate per ogni studio l'anno, il numero di animali/aziende testati, la percentuale di positivi rilevati, il test diagnostico impiegato ed i criteri di selezione dei campioni (modificato da Epidemiology of Q fever in cattle. In "The principles and practice of Q fever. The one health paradigm". João Simões, Sofia Anastácio, Gabriela Jorge da Silva editors, Nova Science Publishers, New York (NY, USA) 2017)

Gli studi effettuati usando il latte di massa hanno evidenziato un'elevata diffusione dell'infezione negli allevamenti della pianura Padana, sia effettuando la ricerca degli anticorpi (59%) (Barberio et al., 2010) che dell'agente eziologico (40%) (Magnino et al., 2009).





6. Diagnosi di laboratorio

6. Diagnosi di laboratorio

La febbre Q è una malattia a decorso asintomatico, con qualche evento epidemico come l'aborto per cui la diagnosi su base clinica o anatomopatologica è impossibile. La diagnosi della malattia può essere pertanto eseguita solo attraverso il ricorso al laboratorio. Le metodiche a nostra disposizione sono di tipo diretto, ricerca antigene (isolamento, esame microscopico diretto, PCR), o indiretto, ricerca anticorpi (Immunofluorescenza, Fissazione del complemento, ELISA).

I materiali più idonei per la diagnosi diretta di Febbre Q nei bovini sono: il muco vaginale, la placenta, i tessuti fetali. Questi campioni devono essere prelevati dai feti abortiti, placente e scoli vaginali al più presto dopo l'aborto. In particolare i tamponi di scolo vaginale vanno prelevati entro 1 settimana dal parto (EFSA, 2010; Sidi-Boumedine et al., 2010)

**A
I**

Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

Il latte, il colostro e le feci possono essere impiegati per la ricerca dell'agente eziologico ma la diagnosi di malattia a partire da questi materiali biologici è meno affidabile ed il loro utilizzo è utile soprattutto per rilevare la circolazione dell'agente eziologico nella mandria o per studi epidemiologici (Sidi-Boumedine et al., 2010; Guatteo et al., 2006; Garcia-Ispuerto et al., 2013; OIE, 2015).

**A
I**

Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

6.1. Isolamento del microrganismo

L'isolamento previa coltura non può essere considerato una metodica di routine per due ragioni. La prima è che questo batterio si moltiplica solo all'interno dei fagolisosomi di cellule eucariote, pertanto può essere coltivato solo su animali da laboratorio, su uova embrionate o colture cellulari e queste metodiche non sono alla portata di tutti i laboratori diagnostici. La seconda ragione è che si tratta di un microrganismo classificato di livello 3 (ACDP, 2004; D. Lgs 81/2008): *"agente biologico che può causare malattie gravi in soggetti umani e costituisce un serio rischio per i lavoratori; l'agente biologico può propagarsi nella comunità, ma di norma sono disponibili efficaci misure*

profilattiche o terapeutiche". Per questa ragione la manipolazione del microrganismo "isolato" può essere fatta solo in un laboratorio costruito secondo le caratteristiche di biosicurezza previste per manipolare microrganismi classificati di classe terza (UNI EN 12128/2000). Inoltre *C. burnetii* è classificato come agente di bioterrorismo di categoria B in virtù delle sue caratteristiche, in particolare la trasmissione aerogena e la bassa carica infettante per l'uomo. Per questi motivi l'isolamento del batterio si esegue solo in laboratori altamente specializzati, con il fine di eseguire successivamente studi sulle caratteristiche antigeniche e biomolecolari.

L'isolamento può essere effettuato su linee cellulari disponibili in commercio quali Human embryonic lung fibroblast (HEL), African green monkey epithelial cells (Vero), Mouse fibroblast (L929), Canine macrophage cells (DH82), South African clawed frog epithelial cells (XTC-2) (Voth e Heinzen, 2007; Lockhart et al., 2012).

La replicazione del materiale patologico in animali da laboratorio è essenziale nel caso l'isolamento debba essere effettuato a partire da campioni di campo (placenta, latte, secreto vaginale, feci) contaminati da microrganismi ubiquitari. Per l'isolamento il porcellino d'india è stato il primo animale da laboratorio impiegato (Maurin e Raoult, 1999). Oggi l'isolamento viene effettuato prevalentemente su topi, in particolare ceppo A/J che ha dimostrato elevata suscettibilità al patogeno (Scott et al., 1987). L'inoculazione degli animali da laboratorio viene generalmente effettuata per via intraperitoneale e, dopo la conferma dell'avvenuta infezione, l'animale viene soppresso mediante eutanasia, si asporta la milza da cui viene effettuato l'isolamento di *C. burnetii* mediante inoculazione in colture cellulari o uova embrionate di pollo.

6.2. Esame microscopico diretto

L'esame microscopico viene effettuato su strisci di secreto vaginale, su tessuti fetali o sulla placenta mediante colorazioni con metodi convenzionali (Stamp, Gimenez, Macchiavello, Giemsa e Koster modificata). Questo test ha una bassa sensibilità e specificità (EFSA, 2010). Una migliore capacità diagnostica si ottiene impiegando tecniche immunoistochimiche che prevedono l'uso di sieri policlonali anti *C. burnetii* e l'uso di un coniugato che usa come marcatore o l'isotiocianato di fluorescina o la perossidasi per la visualizzazione dei batteri (EFSA, 2010).

6.3. Polimerase Chain Reaction (PCR)

La PCR è uno dei metodi più sensibili e rapidi per la rilevazione di *C. burnetii* e trova oggi grande impiego nei laboratori anche perché è adattabile a quasi tutti i materiali biologici che vengono campionati, feci, urine, latte, aborti (Berri et al., 2000; Nicollet and Valognes, 2007). Il recente sviluppo della real-time PCR ha migliorato la sensibilità e la specificità del metodo rispetto alle altre metodiche in PCR (Stemmler e Meyer,

2002; Kim et al., 2005; Klee et al., 2006; Duquesne et al., 2008; Jones et al., 2011). Il target genetico più raccomandato per l'amplificazione è la sequenza multicopia d'inserzione *IS1111* (Berri et al., 2000). Per l'interpretazione dei risultati è importante considerare anche il valore di cycle threshold (ct) ottenuto rispetto alla tipologia di campione analizzato. Il ct indica il numero di cicli di replicazione del DNA necessari per superare la linea soglia della reazione, e fornisce un'indicazione della quantità iniziale di DNA presente nel campione, maggiore è il ct minore è la quantità di DNA presente. Valori elevati di ct da placenta, aborti o tamponi vaginali devono far sospettare una possibile contaminazione ambientale o fecale del campione (Natale et al., 2017).

La real-time PCR è la metodica di più sensibile e rapida per l'identificazione del DNA di *C. burnetii* da organi, tessuti, secreti ed escreti di animali infetti

A
IV

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi caso controllo

Attualmente non esiste ancora per la real-time PCR quantitativa una soglia approvata ufficialmente a livello internazionale. Un gruppo di esperti francesi ha proposto per l'identificazione da placenta o tampone vaginale il valore soglia di 10^4 e per i tessuti e il contenuto abomasale del feto il valore soglia di 10^3 (Touratier et al., 2007)

6.4. Metodi per la rilevazione degli anticorpi

La rilevazione degli anticorpi prodotti verso *C. burnetii* non consente negli animali, a differenza dell'uomo, di poter formulare una diagnosi a livello individuale, per cui la diagnostica sierologica viene impiegata in veterinaria per indagini sierologiche o come accertamento complementare per la diagnosi a livello di mandria. Non esiste un test ufficiale di riferimento e per la diagnosi sierologica di Febbre Q negli animali i due test comunemente usati sono la fissazione del complemento (FDC) e il test Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). La FDC è stata considerata per anni come test di riferimento, ma negli ultimi anni è stata soppiantata dallo sviluppo di kit ELISA commerciali che presentano una sensibilità maggiore rispetto alla FDC (EFSA, 2010). Gli antigeni su cui si basa la diagnosi sierologica nei bovini sono costituiti dalle due principali forme assunte dall'antigene LPS, in fase I e in fase II. Sia la FDC sia i kit ELISA presenti in commercio rilevano sia gli anticorpi verso la fase I e la fase II dell'antigene, senza però differenziarli.

La differenziazione dei due tipi di anticorpi può essere fatta solo con l'utilizzo del test d'immunofluorescenza (IFA) per il quale non esistono kit commerciali già pronti, e che deve venire pertanto allestito specificatamente. La differenziazione degli anticorpi anti fase I e fase II non consente negli animali di differenziare i soggetti con forma acuta da quelli cronici, come avviene nell'uomo, e pertanto l'IFA è poco usata in veterinaria.

6.5. Fissazione del Complemento (FDC)

La FDC è stata considerata il test di riferimento per ragioni storiche ma in realtà la sua sensibilità diagnostica è bassa rispetto all'ELISA ed all'IFA, soprattutto negli ovicapri (Rousset et al., 2007). Il test può essere eseguito solo su siero di sangue. L'antigene impiegato per la preparazione del test può derivare sia da un ceppo umano (Henzerling) che da un ceppo batterico isolato dalle zecche (Nine Mile) (OIE, 2015).

La prova viene considerata positiva già con un titolo anticorpale di 1/10, ma i titoli compresi fra 1/10 e 1/40 possono rappresentare la presenza d'infezione solo latente, mentre nel caso di titoli pari o superiori a 1/80 in un gruppo di animali si ha evidenza di circolazione attiva dell'agente eziologico nella mandria (OIE, 2015).

Numerosi studi hanno evidenziato come la sensibilità di questo test sia bassa mentre la specificità è abbastanza elevata dato l'alto livello di anticorpi anti-*C. burnetii* che compaiono negli animali che hanno abortito, in particolare nei bovini (Rousset et al., 2007; Kittelberger et al., 2009; Horigan et al., 2011; Natale et al., 2012; Emery et al., 2014).

Nei bovini da latte è stato evidenziato un buon grado di correlazione fra la risposta alla FDC e l'eliminazione di *C. burnetii* nel latte (Natale et al., 2012). Le minori performance della FDC rispetto all'ELISA dipendono, oltre che dalle caratteristiche intrinseche del metodo, dal tipo di antigene impiegato, che, soprattutto nel caso del ceppo Nine Mile, rileva solo anticorpi anti fase II (Porter et al., 2011). Anche la presenza di titoli alti di IgG II e IgM può influenzare le performance della FDC, poiché questi anticorpi possono ridurre o sopprimere la fissazione del complemento alle IgG I, che nei ruminanti sono l'unica classe di immunoglobuline in grado di fissare il complemento (Schmeer, 1985).

6.6. ELISA

L'ELISA è la tecnica maggiormente impiegata per la diagnosi sierologica di Febbre Q nei ruminanti per la semplicità d'uso, vista la disponibilità di kit commerciali, per l'elevata sensibilità e specificità del metodo, la maggiore uniformità dei risultati ed anche per il costo contenuto dei reattivi. Il test ELISA può essere effettuato su siero o su latte di massa o di singolo animale.

L'impiego del test ELISA è quindi raccomandato per l'esecuzione delle analisi sierologiche di routine nei bovini (OIE, 2015)

A
I

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

Vi sono diversi kit ELISA attualmente disponibili in commercio, tutti basati su una miscela di antigeni che permette di rilevare anticorpi anti fase I e anti fase II (OIE, 2015). Tutti i kit ELISA rilevano la presenza di IgG nei confronti di *C. burnetii* senza differenziare gli anticorpi anti fase I da quelli anti fase II. Gli antigeni presenti sono di due tipi: derivanti dal ceppo di riferimento Nine Mile, isolato dalle zecche, o da un ceppo isolato da un aborto ovino. I kit ELISA prodotti con quest'ultimo tipo di antigene hanno evidenziato performance migliori per la diagnosi negli ovicapri (Rodolakis, 2006; Horigan et al., 2011), mentre nei bovini non sono state rilevate differenze di performance diagnostiche in funzione del tipo di antigene impiegato (Emery et al., 2014).

L'analisi comparativa delle prestazioni dei kit sierologici disponibili effettuata con un ring trial nell'ambito di un progetto finanziato dall'UE ha dimostrato che i tre kit attualmente più diffusi in commercio mostrano una buona riproducibilità e con una sensibilità diagnostica comparabile (EFSA, 2010). tali risultati sono stati confermati dai successivi test di comparazione effettuati da altri autori (Kittelberger et al., 2009; Emery et al., 2014; Niemczuk et al., 2014; Lucchese et al., 2015; Saegerman et al., 2016).

L'intensità della reazione al test ELISA è espressa in tutti e 3 i test come rapporto fra esito del campione analizzato e campione negativo di controllo tramite il valore S/P. Quanto maggiore è il valore S/P tanto maggiore è il titolo anticorpale del siero analizzato.

Il principale limite diagnostico del test ELISA è conseguente alla lunga persistenza degli anticorpi prodotti contro *C. burnetii*, per cui la positività al test non ci permette di definire lo stato sanitario dell'animale, ma solo che il soggetto è venuto precedentemente a contatto con il batterio.

A livello di mandria, non di singolo animale, è stata evidenziata una correlazione fra l'intensità di reazione al test ELISA, misurata con il valore S/P e la presenza di bovine che eliminavano persistentemente *C. burnetii* nel latte (Guatteo et al., 2007). Inoltre è stata descritta anche la presenza di bovine che eliminano *C. burnetii* nel latte pur essendo sieronegative (Rodolakis et al., 2007; Guatteo et al., 2007; Rousset et al., 2009; Natale et al., 2012, de Cremoux et al., 2012). Questi animali potrebbero essere nella fase iniziale di sieroconversione per cui il titolo anticorpale costituito solo da IgG anti fase II potrebbe non essere rilevato dal test ELISA, che ha una minore sensibilità nel rilevare questi anticorpi (Boettcher et al., 2011; Emery et al., 2012). In alternativa questi soggetti eliminatori e sieronegativi potrebbero essere degli eliminatori occasionali di *C. burnetii*, con scarsa rilevanza epidemiologica (Courcoul et al., 2010; Lucchese et al., 2015). La differenziazione fra infezione acuta e cronica da *C. burnetii* è stata studiata da alcuni autori impiegando un test ELISA sperimentale con antigeni in fase I e fase II separati in pozzetti diversi, ed ha dato risultati incoraggianti che dovranno essere confermati da ulteriori studi (Lucchese et al., 2015; Boettcher et al., 2011; Sting et al., 2013; Roest et al., 2013).



7. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

7. Raccolta, conservazione e trasporto dei campioni

Test diretti (PCR)

1. **Placenta e feto abortito:** prelevare e consegnare il feto ed annessi seguendo le indicazioni contenute nella LGinVet1 (*La diagnosi di aborto infettivo nella specie bovina*), tenendo presente che i cotiledoni placentari rappresentano la matrice d'elezione; N.B. le placente possono contenere un numero elevato di batteri quindi devono essere manipolate con le dovute precauzioni.
2. **Latte individuale o di massa:**
 - a. campione individuale: provetta da 10 ml, riempita con latte dei 4 quarti in eguale misura
 - b. latte di cisterna: riempire una provetta da 50 ml. Il prelievo deve essere eseguito rispettando l'asepsi, in quanto la presenza di materiale fecale, o ambientale, può condizionare la real-time PCR

La conservazione e trasporto del campione in laboratorio deve essere fatta a temperatura di refrigerazione (+ 4° C) entro 24 ore o in alternativa si deve aliquotare e conservare congelato a -20° C. La metodica real-time PCR non è compatibile con la presenza di sodio azide

3. **Tampone vaginale:** pulire e disinfettare la rima vulvare; divaricare le labbra della vulva e inserire un tampone sterile in profondità; strofinare la punta del tampone sulla parete vaginale. Fatto il prelievo il tampone deve essere conservato in acqua distillata sterile a temperatura di refrigerazione (+ 4° C) (il materiale può essere fornito dal laboratorio). La consegna deve essere fatta a temperatura di refrigerazione (+ 4° C) entro 24 ore, in modo da evitare l'essiccamento;
4. **Feci:** prelevare le feci dall'ampolla rettale con guanto monouso, depositare le feci in un barattolo a vite a chiusura ermetica. La conservazione e trasporto del campione deve essere fatta a temperatura di refrigerazione (+ 4° C) e la consegna al laboratorio è bene che sia fatta entro 24 ore.

Test indiretti

1. **Sangue:** va prelevato in provette da 5 o 10 ml (provetta con tappo marrone); dopo il prelievo la provetta va lasciata a temperatura ambiente in modo che il sangue coaguli. Successivamente va conservato a temperatura di refrigerazio-

ne (+ 4° C) per un massimo di 2-3 giorni. Il trasporto al laboratorio, se avviene nell'arco di qualche ora, può essere fatto a temperatura ambiente, in caso di spedizione con corriere, specialmente in estate, deve essere fatto con siberine.

2. **Latte individuale o di massa (da valutare/validare):** per quanto riguarda il volume del prelievo vale quanto indicato in precedenza. In entrambi i casi non serve rispettare rigorose norme asettiche, in quanto le metodiche sierologiche non risentono di eventuali contaminazioni. La metodica ELISA è compatibile con la presenza della pastiglia di sodio azide. La conservazione e trasporto del campione deve essere fatta a temperatura di refrigerazione (+ 4° C).

I campioni devono essere accompagnati da un verbale di prelievo che deve indicare: l'identificazione dell'allevamento, il nome del richiedente, il tipo di materiale inviato, il tipo di esame richiesto e la metodica. I campioni inoltre devono essere identificati chiaramente in maniera indelebile.





8. Diagnosi di allevamento

8. Diagnosi di allevamento

La diagnosi di Febbre Q negli animali non può basarsi su un singolo accertamento diagnostico, ma va esaminato e considerato il contesto clinico ed epidemiologico del caso (Porter et al., 2011). In ogni caso la conferma del sospetto clinico di Febbre Q richiede l'applicazione di più tecniche diagnostiche e di campioni prelevati da più di un animale.

Si possono individuare 2 diverse situazioni a cui corrispondono altrettanti interventi:

1. diagnosi di aborto/ipofertilità o metriti post-partum
2. indagine conoscitiva per valutare la di *Coxiella burnetii* in una mandria

8.1. Protocollo diagnostico in caso di aborto/ipofertilità

Animali da prelevare	Numero di campioni	Tipo di campione	Tecnica di laboratorio
Vacche che hanno abortito da massimo 7 giorni e feti abortiti	Da 1 a 3	• Placenta • Organi del feto (milza, polmone fegato o contenuto abomasale) • Tampone vaginale se feto o placenta non disponibile	PCR; preferibilmente PCR real time quantitativa
Vacche che hanno abortito	Da 1 a 3	Siero	ELISA
Vacche che hanno abortito da più di 15 giorni e meno di 4 mesi	6 (possibilmente 3 primipare e 3 pluripare)		
Vacche con problemi riproduttivi (metrite post-partum, infertilità) negli ultimi 4 mesi			
Vacche sane	Selezionare almeno 4 animali (2 primipare e 2 pluripare)		

Figura 1: Protocollo diagnostico da applicare in caso aborto bovino

Nei bovini il protocollo diagnostico deve prevedere sia la ricerca diretta dell'agente eziologico mediante PCR negli animali che ha manifestato i sintomi, che l'esecuzione di esami sierologici con il test ELISA su un numero rappresentativo di animali, includendo possibilmente sia animali sospetti che animali sani (Guatteo et al.,

2007; Rousset et al., 2009a EFSA, 2010; de Cremoux et al., 2012; Sidi-Boumedine, 2010; Niemczuk et al., 2014)

A
I

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche

In caso di aborto vanno prelevati e testati in real-time PCR i cotiledoni della placenta o gli organi e tessuti del feto, quali milza, polmone, fegato, contenuto dell'abomaso

A
VI

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base all'opinione di esperti

Fra questi materiali il tessuto di elezione per la ricerca di *C. burnetii* è la placenta, ma va considerato che in un'azienda positiva la contaminazione passiva del campione è sempre possibile, per cui la placenta raccolta da terra o dalla concimaia potrebbe dare una positività conseguente alla contaminazione dall'ambiente o dalle feci, anziché alla presenza dell'infezione nella madre. In questi casi la valutazione quantitativa della carica infettante mediante real-time PCR è di ausilio per distinguere le positività da contaminazione: in caso di aborto infatti si dovrebbe riscontrare un'elevata carica batterica ($>10^4$ batteri per grammo di tessuto). In caso di esito dubbio si può eseguire la PCR anche da un campione di tessuto fetale non esposto a contaminazione esterna, ad esempio organi interni o contenuto abomasale. Quando la placenta non è disponibile per l'analisi, si possono impiegare altri tessuti ed organi del feto. Gli organi di elezione in questo caso sono la milza o, in alternativa il contenuto dell'abomaso, anche se va tenuto conto che a seguito d'infezione sperimentale nella capra *C. burnetii* è stata individuata anche in altri organi e tessuti fetali, quali il polmone, fegato, rene e cuore (Roest et al., 2012).

Nel caso il feto abortito non sia disponibile è consigliabile effettuare un tampone vaginale entro 7 giorni dalla data dell'aborto (Sidi-Boumedine et al., 2010)

A
VI

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base all'opinione di esperti

L'escrezione di *C. burnetii* nel muco vaginale è elevata solo nei primi giorni dopo l'aborto o il parto, e spesso cessa completamente già dopo 14 giorni (Guatteo et al., 2012). Inoltre l'eliminazione nel muco vaginale dopo pochi giorni è nella maggior parte dei casi sporadica o intermittente, e la quantità di batteri escreta è molto bassa (Guatteo et al., 2006; Guatteo et al., 2007; Guatteo et al., 2012).

Nel caso non siano presenti aborti ma altri sintomi clinici quali metriti o ritorni in calore è consigliabile effettuare tamponi vaginali dagli animali con metrite clinica e dai soggetti con problemi di ipofertilità al momento del calore. Inoltre, considerato che nelle aziende infette l'escrezione di *C. burnetii* avviene anche nelle vacche che partoriscono regolarmente (Guatteo et al., 2007; Guatteo et al., 2012), è consigliabile effettuare anche tamponi vaginali entro massimo 7 giorni dal parto da animali che hanno partorito regolarmente

A
VI

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base all'opinione di esperti

Per l'analisi sierologica vanno selezionati almeno 6 soggetti prelevati fra quelli che hanno presentato sintomi clinici riferibili a infezione da *C. burnetii* (aborto, infertilità, metriti) da almeno 14 giorni, e quelli che non hanno evidenziato manifestazioni cliniche. Nel campione di animali vanno comprese sia vacche primipare che pluripare (Sidi-Boumedine et al., 2010)

A
VI

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base all'opinione di esperti

8.2. Protocollo diagnostico per indagini conoscitive sulla circolazione di *C. burnetii* nelle aziende

Il monitoraggio e la sorveglianza epidemiologica sono essenziali per proteggere la mandria dall'introduzione di nuove patologie e per valutare l'efficacia delle misure di profilassi adottate.

Per quanto riguarda la Febbre Q il monitoraggio per valutare l'eventuale presenza dell'infezione deve essere basato sull'applicazione di più tecniche diagnostiche, analogamente a quanto descritto per la diagnosi di aborto.

La diagnosi di infezione in allevamento può essere eseguita attraverso un controllo sierologico eseguito su animali adulti. Sono sufficienti 10 campioni di sangue prelevati da bovine adulte pluripare, includendo anche animali con recenti problemi riproduttivi (metriti, infertilità, mancati secondamenti, aborti) (Sidi-Boumedine et al., 2010)

A
VI

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi caso controllo

Per quanto riguarda le tecniche diagnostiche si consiglia di testare i campioni sia con il metodo ELISA che con la FDC. La positività alla FDC si manifesta, a livello di mandria, in soggetti con infezione abbastanza recente, mentre la sieropositività al test ELISA non consente di definire uno spazio temporale rispetto al contatto con l'agente eziologico (Natale et al., 2012; Barberio et al., 2014)

A
IV

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi caso controllo

Considerato che la principale via di escrezione per la specie bovina, dopo il feto ed annessi fetali, è rappresentata dal latte (Guatteo et al., 2006; Guatteo et al., 2007; Guatteo et al., 2012), è consigliabile testare un campione di latte di massa mediante real-time PCR quantitativa, al fine di valutare la presenza di *C. burnetii* nell'allevamento

A
IV

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi caso controllo

8.3. Interpretazione dei risultati diagnostici

Per confermare la presenza di un focolaio di Febbre Q nella mandria, è necessario che ricorrano le seguenti condizioni:

- ✓ devono essere presenti segni clinici chiaramente riferibili alla Febbre Q, ovvero aborti o natimortalità
- ✓ deve risultare positivo alla PCR con un ct basso almeno 1 campione prelevato da animali che hanno manifestato i segni clinici
- ✓ deve risultare positivo al test ELISA almeno il 50% degli animali campionati
- ✓ nel caso di PCR positiva in almeno due soggetti la diagnosi è confermata anche in con bassa positività al test ELISA (< 50%)

Quando si rilevano le seguenti condizioni:

- ✓ presenza di segni clinici chiaramente riferibili alla Febbre Q, ovvero aborti o natimortalità
- ✓ PCR negativa in tutti i soggetti testati
- ✓ positività al test ELISA di almeno il 50% degli animali testati

oppure le seguenti:

- ✓ presenza di segni clinici chiaramente riferibili alla Febbre Q, ovvero aborti o natimortalità

- ✓ PCR positiva con un ct basso in uno solo dei soggetti testati
- ✓ positività al test ELISA < al 50% degli animali testati

Può essere emessa solo una diagnosi di sospetto e devono essere effettuati ulteriori campionamenti sugli animali clinici per confermare il sospetto o escludere la presenza di un focolaio della malattia.

Quando si rilevano le seguenti condizioni:

- ✓ presenza di segni clinici chiaramente riferibili alla Febbre Q, ovvero aborti o natimortalità
- ✓ PCR negativa in tutti i soggetti testati
- ✓ positività al test ELISA < al 50% degli animali testati

La Febbre Q può essere esclusa come agente causale degli aborti ed altri agenti eziologici vanno testati per individuare la causa dell'aborto o escludere la presenza di aborti d'origine infettiva (Sidi-Boumedine et al., 2010).

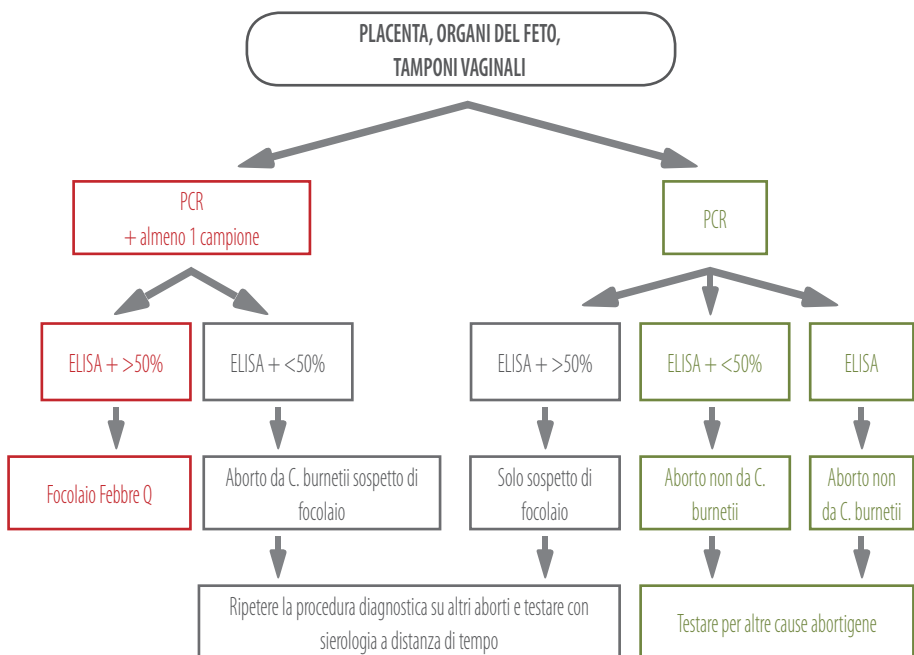


Figura 2: algoritmo per l'interpretazione dei risultati analitici effettuati in caso di aborto, metrite post-partum, infertilità bovino. (modificato da Diagnostic approach to *Coxiella burnetii* infection in animals. In "The principles and practice of Q fever. The one health paradigm". João Simões, Sofia Anastácio, Gabriela Jorge da Silva editors, Nova Science Publishers, New York (NY, USA) 2017)



9. Controllo della malattia

9. Controllo della malattia

Le misure da applicare per evitare la diffusione dell'infezione da *C. burnetii* nella popolazione bovina sono sostanzialmente 3:

- ✓ limitare la trasmissione da soggetti infetti a sani riducendo le probabilità di contatto diretto fra gli animali e di contatto indiretto con materiale contaminato
- ✓ limitare l'eliminazione dell'agente eziologico negli animali infetti
- ✓ ridurre la percentuale di soggetti sensibili nella popolazione

Tutte e 3 queste misure devono essere implementate per controllare la diffusione di *C. burnetii* nella popolazione umana. Le prime due misure possono essere ottenute con l'applicazione di misure di profilassi diretta, mentre l'ultima può essere conseguita solo ricorrendo alla vaccinazione degli animali sensibili.

9.1. Controllo dell'infezione in allevamento

Le misure di profilassi diretta da applicare hanno duplice valenza: nel caso di aziende non infette riducono la probabilità d'introduzione in stalla della malattia, nel caso di aziende infette servono a contenere la diffusione di *C. burnetii* in allevamento ed a ridurre la percentuale di animali infetti. Nelle aziende infette, seconda dell'obiettivo che ci si prefigge, le misure di profilassi diretta possono essere modulate in modo diverso, e limitarsi solo a contenere la diffusione di *C. burnetii* nella mandria per evitare la comparsa di sintomatologia clinica, oppure mirare all'eradicazione dell'infezione (EFSA, 2010).

I due principali fattori di rischio per la diffusione dell'infezione sono l'acquisto di nuovi capi e la dimensione dell'allevamento (McCaughey et al., 2010; EFSA, 2010; Ryan et al., 2011; Taurel et al., 2011; Alvarez et al., 2012; Paul et al., 2012; Agger e Paul, 2014; Schimmer et al., 2014; van Engelen et al., 2014). Pertanto sono soprattutto le aziende che rientrano in queste caratteristiche a dover applicare misure di prevenzione più incisive per impedire l'accesso di *C. burnetii*.

Gli altri fattori di rischio individuati erano relativi alla pulizia ed igiene dei box parto (Taurel et al., 2011), alla presenza di ovicapri (van Engelen et al., 2014), alla mancata applicazione della quarantena agli animali acquistati Paul et al. (2012), alla mancanza di misure di biosicurezza da parte dei veterinari che seguono l'azienda Taurel et al. (2011).

Per evitare l'entrata e diffusione dell'infezione vanno pertanto applicate le seguenti misure:

- ✓ ridurre il numero di animali acquistati programmando in modo adeguato la produzione di una rimonta interna sufficiente
- ✓ applicare a tutti gli animali acquistati un periodo di quarantena: nel caso di

animali gravidi questi vanno tenuti separati anche per il periodo peripartale (7 giorni prima e 7 giorni dopo il parto), in modo da evitare il periodo di massima escrezione del microrganismo

- ✓ **usare per il parto dei box individuali che devono essere accuratamente puliti dopo il parto**
- ✓ **rimuovere immediatamente dai box parto, singoli o collettivi, gli aborti, le placente e la lettiera contaminata dai liquidi escreti durante il parto**
- ✓ **prevedere per il personale esterno che viene a contatto con gli animali (es. veterinario) l'uso di calzari e vestiario mantenuto nell'azienda o disinfettato prima dell'accesso nella stessa**
- ✓ **evitare il contatto dei bovini con altri animali presenti in allevamento, in par-**

Fattore analizzato	Effetto sul rischio di infezione	Misure di controllo
Grande dimensione della mandria	Aumento	Implementare le misure generali di biosicurezza
Acquisto di animali	Aumento	Applicare quarantena a tutti gli animali acquistati
Assenza di quarantena	Aumento	Acquistare animali giovani anzich� adulti
Stabulazione libera degli animali	Aumento	Rimuovere frequentemente le lettiere
Mancata pulizia e disinfezione dei box parto	Aumento	• Pulire e disinfettare i box parto • Rimuovere subito dal box placenta ed invogli fetali • Usare box parto singoli
Il veterinario aziendale non usa misure di biosicurezza	Aumento	• Utilizzare camici a perdere e calzari monouso • Pulire e disinfettare le calzature usate in stalla al termine delle attivit�
Presenza di ovicapri in azienda	Aumento	• Ridurre le possibilit� di contatto degli ovicapri con i bovini • Evitare il contatto per via diretta o indiretta dei bovini con feci, placente e aborti degli ovicapri
Pulizia e rimozione frequente della lettiera delle cuccette	Diminuzione	Pulire frequentemente le cuccette
Sistema di mungitura robotizzato	Diminuzione	Ridurre i tempi di contatto e assembramento delle vacche durante la mungitura con impianti tradizionali

Figura 3: Fattori a livello aziendale che sono risultati significativamente associati con la presenza di sieropositivit  negli animali, effetti riscontrato sull'associazione e misure preventive consigliate per ridurre la diffusione dell'agente eziologico in azienda (modificato da Epidemiology of Q fever in cattle. In "The principles and practice of Q fever. The one health paradigm". Jo o Sim es, Sofia Anastácio, Gabriela Jorge da Silva editors, Nova Science Publishers, New York (NY, USA) 2017)

ticolare ovicapri

- ✓ evitare l'uso di pascoli promiscui con ovicapri
- ✓ prevedere adeguati tempi di maturazione delle deiezioni prima di effettuare lo spandimento nei campi ed eventualmente ricorrere alla neutralizzazione di *C. burnetii* mediante trattamento con calcio cianamide al 0,4%

A
IV

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi caso controllo

Misura di controllo	Modalità di applicazione
Riduzione acquisto animali	• programmare adeguata presenza di rimonta • uso seme sessato • applicazione programmi per la riproduzione
Periodo quarantena animali acquistati	• prevedere box specifici per la quarantena • mungere gli animali acquistati per ultimi • separare in box apposito gli animali acquistati al momento del parto e nei 7 giorni successivi • pulire e disinfettare le aree di permanenza degli animali acquistati dopo il loro trasferimento nella mandria • isolare e testare gli animali acquistati in caso di aborto, metrite post-partum o ipofertilità
Applicare misure di biosicurezza al parto	• usare per il parto dei box individuali • rimuovere dai box parto placenta e invogli fetali • pulire, disinfettare e preparare con paglia pulita i box parto prima d'inserire nuovi animali
Applicare misure di biosicurezza negli animali in lattazione a stabulazione libera	• suddividere la mandria in gruppi evitando la costituzione di gruppi molto numerosi • rimuovere frequentemente la lettiera dai box e dalle cuccette • evitare di lasciare le vacche in sala attesa per lungo tempo prima della mungitura
Applicare misure di biosicurezza per il personale esterno che entra in contatto con gli animali (veterinari, tecnici mangimisti, etc.)	• predisporre un sistema di controllo degli accessi che impedisca accessi non autorizzati • prevedere la disponibilità di calzari e vestiario monouso • per il veterinario predisporre vestiario e tuta solo per l'allevamento • predisporre una adeguata procedura di pulizia e disinfezione delle calzature
Evitare il contatto con ovicapri	• evitare quando possibile la coabitazione fra le due specie • in caso di presenza di ovicapri in azienda compartimentare le due aree evitando tutti i contatti diretti fra le due specie • prevedere l'uso di attrezzature e vestiario diverso fra i due settori dell'azienda • in caso di uso del pascolo delimitare il pascolo dei bovini con sistema elettrificato in modo da evitare che gli ovini possano accedere al pascolo dei bovini
Controllare lo spandimento delle deiezioni	• prevedere adeguati tempi di maturazione delle deiezioni prima di effettuare lo spandimento nei campi • ricorrere alla neutralizzazione di <i>C. burnetii</i> mediante trattamento con calcio cianamide al 0,4%

Figura 4: Gestione e controllo dell'infezione da *C. burnetii* in allevamento, misure di controllo e modalità di applicazione

Negli allevamenti a stabulazione libera, che presentano un rischio più alto d'infezione secondo Paul et al. (2012), va prevista una frequente rimozione delle deiezioni, per cui nel caso sia presente una o più ruspette, queste vanno attivate almeno 5-6 volte al giorno. Inoltre in questa tipologia d'allevamento potrebbe essere utile compartimentare gli animali in un numero maggiore di box, in modo da ridurre la frequenza dei contatti, in particolare fra le primipare e le pluripare. A tale fine può essere utile tenere separate le primipare dalle altre durante la fase dell'asciutta e nel primo mese di lattazione.

Nel caso di acquisto di animali da altre aziende va tenuto conto che un singolo controllo sierologico potrebbe essere non significativo, in particolare per gli animali giovani. In questo caso sarebbe opportuno ricontrollare gli animali dopo per il parto per verificare l'eventuale comparsa di sieropositività.

9.2. Vaccinazione

E' disponibile un solo vaccino registrato per la specie bovina il Coxevac®, prodotto da CEVA salute Animale s.p.a. Il vaccino, inattivato e non adiuvato, è prodotto a partire dal ceppo Nine Mile in fase I, è registrato anche per l'utilizzo nei caprini.

Una revisione sistematica effettuata sull'efficacia dei vaccini in fase I (O'Neill et al., 2014) ha evidenziato che la maggior parte delle pubblicazioni riportano che la vaccinazione preventiva è in grado solo di ridurre gli effetti clinici della malattia e la probabilità d'eliminazione di *C. burnetii* negli animali infetti. In un solo studio (Hogerwerf et al., 2011) veniva rilevata anche la capacità del vaccino di prevenire anche l'infezione degli animali nei caprini.

Nei bovini la vaccinazione con Coxevac® protegge gli animali dall'infezione o in ogni caso, riduce l'eliminazione di *C. burnetii*. In particolare le bovine non infette e non gravide quando vaccinate hanno una probabilità 5 volte più bassa di diventare eliminatrici di *C. burnetii* rispetto alle bovine non vaccinate (Guatteo et al., 2008). Al contrario le vacche vaccinate durante la gravidanza mantengono inalterata la probabilità di diventare eliminatrici se infettate da *C. burnetii*. La minor efficacia del vaccino durante la gravidanza è legato all'effetto negativo che esercita lo stato gravidico sulla risposta immunitaria cellulo-mediata. Va sottolineato che solo a causa di questa minore efficacia la vaccinazione è sconsigliata negli animali gravidi, poiché non sono stati evidenziati effetti teratogeni od abortigeni conseguenti alla somministrazione del vaccino (Guatteo et al. 2008).

Diversi studi hanno evidenziato che il vaccino non è in grado di arrestare l'escrezione di *C. burnetii* nelle vacche già infettate dal microrganismo (Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009b). Al momento non esistono test diagnostici in grado di differenziare gli animali vaccinati da quelli infetti. La principale efficacia dimostrata dalla vaccinazione è la prevenzione dei segni clinici, in particolare l'aborto, e la diminuzione delle perfor-

mance riproduttive conseguenti alla malattia (Guatteo et al., 2008; EFSA, 2010; Guatteo et al., 2012).

Sulla base delle evidenze scientifiche oggi presenti nelle mandrie a rischio d'infezione da *C. burnetii* è raccomandabile vaccinare gli animali non infetti e non durante la gravidanza. Ai fini pratici pertanto conviene selezionare gli animali giovani in quanto meno a rischio d'infezione. In questi soggetti la vaccinazione è in grado di limitare l'escrezione del microrganismo e prevenire la comparsa dei sintomi clinici e subclinici connessi alla malattia.

A
III

Comportamento o intervento fortemente raccomandato In base a studi di coorte

9.3. Trattamento con antimicrobici degli animali infetti

Negli ovicapri il trattamento antibiotico si è dimostrato meno efficace che nell'uomo, in particolare per prevenire o ridurre l'escrezione di *C. burnetii* (Blain, 2006; Astobiza et al., 2010b).

Nei bovini l'impiego della terapia antibiotica viene in alcuni casi applicato durante il periodo d'asciutta nelle vacche da latte per ridurre il picco di eliminazione al parto e la comparsa di aborti tardivi. Il protocollo più applicato consiste in due somministrazioni di ossitetraciclina (20 mg/kg) nell'ultimo mese di gestazione (Arricau-Bovery e Rodolakis, 2005). Il trattamento con le tetracicline è risultato associato ad un minor rischio di eliminazione di *C. burnetii* nel muco vaginale al parto, ma non aveva alcun effetto sulla quantità di batteri escreti (Taurel et al., 2012).

Sulla base delle attuali conoscenze il trattamento antibiotico degli animali in asciutta a fine preventivo è sconsigliato perché risultato inefficace a ridurre in modo sostanziale sia entità che la durata dell'eliminazione di *C. burnetii* da parte degli animali infetti (EFSA, 2010).

A
I

Comportamento o intervento fortemente raccomandato in base a più studi clinici randomizzati e controllati, o revisioni sistematiche



10. Quadro normativo nazionale

10. Quadro normativo nazionale

La Febbre Q è una malattia denunciabile inclusa fra quelle contemplate dall'articolo 1 del regolamento di polizia veterinaria 320/1954 e successive modifiche. Nei casi di sospetto della malattia si applicano quindi le disposizioni previste dall'articolo 9. In caso di conferma del sospetto di malattia si applicano le disposizioni espressamente previste per questa malattia previste dall'articolo 5, che prevede la segnalazione del caso anche al servizio di igiene pubblica del Dipartimento di prevenzione. Inoltre dopo la conferma della malattia si applicano i provvedimenti previsti dall'articolo 10 del regolamento di polizia veterinaria come meglio specificati dall'articolo 142. Questi provvedimenti vanno applicati solo nel caso in cui vengano accertati casi di febbre Q nell'uomo, poiché il legislatore ha riservato l'adozione dei provvedimenti restrittivi previsti dall'articolo 142 solo ai casi l'infezione dell'allevamento sia stata causa d'insorgenza di un caso di malattia nell'uomo.

**> BIBLIOGRAFIA CONSULTATA
E NORME TECNICHE E LEGISLATIVE CITATE**

> Bibliografia

1. Agger J.F. e Paul S. (2014). Increasing prevalence of *Coxiella burnetii* seropositive Danish dairy cattle herds. *Acta Vet. Scand.*; 56: 46 doi:10.1186/s13028-014-0046-2
2. Aitken I.D. (1989). Clinical aspects and prevention of q fever in animals. *Eur J Epidemiol.*; 5: 420-424
3. Akporiaye E.T. and Baca O.G. (1983). "Superoxide anion production and superoxide dismutase and catalase activities in *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.*; 154: 520-523
4. Alsaleh A., Fieni F., Moreno D., Rousset E., Tainturier D., Bruyas J.F., Pellerin J.L. 2014. Risk of *Coxiella burnetii* transmission via embryo transfer using in vitro early bovine embryos. *Theriogenology* 81:849-853
5. Alvarez J., Perez A., Mardones F.O., Pérez-Sancho M., García-Seco T., Pagés E., Mirat F., Díaz R., Carpintero J., Domínguez L. (2012). Epidemiological factors associated with the exposure of cattle to *Coxiella burnetii* in the Madrid region of Spain. *Vet. J.*; 194: 102-07
6. Amano, K.I., Williams, J.C., (1984). Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.*; 160: 994-1002
7. Angelakis E., Raoult D. (2010). Q fever review. *Vet. Microbiol.*; 140: 297-309
8. Arricau-Bouvery N., Souriau A., Moutoussamy A., Ladenise K., Rodolakis A., (2001). Étude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique. *Renc. Rech. Ruminants*; 8: 153-156
9. Arricau-Bouvery N., Rodolakis A. (2005). Is Q fever an emerging or reemerging zoonosis? *Vet. Res.*; 36: 327-49
10. 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
11. Arricau-Bouvery N., Hauck Y., Bejaoui A., Frangoulidis D., Bodier C., Souriau A., Meyer H., Neubauer H., Rodolakis A., Vergnaud G. (2006). Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiol.*; 6: 38
12. Astobiza I., Barandika J.F., Ruiz-Fons F., Hurtado A., Povedano I., Juste R.A., García-Pérez A.L. (2010a). *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res. Vet. Sci.*; 91: 58-63
13. Astobiza I., Barandika J.F., Hurtado A., Juste R.A., García-Pérez A.L. (2010b). Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *Vet. J.*; 184: 172-175
14. Astobiza I., Tilburg J.J.H.C., Piñero A., Hurtado A., García-Pérez A.L., Nabuurs-Franssen M.H., Klaassen, C.H.W. (2012a). Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain, *BMC Vet. Res.*; 8: 241. doi: 10.1186/1746-6148-8-241
15. Astobiza I., Ruiz-Fons F., Pinero A., Barandika J.F., Hurtado A., García-Pérez A.L. (2012b). Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *J. Dairy Sci.*; 95: 1632-38
16. Autio T., Skrzypczak T., Pohjanvirta T., Pelkonen S. (2010). Low prevalence of *Coxiella burnetii* (Q-fever) antibodies in dairy herds in Finland Proceedings of XXVI World Buiatrics Congress, Santiago, Chile 14-18 November 2010
17. Ayres, J. G., Flint N., Smith E.G., Tunnicliffe W.S., Fletcher T.J., Hammond K., Ward D., Marmion B.P. (1998). Post-infection fatigue syndrome following Q fever. *Q. J. Med.*; 91: 105-123
18. Babudieri B, Moscovici C. (1952). Experimental and natural infection of birds by *Coxiella burnetii*. *Nature.*; 169: 195-196

19. Babudieri B. (1953). *Epidemiology, diagnosis, and prevention of Q fever. Rendiconti - Istituto Superiore di Sanità*; 16: 544-586
20. Barberio A., Badan M., Pozzato N., Ceglie L., S., Vicenzoni G. (2009). Retrospective study on dairy cows infective abortions in North-east of Italy from 2005 to 2008. *Proceedings of the European Buiatric Forum, Marseille 1-3 December 2009*, pag. 269
21. Barberio A., Badan M., Ceglie L., Capello K., Comin A., Longo A., Natale A. (2010). Apparent prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in bulk tank milk of dairy herds in the province of Vicenza, North-east of Italy. *Proceedings of XXVI World Buiatrics Congress, Santiago, Chile 14-18 November 2010*
22. Barberio A., Vicenzoni G. *Infezioni e fertilità - Febbre Q*, pag. 183-190. In *Gestione clinica della riproduzione bovina, 1a edizione a cura di Giovanni Sali*. Edito da Le Point Veterinarie Italie, Milano 2013
23. Barlow J., Rauch B., Welcome F., Kim S.G., Dubovi E., Schukken Y. (2008). Association between *Coxiella burnetii* shedding in milk and subclinical mastitis in dairy cattle. *Vet. Res.*; 39: 23
24. Beck M.D., Bell J.A. 1949. Q fever studies in southern California; an epidemiological study of 300 cases. *Public Health Rep.* 64:41-56
25. Benson W.W., Brock D.W., Mather J. 1963. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a Q fever infected herd. *Public Health Rep.* 78:707-10
26. Bernit E., Pouget J., Janbon F., Dutronc H., Martinez P., Brouqui P., Raoult D. (2002). Neurological involvement in acute Q fever: a report of 29 cases and review of the literature. *Arch. Intern. Med.*; 162: 693-700
27. 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
28. Berri M., Souriau A., Crosby M., Crochet D., Lechopier P., Rodolakis A. (2001). Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet. Rec.*; 148: 502-505
29. Berri M., Rousset E., Champion J.L., Arricau-Bouvery N., Russo P., Pepin M., Rodolakis A. (2004). Ovine manure used a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. *Vet. Rec.*; 153: 269-270
30. Berri M., Rousset E., Champion J.L., Russo P., Rodolakis A. (2007). Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Res. Vet. Sci.*; 83: 47-52
31. Bildfell R.J., Thomson, G.W., Haines, D.M., McEwen, B.J., Smart, N. (2000). *Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. *J. Vet. Diag. Invest.* 12: 419-425
32. Blain S. (2006). Q fever control in dairy goats. *Point Veterinaire*; 37: 36-40
33. Boschini A., Di Perri G., Legnani D., Fabbri P., Ballarini P., Zucconi R., Boros S., Rezza G. (1999). Consecutive epidemics of Q fever in a residential facility for drug abusers: impact on persons with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.*; 28: 866-872
34. 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 phasespecific ELISAs in an infected dairy herd. *Vet. Microbiol.*; 151: 291-300
35. Burnet F.M., Freeman M. (1983). Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Rev. Infect. Dis.*; 5: 800-808
36. Cabassi C.S., Taddei S., Donofrio G., Ghidini F., Piancastelli C., Flammini C.F., Cavirani S. (2006) Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *New Microbiol.*; 29: 211-214
37. Capo C., Amirayan N., Ghigo E., Raoult D., Mege J-L. (1999a). Circulating cytokine balance and activation markers of leucocytes in Q fever. *Clin. Exp. Immunol.*; 115:120-123
38. Capo C., Lindberg F.P., Meconi S., Zaffran Y., Tardei G., Brown E.J., Raoult D., Mege J-L. (1999b). Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between v-3 integrin and CR3. *J. Immunol.*; 163: 6078-6085

39. Capo C. and Mege J-L. Role of innate and adaptive immunity in the control of Q fever. pag. 273-286. In *Coxiella burnetii: recent advances and new perspectives in research of the Q fever bacterium*. Editors: Toman R., Samuel J.E., Mege J-L., Capo C. Springer, Dordrecht (Germany), 2012
40. Caporale G., Mirri A., Rosati T. (1953) La Febbre "Q" quale zoonosi. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*; 7: 13-96
41. Ceglie L., Guerrini E., Rampazzo E., Barberio A., Tilburg J.J.H.C., Lucchese L., Zuliani F., Marangon S., Natale A. (2015). Molecular characterization by MLVA of *Coxiella burnetii* strains infecting dairy cows and goats of North-Eastern Italy. *Microbes Infect.*; 17: 776-781
42. Commission on acute respiratory diseases. (1946). Epidemics of Q fever among troops returning from Italy in the spring of 1945. *Am J Hyg.*, 44: 88-102
43. Cox H.R. (1941). Cultivation of *Rickettsiae* of the rocky mountain spotted fever, typhus and Q fever groups in the embryonic tissues of developing chicks. *Science*; 94: 399-403
44. Cox H.R., Tesar W.C., Irons J.V. (1947). Q fever in the United States; isolation and identification of *Rickettsias* in an outbreak among stock handlers and slaughterhouse workers. *J. Am. Med. Assoc.*; 133: 820
45. Courcoul A, Vergu E, Denis JB, et al. (2010). Spread of Q fever within dairy cattle herds: key parameters inferred using a Bayesian approach. *Proc. Biol. Sci.*; 277: 2857-65
46. Czaplicki G., Houtain J-Y., Mullender C., Manteca C., Saegerman C. (2009). Bulk tank milk, reliable tool for diagnosing Q fever? *Epidemiol. Santé Anim.*; 56: 117-127
47. D'Amato F., Eldin C., Raoult D. (2016). The contribution of genomics to the study of Q fever. *Future Microbiol.*; 11: 253-72
48. De Cremoux R., Rousset E., Touratier A., Audusseau G., Nicollet P., Ribaud D., David V., Le Pape M. (2012a). *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
49. De Cremoux R., Rousset E., Touratier A., Audusseau G., Nicollet P., Ribaud D., David V., Le Pape M. (2012b). Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; 64: 104-106
50. Dellacasagrande J., Ghigo E., Capo C., Raoult D., Mege J.L. (2000). *Coxiella burnetii* survives in monocytes from patients with Q fever endocarditis: involvement of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.*; 68: 160-64
51. Derrick E.H. (1973). The course of infection with *Coxiella burnetii*. *Med. J. Aust.*; 1: 1051-1057
52. Desnues B., Imbert G., Raoult D., Mege J. L., Ghigo E. (2009). Role of specific antibodies in *Coxiella burnetii* infection of macrophages. *Clin. Microbiol. Infect.*; 15: 161-162
53. Dumler S.J. (2002). Q fever. *Curr. Treat. Options Infect. Dis.*; 4: 437-45
54. Duquesne V., Sidi-Boumedine K., Prigent M., Tylewska-Wierzbanska S., Chmielewski T., Krogfelt K., No-termans D.W., DeVries M., McCaughey C., Frangoulidis D., Thiery R. (2008). A multicenter PCR-ring trial for *C. burnetii* detection in veterinary clinical samples: an approach to standardization of methods. In: 4th Annual scientific meeting Med-Vet-Net. 11-14 June 2008, St Malo, France
55. Dyer R.E. (1949). Q fever; history and present status. *Am. J. Public. Health Nations Health*; 39: 471-477
56. ECDC (European center for disease prevention and control). (2010). ECDC technical report: Risk assessment on Q fever. Stockholm, May 2010. ISBN 978-92-9193-210-8 doi:10.2900/28860
57. EFSA (European Food Safety Authority). (2010). Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Scientific Opinion on Q Fever. *EFSA Journal* 2010, 8 (5), 1595, 114 pp. doi:10.2903/j.efsa.2010.1595. Available on line at: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1595.pdf
58. El-Mahallawy H.S., Lu G., Kelly P., Xu D., Li Y., Fan W., Wang C. (2015). Q fever in China: a systematic review, 1989-2013 *Epidemiol. Infect.*; 143: 673-81
59. EMA (European Medicines Agency): Committee for Medicinal Products for Veterinary Use. (2010). Summary of Opinion -Coxevac. EMA Opinion, Pending EC decisions. EMA.401721.2010. Available on line at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion/Initial_authorisation

- tion/veterinary/000155/WC500094743.pdf
60. 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
 61. Eurosurveillance editorial team. (2010). Surveillance report. annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Available on line at: http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1011_sur_annual_epidemiological_report_on_communicable_diseases_in_europe.pdf. Updated 2010
 62. Faugaret D., BenAmara A., Alingrin J., Dumas A., Delaby A., Lépolard C., Raoult D., Textoris J., Mège J.L. (2014). Granulomatous response to *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever: the lessons from gene expression analysis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*; 4: 172. DOI=10.3389/fcimb.2014.00172
 63. Fenollar F., Fournier P., Carrieri M.P., Habib G., Messana T., Raoult D. (2001). Risks factors and prevention of Q fever endocarditis. *Clin. Infect. Dis.*; 33: 312–316
 64. Fishbein D.B. and Raoult D. 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47:35–40
 65. Forland F., Jansen A., de Carvalho Gomes H., Nøkleby H., Escriva A-B., Coulombier D., Giesecke J. (2010). Risk assessment on Q fever. Available on line at: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1005_TER_Risk_Assessment_Qfever.pdf
 66. Fournier P.E., Marrie T.J., Raoult D. (1998). Diagnosis of Q fever. *J. Clin. Microbiol.*; 36: 1823–1834
 67. Fournier P., Etienne J., Harle J., Habib G., Raoult D. (2001). Myocarditis, a rare but severe manifestation of Q fever: Report of 8 cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*; 32: 1440–1447
 68. Frangoulidis D., Meyer H., Kahlhofer C., Splettstoesser W.D. (2012). 'Real-time' PCR-based detection of *Coxiella burnetii* using conventional techniques. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; 64: 134–136
 69. Frangoulidis D., Walter M.C., Antwerpen M., Zimmermann P., Janowitz B., Alex M., Bottcher J., Henning K., Hilbert A., Ganter M., Runge M., Munsterkötter M., Splettstoesser W.D., Hanczaruk M. (2014). Molecular analysis of *Coxiella burnetii* in Germany reveals evolution of unique clonal clusters. *Int. J. Med. Microbiol.*; 304: 868–76
 70. Garcia-Ispuerto, I., Nogareda, C., Yaniz, J., Almeria, S., Martinez-Bello, D., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., Lopez-Gatius, F. 2010. Neospora caninum and *Coxiella burnetii* seropositivity are related to endocrine pattern changes during gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 74: 212–220
 71. Garcia-Ispuerto I, López-Helguera I, Tutusaus J, et al. (2013). *Coxiella burnetii* shedding during the peripartum period and subsequent fertility in dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.*; 2013; 48: 441–6
 72. Georgiev M., Afonso A., Neubauer H., Needham H., Thiéry R., Rodolakis A., Roest H.J., Stärk K.D., Stegeman J.A., Vellema P., van der Hoek W., More S.J. (2013). Q fever in humans and farm animals in four European countries, 1982 to 2010. *Euro Surveill.*; 18: pii=20407. Available online at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20407>
 73. Gikas A., Kofteridis D.P., Manios A., Pediaditis J., Tselentis Y. (2001). Newer macrolides as empiric treatment for acute Q fever infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 45: 3644–3646
 74. Guatteo R., Beaudeau F., Berri M., Rodolakis A., Joly A., Seegers H. (2006). Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.*; 37: 827–833
 75. Guatteo R., Beaudeau F., Joly A., Seegers H. (2007). *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.*; 38: 849–860
 76. 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: 4320–4328
 77. Guatteo R., Seegers H., Taurel A.F., Joly A., Beaudeau F. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review. *Vet. Microbiol.*; 149: 1–16
 78. Guatteo R., Joly A., Beaudeau F. (2012). Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with C. burnetii DNA detection. *Vet. Microbiol.*; 155: 430–433

79. Hackstadt T., Williams J.C. (1981). Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.*; 78: 3240-3244
80. Hansen M.S., Rodolakis A., Cochonneau D., Agger J.F., Christoffersen A.B., Jensen T.K., Agerholm J.S. (2011). *Coxiella burnetii* associated placental lesions and infection level in parturient cows. *Vet. J.*; 190: 135-139
81. Harris R.J., Storm P.A., Lloyd A., Arens M., Marmion B.P. (2000). Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. *Epidemiol. Infect.*; 124: 543-549
82. Heinzen R.A., Hackstadt T., (1996). A developmental stage-specific histone H1 homolog of *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.*; 178: 5049-5052
83. Heinzen R.A., Hackstadt T., Samuel J.E. (1999). Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.*; 7: 149-154
84. Hellenbrand W., Schonenberg I., Pfaff G., Kramer M., Steng G., Reintjes R., Breuer T. (2005). The relevance of *Coxiella burnetii* infections in animals for Q fever in humans - measures for prevention and control. *Tierärztl. Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere*; 33: 5-11
85. Hellenbrand W., Schöneberg I., Pfaff G., Kramer M., Steng G., Reintjes R., Breuer T. (2009). Die Relevanz der Coxiellose bei Tieren für das Q-Fieber beim Menschen – Möglichkeiten der Kontrolle und Prävention. *Tierärztl. Praxis*; 33: 5-11
86. Hendrix L.R., Samuel J.E., Mallavia I.P. (1991). Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by analysis of restriction-endonuclease digested DNA separated by SDS-PAGE. *Journal of General Microbiology*; 137: 269-276
87. Hilbink, F., Penrose, M., Kovacova, E., Kazar, J.; (1993). Q fever is absent from New Zealand. *Int. J. Epidemiol.*; 22: 945-949
88. Hogerwerf L., van den Brom R., Roest H.J.J., Bouma A., Vellema P., Pieterse M., Derksen D., Nielen M. (2011): Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*; 17: 379-386
89. Honstette A., Ghigo E., Moynault A., Capo C., Toman R., Akira S., Takeuchi O., Lepidi H., Raoult D., Mege J.L. (2004). Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.*; 172: 3695-3703
90. Hoover T.A., Vodkin M.H., Williams J.C. (1992). A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J. Bacteriol.*; 174: 5540-5548
91. 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
92. Houpihan P, Raoult D. (2005). Blood culture-negative endocarditis in a reference center: Etiologic diagnosis of 348 cases. *Medicine*; 84: 162-173
93. Htwe K.K., Amano K., Sugiyama Y., Yagami K., Minamoto N., Hashimoto A., Yamaguchi T., Fukushi H., Hirai K. (1992). Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* in domestic and companion animals in Japan. *Vet. Rec.*; 131: 21 490doi:10.1136/vr.131.21.490
94. Humpres R.C., Hinrichs D.J. (1981). Role of antibody in *Coxiella burnetii* infection. *Infect. Immun.*; 31: 641-645
95. Jäger C., Willems H., Thiele D., Baljer G. (1998). Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates. *Epidemiol. Infect.*; 120: 157-164
96. Jones R.M., Hertwig S., Pitman J., Vipond R., Aspán A., Bölske G., McCaughey C., McKenna J.P., van Rotterdam B.J., de Bruin A., Ruuls R., Buijs R., Roest H.J., Sawyer J. (2011). Interlaboratory comparison of real-time polymerase chain reaction methods to detect *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever. *J. Vet. Diagn. Invest.*; 23: 108-111

97. Khalili M., Sakhaee E., Reza Aflatoonian M., Shahabi-Nejad N. (2011). Herd-prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in dairy cattle farms based on bulk tank milk analysis. *Asian. Pac. J. Trop. Med.*; 4: 58-60
98. Karakousis P.C., Trucksis M., Stephen Dumler J. (2006). Chronic Q fever in the united states. *J. Clin. Microbiol.*; 44: 2283-2287
99. Kim S.G., Kim E.H., Lafferty C.J., Dubovi E. (2005). *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg. Infect. Dis.*; 11: 619-621
100. 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. *N.Z. Vet. J.*; 57: 262-268
101. Klaassen C.H.W., Nabuurs-Franssen M.H., Tilburg J.J.H.C., Hamans M.A.W.M., Horrevorts A.M. (2009). Multigenotype Q fever outbreaks, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*; 15: 613-614
102. Klee S.R., Ellerbrok H., Tyczka J., Franz T., Appel B. (2006). Evaluation of a real-time PCR assay to detect *Coxiella burnetii*. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1078: 563-565
103. Koster, F.T., Williams, J.C., Goodwin, J.S. (1985). Cellular immunity in Q fever. Specific lymphocyte unresponsiveness in Q fever endocarditis. *J. Infect. Dis.*; 152: 1283-1289
104. Krumbiegel E.R. and Wisniewski H.J. 1970. Q fever in the Milwaukee area. II. Consumption of infected raw milk by human volunteers. *Arch Environ Health* 21: 63-65
105. Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanska, S. 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res. Vet. Sci.* 62, 299-300
106. Lahuerta A., Westrell T., Takkinen J., Boelaert F., Rizzi V., Helwigh B., Borck B., Korsgaard H., Ammon A., Mäkelä P. (2011). Zoonoses in the european union: Origin, distribution and dynamics - the EFSA-ECDC summary report 2009. *Eurosurveillance*; 16: 13. Available on line at: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V16N13/art19832.pdf>
107. Lang G., Waltner-Toews D., Menzies P. (1991). The seroprevalence of Coxiellosis (Q fever) in Ontario sheep flocks. *Can. J. Vet. Res.*; 55: 139-142
108. Lockhart MG, Islam A, Fenwick SG, et al. Comparative sensitivity of four different cell lines for the isolation of *Coxiella burnetii* (2012). *FEMS Microbiol. Lett.*; 334: 75-8
109. Lopez-Gatius F., Almeria S., Garcia-Ispuerto I. (2012). Serological screening for *Coxiella burnetii* infection and related reproductive performance in high producing dairy cows. *Res. Vet. Sci.*; 93: 67-73
110. Lucchese L., Capello K., Barberio A., Zuliani F., Stegeman A., Ceglie L., Guerrini E., Marangon S., Natale A. 2015. IFAT and ELISA phase I/phase II as tools for the identification of Q fever chronic shedders in cattle. *Vet. Microbiol.* 179:102-08. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.010
111. Magnino S., Vicari N., Boldini M., Rosignoli C., Nigrelli A., Andreoli G., Pajoro M., Fabbì M. (2009) Rilevamento di *Coxiella burnetii* nel latte di massa di alcune aziende bovine lombarde. *Large Animal Review*; 15: 3-6
112. Maltezos H.C., Raoult D. (2002). Q fever in children. *Lancet Infectious Diseases*; 2: 686-691
113. Manfredi Selvaggi T., Rezza G., Scagnelli M., Rigoli R., Rassa M., De Lalla F., Pellizzer G.P., Tramarin A., Bettini C., Zampieri L., Belloni M., Pozza E.D., Marangon S., Marchioretto N., Togni G., Giacobbo M., Todescato A., Binkin N. (1996). Investigation of a Q-fever outbreak in northern Italy. *Eur. J. Epidemiol.*; 12: 403-8
114. Marmion B.P., Ormsbee R.A., Kyrkou M., Wright J., Worswick D.A., Izzo A.A., Esterman A., Feery B., Shapir R.A. (1990). Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever: Eight years experience in Australian abattoirs. *Epidemiol. Infect.*; 104: 275-287
115. Marmion B.P., Storm P.A., Ayres J.G., Semendric L., Mathews L., Winslow W., Turra M., Harris R.J. (2005).

- Long-term persistence of *Coxiella burnetii* after acute primary Q fever. *Q.J.M.*; 98: 7–20. doi: 10.1093/qjmed/hci009
116. Marrie T.J., Durant H., Williams J.C., Yates L. (1988). Exposure to parturient cats is a risk factor for acquisition of Q fever in Maritime Canada. *J. Infect. Dis.*; 158: 101–108
 117. Marrie T.J., Raoult D. (1997). Q fever-A review and issues for the next century. *Int. J. Antimicrob. Agents*; 8: 145–161
 118. Marrie T.J. (1998). Liver involvement in acute Q fever. *CHEST Journal*; 94: 896–896
 119. Marrie T.J. (2003). *Coxiella burnetii* pneumonia. *Eur. Respir. J.*; 21: 713–19
 120. Marrie T.J. (2007). Epidemiology of Q fever. Pages 281–289. In *Rickettsial Diseases*, edited by D. Raoult and P. Parola, Informa healthcare USA, New York
 121. Martin W.S., Meek A. H., Willeberg P. (1987). Measurement of disease frequency and production. Pages 48–76. In *Veterinary epidemiology principles and methods*. edited by Martin W.S., Meek A. H., Willeberg P., Iowa State University press, Ames, USA
 122. Martini M., Baldelli R., Paulucci De Calboli L. (1994). An epidemiological study on Q fever in the Emilia-Romagna Region, Italy. *Zentralbl. Bakteri.*; 280: 416–422
 123. Massung R.F., Cutler S.J., Frangoulidis D. (2012). Molecular typing of *Coxiella burnetii* (Q Fever). Pages 381–396. In *Coxiella burnetii: recent advances and new perspectives in research of the Q fever bacterium*. Editors: Toman R., Samuel J.E., Mege J-L., Capo C. Springer, Dordrecht, Germany
 124. Maurin M., Raoult D. (1999). Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.*; 12: 518–553
 125. McCaughey C., Murray L.J., McKenna J.P., Menzies F.D., McCullough S.J., O'Neill H.J., Wyatt D.E., Cardwell C.R., Coyle P.V. 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol. Infect.* 138:21–27. doi:10.1017/S0950268809002854
 126. McCaul T.F., Williams J.C., (1981). Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *J. Bacteriol.*; 147: 1063–1076
 127. McCaul T.F., Banerjee-Bhatnagar N., Williams J.C. (1991). Antigenic differences between *Coxiella burnetii* cells revealed by postembedding immunoelectron microscopy and immunoblotting. *Infect. Immun.*; 59: 3243–3253
 128. McGavin M.D., Zachary J.F. (2006). *Pathologic basis of veterinary disease*. Elsevier Health Sciences; 2006
 129. McQuiston J.H., Childs J.E. (2002). Q fever in humans and animals in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.*; 2: 179–191
 130. Mege J.L. (2007). Immune response to Q fever. Pages 271–280. In *Rickettsial Diseases*, edited by D. Raoult and P. Parola, Informa healthcare USA, New York
 131. Mertens K., Samuel J.E. (2007). Bacteriology of *Coxiella*. Pages 257–270. In *Rickettsial Diseases*, edited by D. Raoult and P. Parola, Informa healthcare USA, New York
 132. Micusan, V.V., Borduas, A.G. (1977). Biological properties of goat immunoglobulins. *J. Immunology*; 32: 373–381
 133. Mo Y. Y., Cianciotto N. P., Mallavia L.P. (1995). Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiology*; 141: 2861–2871
 134. Moretti B. (1984). La Febbre Q nei bovini con particolare riguardo alla colonizzazione di *Coxiella Burnetii* nella mammella. *Ann. Ist. Super. Sanità*; 20: 317–328
 135. Mori M., Boarbi S., Michel P., Bakinahe R., Rits K., Wattiau P., Fretin D. (2013). In vitro and in vivo infectious potential of *coxiella burnetii*: a study on Belgian livestock isolates. *PLoS One*; 8: e67622 doi: 10.1371/journal.pone.0067622
 136. Muskens J., van Maanen C., Mars M.H. (2011). Dairy cows with metritis: *Coxiella burnetii* test results in uterine, blood and bulk milk samples. *Vet. Microbiol.*; 147: 186–189

137. Natale A., Bucci G., Capello K., Barberio A., Tavella A., Nardelli S., Marangon S., Ceglie L. (2012). Old and new diagnostic approaches for the diagnosis of Q fever: correlation among complement fixation test, ELISA and molecular analyses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*; 35: 375–379
138. Natale A., Ceglie L., Lucchese L., Zuliani F., Marangon S., Barberio A. (2017) Diagnostic approach to *Coxiella burnetii* infection in animals. In *The principles and practice of Q fever. The one health paradigm.* João Simões, Sofia Anastácio, Gabriela Jorge da Silva editors, Nova Science Publishers, New York (NY, USA)
139. National Mastitis Council. (1999). *Laboratory handbook on bovine mastitis – Revised Edition* National Mastitis Council, Madison, WI. USA
140. Nicollet P. e Valognes A. (2007). Current review of Q fever diagnosis in animals. *Bulletin de l'Academie Veterinaire de France*; 160: 289-295
141. Niemczuk K., Szymańska-Czerwińska M., Śmietanka K., Bocian L. (2014). Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. *Vet. Microbiol.*; 171: 147–152
142. Nogareda C., Almería S., Serrano B., García-Ispuerto I., López-Gatius F. (2012). Dynamics of *Coxiella burnetii* antibodies and seroconversion in a dairy cow herd with endemic infection and excreting high numbers of the bacterium in the bulk tank milk. *Res. Vet. Sci.*; 93: 1211–1212
143. Nusinovič S., Frössling J., Widgren S., Beaudeau F., Lindberg A. (2015). Q fever infection in dairy cattle herds: increased risk with high wind speed and low precipitation. *Epidemiol. Infect.*; 143: 3316–26
144. OIE (2015). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Sixth Edition*. Chapter 2.1.12. Available on line at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.12_Q_FEVER.pdf
145. Ohlson A., Malmsten J., Frössling J., Bölske G., Aspán A., Dalin A-M, Lindberg A. (2014). Surveys on *Coxiella burnetii* infections in Swedish cattle, sheep, goats and moose. *Acta Vet. Scand.*; 56: 39 doi:10.1186/1751-0147-56-39
146. O'Neill T.J., Sargeant J.M., Poljak Z. (2014). 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 and public health.*; 61: 519–33
147. Palmer, N.C., Kierstead, M., Key, D.W., Williams, J.C., Peacock, M.G., Vellend, H. (1983). Placentitis and abortion in goats and sheep in Ontario caused by *Coxiella burnetii*. *Canadian Veterinary Journal*; 24: 60–61
148. Pandit P., Hoch T., Ezanno P., Beaudeau F., Vergu E. (2016). Spread of *Coxiella burnetii* between dairy cattle herds in an enzootic region: modelling contributions of airborne transmission and trade *Vet. Res.*; 47: 48. doi: 10.1186/s13567-016-0330-4
149. Parisi A., Fraccalvieri R., Cafiero M., Miccolupo A., Padalino I., Montagna C., Capuano F., Sottili R. (2006) Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Vet. Microbiol.*; 118: 101-106
150. Paul S., Agger J.F., Markussen B., Bodil Christoffersen A., Agerholm J.S. (2012). Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows *Prev. Vet. Med.*; 107: 57– 64
151. Pearson T., Hornstra H.M., Hilsabeck R., Gates L.T., Olivas S.M., Birdsell D.M., Hall C.M., German S., Cook J.M., Seymour M.L., Priestley R.A., Kondas A.V., Clark Friedman C.L., Price E.P., Schupp J.M., Liu C.M., Price L.B., Massung R.F., Kersh G.J., Keim P. (2014). High prevalence and two dominant host-specific genotypes of *Coxiella burnetii* in U.S. milk. *BMC Microbiol.*; 14: 41
152. Perugini A.G., Capuano F., Esposito A., Marianelli C., Martucciello A., Iovane G., Galiero G. (2009) Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report. *Res. Vet. Sci.*; 87: 189-191
153. Philip C.B. (1952). Names for Q fever and its pathogenic agent. *Bulletin de la Société de pathologie exotique et de ses filiales.*; 45: 576-578.

154. Piñero A., Ruiz-Fons F., Hurtado A., Barandika J.F., Atxaerandio R., García-Pérez A.L. 2013. Changes in the dynamics of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97:2718–30
155. Pimenta L., Alegria N., Anastácio S., Sidi-Boumedine K., da Silva G., Rabiço A., Simões J. 2015. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Portuguese dairy cattle herds. *Trop. Anim. Health Prod.* 47:227–30. doi 10.1007/s11250-014-0679-1
156. Porter S. R., Czaplicki, Mainil J., Gutteo R., Saegerman C. (2011): Q fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int. J. Microbiol.* Article ID 248418, 22 pages, doi:10.1155/2011/248418
157. Prigent M., Rousset E., Yang E., Thiéry R., Sidi-Boumedine K. (2015). Validation study for using lab-on-chip technology for *Coxiella burnetii* multi-locus-VNTR-analysis (MLVA) typing: application for studying genotypic diversity of strains from domestic ruminants in France, *Microbes Infect.*; 17: 782-88
158. Rahimi E., Doosti A., Ameri M., Kabiri E., Sharifian B. (2010) Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. *Zoonoses Public Health*; DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01289.x
159. Raoult D. (1990). Host factors in the severity of Q fever. *Ann N.Y. Acad. Sci.*; 590: 33–8
160. Raoult D., Marrie T., Mege J. (2005). Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infectious Diseases*; 5: 219-226
161. Redd T., Thompson H.A. (1995). Secretion of proteins by *Coxiella burnetii*. *Microbiology*; 141: 363–369
162. Rodolakis A. (2006). Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small Rum. Res.*; 62: 121-124
163. Rodolakis, A. (2009). Q Fever in dairy animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*;1166: 90–93
164. Rodolakis A. (2011). *Biologia della Coxiella burnetii e risposta dell'ospite all'infezione*. *Rivista di Zootecnia e veterinaria*; 44: 3-10
165. Roest, H. I. J., Tilburg, J. J. H. C., Van der Hoek, W., Vellema, P., Van Zijderveld, F. G., Klaassen, C. H. W. and Raoult, D. (2011a): 'The Q fever epidemic in The Netherlands : history, onset, response and reflection', *Epidemiol. Infect.*; 139: 1-12
166. Roest H.I.J., Ruuls R.C., Tilburg J.J.H.C., Nabuurs-Franssen M.H., Klaassen C.H.W., Vellema P., Van den Brom R., Dercksen D., Wouda W., Spiereburg M.A.H., Van der Spek A.N., Buijs R., De Boer A.G., Willemsen P.T.J., Van Zijderveld F.G. (2011b) Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* from ruminants in Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*; 17: 668-675
167. Roest HJ, van Gelderen B, Dinkla A, et al. (2012). Q fever in pregnant goats: pathogenesis and excretion of *Coxiella burnetii*. *PLoS One*; 7: e48949. doi:10.1371/journal.pone.0048949
168. Roest HJ, Bossers A, Rebel JM. (2013) Q fever diagnosis and control in domestic ruminants. *Dev. Biol. (Basel)*; 135: 183-189
169. Roest H.I.J., Maassen C.B.M., van de Giessen A., van Zijderveld F.G. (2014): The Dutch Q fever situation - lessons learned? In: *Planet@Risk*, 2(3), Special Issue on One Health (Part I/II): 166-168, Davos: Global Risk Forum GRF Davos
170. 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
171. Rousset E., Berri M., Durand B., Dufour P., Prigent M., Delcroix T., Touratier A., Rodolakis A. (2009a). *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl. Environ. Microbiol.*; 75: 428–433
172. Rousset, E., Durand B., Champion J. L., Prigent M., Dufour P., Forfait C., Marois M., Gasnier T., Duquesne V., Thiery R. (2009b). Efficacy of a phase I vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically infected goat herd. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 188–189

173. Ryan E.D., Kirby M., Collins D.M., Sayers R., Mee J.F., Clegg T. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiol Infect*; 139: 1413–1417. doi:10.1017/S0950268810002530
174. Sabatier F., Dignat-George F., Mege J.L., Brunet C., Raoult D., Sampil J. (1997). CD4+ T-cell lymphopenia in Q fever endocarditis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*; 4: 89–92
175. Saegerman C., Dal Pozzo F., Warleta MG, et al. and Mercedes Mezo (2016). Bayesian assessment of an indirect ELISA for the detection of *Coxiella burnetii* antibodies in bovine sera and milk. Oral presentation presented at the symposium Current findings in Q fever; April 19-20; Brussels, Belgium; 2016
176. Samuel J.E., Kiss K., Varghees S. (2003). Molecular pathogenesis of *Coxiella burnetii* in a genomics era. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 990: 653–63
177. Sanchez, J., A. Souriau, A. J. Buendia, N. Arricau-Bouvery, C. M. Martinez, J. Salinas, A. Rodolakis, and J. A. Navarro. (2006). Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. *J. Comp. Pathol.*; 135: 108–115
178. Santos A.S. (2017). Human diagnostic and epidemiology of Q fever in Portugal. In *The principles and practice of Q fever. The one health paradigm*. João Simões, Sofia Anastácio, Gabriela Jorge da Silva editors, Nova Science Publishers, New York (NY, USA)
179. Schneeberger P.M., Wintenberger C., van der Hoek W., Stahl J.P. (2014). Q fever in the Netherlands – 2007–2010: What we learned from the largest outbreak ever. *Méd. Mal. Infect*; 44: 339–353
180. Schimmer B., Morroy G., Dijkstra F. Schneeberger P.M., Weers-Pothoff G., Timen A., Wijkman C., van der Hoek W. (2008). Large ongoing Q fever outbreak in the south of The Netherlands, 2008. *Euro Surveill*; 13: 18939. Available on line at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18939>
181. Schimmer B., Schotten N., van Engelen E., Hautvast J.L.A., Schneeberger P.-M., van Duynhoven Y.T.H.P. (2014). *Coxiella burnetii* Seroprevalence and Risk for Humans on Dairy Cattle Farms, the Netherlands, 2010–20. *Emerg. Infect. Dis.*; 20: 417–25. doi: 10.3201/eid2003.131111
182. Schmeer, N. (1985). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the demonstration of IgG1, IgG2 and IgM antibodies in bovine Q fever infection. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A*; 259: 20–34
183. Schumacher M., Janowetz B., Alex M., Hermülheim A., Böttcher J. (2011). IL10-neutralization increases in-vitro interferon- γ response to *Coxiella burnetii* in cattle. 2nd European CEVA Q fever meeting, Barcelona September 29th 2011; pag. 12
184. Scott GH, Williams JC, Stephenson EH. Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii* (1987). *J. Gen. Microbiol.*; 133: 691–700
185. Seshadri R., Hendrix L.R., Samuel J.E. (1999). Differential expression of translational elements by life cycle variants of *Coxiella burnetii*. *Infect. Immun.*; 67: 6026–6033
186. Shannon J.G., Cockrell D.C., Takahashi K., Stahl G.L., Heinzen R.A. (2009). Antibody-mediated immunity to the obligate intracellular bacterial pathogen *Coxiella burnetii* is Fc receptor- and complement-independent. *BMC Immunol.*; 10: 26.
187. 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 Supporting Publication 7(5):EN-48, 48 pp. doi:10.2903/sp.efsa.2010.EN-48 Available on line at: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/48e.pdf
188. Signs K.A., Stobierski M.G., Gandhi T.N. 2012. Q fever cluster among raw milk drinkers in Michigan, 2011. *Clin. Infect. Dis.* 55:1387–89
189. Simeoni M. Un medico condotto in Italia, il passato presente. Un'analisi qualitativa. Franco Angeli editore s.r.l, Milano, 2009, pag 201-208
190. Starnini G., Caccamo F., Farchi F., Babudieri S., Brunetti B., Rezza G. (2005). An outbreak of Q fever in a prison in Italy. *Epidemiol. infect.*; 133: 377–380

191. Stemmler M., Meyer H. (2002). Rapid and specific detection of *Coxiella burnetii* by LightCycler PCR. Pages 149-154. In: *Rapid cycle real-time PCR—Methods and applications*. Springer, Dordrecht, Germany
192. Sting R, Molz K, Philipp W, et al. (2013). Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats. *Vet. Microbiol.*; 167: 600-8
193. Svraka S., Toman R., Skultety L., Slaba K., Homan W.L. (2006). Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Lett.*; 254: 268–274
194. Taurel A-F, Guatteo R., Joly A., Seegers H., Beaudeau F. (2011). Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds, *Prev. Vet. Med.*; 101: 51-57.
195. Taurel A.F., Guatteo R., Joly A., Beaudeau F. (2012). Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows. *Vet. Microbiol.*; 159: 432–7
196. Tilburg J.J., Roest H.J., Nabuurs-Franssen M.H., Horrevorts A.M., Klaassen C.H.W. (2012a). Genotyping Reveals the Presence of a Predominant Genotype of *Coxiella burnetii* in Consumer Milk Products. *J. Clin. Microbiol.* 50:2156-58
197. Tilburg J.J.H.C., Rossen J.W.A., van Hannen E.J., Melchers W.J.G., Hermans M.H.A., van de Bovenkamp J., Roest H.J., de Bruin A., Nabuurs-Franssen M.H., Horrevorts A.M., Klaassen C.H. (2012b). Genotypic diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007-2010 Q fever outbreak episodes in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.*; 50: 1076-1078
198. Tissot-Dupont H, Raoult D. (1992). Epidemiology of Q fever. *Med. Mal. Infect.*; 22: 51-58
199. Tissot-Dupont H., Amadei M.A., Nezri M., Raoult D. (2004). Wind in November, Q Fever in December. *Emerg. Infect. Dis.* 10:1264–69
200. Tissot-Dupont H., Vaillant V., Rey S., Raoult D. (2007). Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. *Clin. Infect. Dis.*; 44: 232-237
201. Tissot-Dupont H. and Raoult D. (2007). Clinical aspects, diagnosis and treatment of Q fever. Pages 292-301. In *Rickettsial Diseases*, edited by D. Raoult and P. Parola, Informa healthcare USA, New York
202. 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
203. 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
204. Vaidya V.M., Malik S.V.S., Bhilegaonkar K.N., Rathore R.S., Kaur S., Barbuddhe S.B. 2010. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 307–21
205. Vanderburg S., Rubach M.P., Halliday J.E., Cleaveland S., Reddy E.A., Crump J.A. (2014). Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: a One-Health systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.*; 8: e2787
206. Van der Hoek W., Morroy G., Renders N. H.M., Wever P.C., Hermans M.H.A., Leenders A.C.A.P., Schneeberger P.M. (2012). Epidemic Q fever in humans in the Netherlands. In *Coxiella burnetii: recent advances and new perspectives in research of the Q fever bacterium*. Pages 329-364. Editors: Toman R., Samuel J.E., Mege J-L., Capo C. Springer, Dordrecht, Germany
207. van Engelen E., Schotten N., Schimmer B., Hautvast J.L.A., van Schaik G., van Duinhoven Y.T.H.P. (2014). Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing *Prev. Vet. Med.*; 117: 103–09
208. Vergnaud G., Pourcel C. (2006). Multiple locus VNTR (variable number of tandem repeat) analysis. Pages 83-104. In *Molecular identification, systematics, and population structure of prokaryotes*. Editor: Stackebrandt Erko, Springer Verlag Berlin Heidelberg Germany
209. Voth DE, Heinzen RA. Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii* (2007). *Cell. Microbiol.*; 9: 829-40
210. Waag D.M., England M.J., Pitt M.L.M. (1997). Comparative efficacy of a *Coxiella burnetii* chloroform-me-

- thanol residue (CMR) vaccine and a licensed cellular vaccine (Q-vax) in rodents challenged by aerosol. *Vaccine*; 15: 1779-1783
211. Wildman M.J., Smith E.G., Groves J., Beattie J.M., Caul E.O., Ayres J.G. (2002a). Chronic fatigue following infection by *Coxiella burnetii* (Q fever): Ten-year follow-up of the 1989 UK outbreak cohort. *Q.J.M. - Monthly Journal of the Association of Physicians*; 95: 527-538
 212. Wildman M.J., Ayres J.G. (2002b). Q fever: Still a mysterious disease. *Q.J.M. - Monthly Journal of the Association of Physicians*; 95: 833-834
 213. Williams J.C., Damrow T.A., Waag D.M., Amano K. (1986). Characterization of a phase I *Coxiella burnetii* chloroform-methanol residue vaccine that induces active immunity against Q fever in C57BL/10 ScN mice. *Infect Immun.*; 51: 851-858
 214. Williams J.C., 1991. Infectivity, virulence and pathogenicity of *Coxiella burnetii* for various hosts. pag 21-71. In *Q fever: the biology of Coxiella burnetii*. Edited by J.C. Williams and H.A. Thompson, CRC press, Boca Raton Florida (USA)
 215. Woldehiwet Z., 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Research in Vet. Sci.*; 77: 93-100
 216. World Health Organization (WHO) - Laboratory biosafety manual. 2004 – 3rd edition. Available on line at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/en/Biosafety7.pdf>
 217. Zamboni D.S. and Rabinovitch M. (2003). "Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.*; vol. 71: 1225-1233
 218. Zamboni D.S., Campos M.A., Torrecilhas A.C., Kiss K., Samuel J.E., Golenbock D.T., Lauw F.N., Roy C.R., Almeida I.C., Gazzinelli R.T. (2004). Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J. Biol. Chem.*; 279: 54405-54415
 219. Zhang G., Russell-Lodrigue K.E., Andoh M., Zhang Y., Hendrix L.R., Samuel J.E. (2007). Mechanisms of vaccine-induced protective immunity against *Coxiella burnetii* infection in BALB/c mice. *J. Immunol.*; 179: 8372-8380
 220. Zhang G., Zhang Y., Samuel J.E. (2012). Components of protective immunity. Pages 91-104. In *Coxiella burnetii: recent advances and new perspectives in research of the Q fever bacterium*. Editors: Toman R., Samuel J.E., Mege J-L., Capo C. Springer, Dordrecht Germany

Norme tecniche e legislative citate

1. *Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of biological agents. Health and Safety Commission 10 February 2004*
2. *D.Lgs. 81 del 9 aprile 2008 – GU 101 del 30 aprile 2008. Attuazione dell'art. 1 della Legge 3 agosto 2007, n. 123 in materia di tutela della salute e sicurezza nei luoghi di lavoro. Allegato XLVI*
3. *Regolamento di Polizia Veterinaria (D.P.R. 8.2.1954 n° 320 e successive modifiche)*
4. *Parere del Ministero della salute del 26 aprile 2013 (n. protocollo 270008592-P 2G) alla Provincia autonoma di Trento sull'applicazione degli articoli 1, 9, 10, 142 del Regolamento di Polizia Veterinaria in relazione alla rickettsiosi (Febbre Q)*



Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Viale dell'Università, 10 - 35020 Legnaro (Pd)
Tel. +39 049 8084211 Fax +39 049 8830046

comunicazione@izsvenezie.it

www.izsvenezie.it