

Seroprevalencia de *Besnoitia besnoiti*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* en hatos bovinos lecheros de la zona norte de Costa Rica

Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti*, *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* in bovine dairy herds in Northern Costa Rica

Seroprevalência de *Besnoitia besnoiti*, *Coxiella burnetii* e *Chlamydia abortus* em rebanhos bovinos leiteiros da zona norte da Costa Rica

Daisy Elena Fallas Elizondo^{✉1,2}, Ana Eugenia Jiménez Rocha^{1,3}, Juan José Romero Zúñiga^{1,4} y Gaby Dolz Wiedner^{1,4}

¹ Universidad Nacional, Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales, Heredia, Costa Rica.

² Universidad Técnica Nacional, Sede Regional Atenas, Alajuela, Costa Rica. dfallas@utn.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-9863-7135>.

³ Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Laboratorio de Parasitología, Heredia, Costa Rica.
ana.jimenez.rocha@una.ac.cr  <https://orcid.org/0000-0001-5416-9029>.

⁴ Universidad Nacional, Escuela de Medicina Veterinaria, Programa de Investigación en Medicina Poblacional, Heredia, Costa Rica. juan.romero.zuniga@una.ac.cr  <https://orcid.org/0000-0002-5252-1604>, gaby.dolz.wiedner@una.ac.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-9566-5130>.

Recibido: 23 de enero de 2023 **Corregido:** 30 de julio de 2024 **Aceptado:** 26 de agosto de 2024

Resumen

Besnoitia besnoiti y los agentes zoonóticos *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* ocasionan enfermedad reproductiva en bovinos. En Costa Rica no se cuenta con reportes de prevalencia de *B. besnoiti* y *C. burnetii*. El objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia y distribución de estos tres agentes en fincas de lechería especializada y de doble propósito de la zona Huetar Norte de Costa Rica. Se realizó un estudio transversal descriptivo. Fueron estudiados 600 animales de 40 fincas (15 por finca), ubicadas en los distritos de Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (5) y Zarcero (12). El análisis serológico se realizó mediante los ensayos inmunoenzimáticos comerciales de la compañía ID.VET (Montpellier, Francia). La seroprevalencia determinada para *B. besnoiti* fue alta (27,3%). Animales seropositivos se encontraron en un 80% de las fincas y en todos los distritos analizados, menos en la Fortuna, con las mayores prevalencias en Aguas Zarcas (64%), Venecia (36,6 %) y Zarcero (33,3 %). La seroprevalencia de *C. burnetii* fue 16,8 %, los animales positivos se encontraron en un 70 % de las fincas y distribuidos en todos los distritos, en especial Zarcero (24,6 %), Ciudad Quesada (19,2 %) y Aguas Zarcas (17,7 %). Con respecto a *C. abortus*, se determinó

✉ Autor para correspondencia: dfallas@utn.ac.cr



una seroprevalencia de 1,3 %, los animales seropositivos se encontraron solamente en un 17,5 % de fincas en tres distritos: Aguas Zarcas (3,3 %), Monterrey (3,3 %) y Ciudad Quesada (2,9 %). Se recomienda alertar a los grupos productores veterinarios y autoridades, para que tomen las medidas de prevención y control necesarias, en particular para *C. burnetii* y *C. abortus*, por su potencial zoonótico y realizar investigaciones para confirmar la presencia de estos agentes mediante aislamiento o diagnóstico molecular.

Palabras claves: inmunoensayo enzimático, reacción en cadena de la polimerasa, coinfecciones, zoonosis, epidemiología

Abstract

Besnoitia besnoiti and the zoonotic agents *Coxiella burnetii* and *Chlamydia abortus* cause reproductive diseases in cattle. There are no reports on the prevalence of *B. besnoiti* and *C. burnetii* in Costa Rica. This study aimed to determine the seroprevalence and distribution of these three agents in specialized dual-purpose dairy farms in Costa Rica's Northern Huetar area. A descriptive cross-sectional study was conducted involving 600 animals from 40 farms (15 per farm) located in the following districts: Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (5), and Zarcero (12). The serological analysis was performed using commercial enzyme immunoassays from IDvet (Montpellier, France). The seroprevalence for *B. besnoiti* was high (27.3%), with seropositive individuals found in 80% of farms and in all the districts analyzed, except in La Fortuna, with the highest prevalences in Aguas Zarcas (64%), Venecia (36.6%), and Zarcero (33.3%). The seroprevalence for *C. burnetii* was 16.8%, with seropositive individuals found in 70% of farms distributed across all districts, especially in Zarcero (24.6%), Ciudad Quesada (19.2%), and Aguas Zarcas (17.7%). The seroprevalence for *C. abortus* was 1.3%, with seropositive individuals found in only 17.5% of farms in three districts: Aguas Zarcas (3.3%), Monterrey (3.3%), and Ciudad Quesada (2.9%). Veterinary producers and the relevant authorities must be alerted to take the necessary precautions and control measures, particularly against *C. burnetii* and *C. abortus* due to their zoonotic potential. Further investigation is recommended to confirm the presence of these agents through isolation or molecular diagnosis.

Keywords: enzyme immunoassay, polymerase chain reaction, coinfections, zoonoses, epidemiology

Resumo

Besnoitia besnoiti, *Coxiella burnetii* e *Chlamydia abortus* causam doenças reprodutivas em bovinos. Na Costa Rica, não há registros de prevalência de *B. besnoiti* e *C. burnetii*. O objetivo deste estudo foi determinar a seroprevalência e a distribuição desses três agentes em fazendas especializadas em produção de leite e de dupla finalidade na região Huetar Norte da Costa Rica. Foi realizado um estudo transversal descritivo. Foram estudados 600 animais de 40 propriedades (15 por propriedade), localizadas nos distritos de Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2), Muelle (3), Venecia (5) e Zarcero (12). A análise sorológica foi realizada utilizando os ensaios imunoenzimáticos comerciais da empresa ID.VET (Montpellier, França). A seroprevalência determinada para *B. besnoiti* foi alta (27,3%). Animais soropositivos foram encontrados em 80% das propriedades e em todos os distritos analisados, exceto em Fortuna, com as maiores prevalências em Aguas Zarcas (64%), Venecia (36,6%) e Zarcero (33,3%). A seroprevalência de *C. burnetii* foi de 16,8%, com animais positivos encontrados em 70% das fazendas, distribuídos em todos os distritos, especialmente em Zarcero (24,6%), Ciudad Quesada (19,2%) e Aguas Zarcas (17,7%). Em relação a *C. abortus*, foi determinada uma seroprevalência de 1,3%, com animais soropositivos encontrados apenas em 17,5% das propriedades em três distritos: Aguas Zarcas (3,3%), Monterrey (3,3%) e Ciudad Quesada (2,9%). Recomenda-se alertar os produtores, veterinários e autoridades para que tomem as medidas de prevenção e controle necessárias, especialmente para *C. burnetii* e *C. abortus*, devido ao seu potencial zoonótico, além de realizar pesquisas para confirmar a presença desses agentes por meio de isolamento ou diagnóstico molecular.

Palavras-chave: imunoensaio enzimático, reação em cadeia da polimerase, coinfeções, zoonoses, epidemiologia.



Introducción

La besnoitiosis es una enfermedad que afecta a los bovinos y es causada por el protozoo intracelular obligado *Besnoitia besnoiti* del phylum Apicomplexa. La besnoitiosis ha sido reportada en África, Oriente Medio y América (Brasil y Canadá), y se considera una enfermedad emergente en Europa (Cortes et al., 2014; Gregory et al., 2018; Gutiérrez-Expósito et al., 2014; Uzeda et al., 2014). Este protozoo se transmite por insectos chupadores de sangre como tábanos y moscas, por iatrogénico mediante agujas hipodérmicas y por la transmisión por contacto directo durante la monta natural (EFSA, 2010; Jacquiet et al., 2010). El ganado infectado es el reservorio del parásito para los vectores. Se desconoce el ciclo del parásito como también el hospedador definitivo, aunque se ha sugerido posiblemente un papel del gato doméstico en otras especies de *Besnoitia*. En los bovinos se han encontrado los taquizoitos y los bradizoitos en quistes, por lo que se consideran hospedadores intermediarios (Gregory et al., 2018; Schares et al., 2009). La enfermedad cursa con una fase aguda caracterizada por fiebre, fotofobia, descargas oculonasales y anorexia; seguida de una etapa crónica, con edemas e hiperqueratosis, la presencia de quistes en piel, ubre, testículos, fascias y órganos internos, lo cual ocasiona pérdida de peso, infertilidad en los machos, aborto y baja producción láctea (Jacquiet et al., 2010). El diagnóstico se realiza cuando se detecta el protozoo en quistes o en sangre con la utilización de técnicas moleculares (Cortes et al., 2007), o en forma indirecta mediante técnicas serológicas, entre las que se encuentra el inmunoensayo enzimático (ELISA) (García-Lunar et al., 2013). Las prevalencias de besnoitiosis han sido reportadas en España (48,6 %), Portugal (5,1 %) (Yin et al., 2014), Italia (44,1 %) (Rinaldi et al., 2013) y en Turquía (Özdağ et al., 2019). En América Latina se ha realizado únicamente un estudio de seroprevalencia en Brasil (3,4 %) (Uzeda et al., 2014).

La coxielosis es una enfermedad en bovinos causada por *Coxiella burnetii*, una Gammaproteobacteria (Duron et al., 2014). El bacilo gram negativo e intracelular obligado es muy resistente en el medio ambiente y tiene distribución mundial (Bielawska-Drózd et al., 2014; Damasceno & Guerra, 2018). Los rumiantes domésticos son los principales reservorios, y la transmisión entre estos ocurre mediante garrapatas (Duron et al., 2015), mientras que la transmisión a otros animales y al ser humano ocurre a través de fómites, leche y placentas de bovinos infectados. En bovinos ocasiona problemas reproductivos, incluyendo abortos. Después del aborto, los animales pueden secretar la bacteria en la leche hasta por 32 meses. Los signos clínicos de la infección aguda se desconocen en animales, mientras que la infección crónica ocasiona abortos, infertilidad, metritis, placentitis, nacimientos prematuros, natimueertos y crías débiles. Los abortos suelen ser tardíos, y generalmente con retención placentaria. A veces se presenta con cuadros de neumonía, conjuntivitis, infecciones urogenitales y artritis (Barkallah et al., 2014). La bacteria ocasiona la “Fiebre Q” en seres humanos, que cursa en la etapa aguda con fiebre y síntomas inespecíficos, y en la etapa crónica con endocarditis y hepatitis que pueden ser letales (Eldin et al., 2017). El diagnóstico directo se realiza, sobre todo en seres humanos, utilizando técnicas moleculares, mientras que en animales se realizan técnicas indirectas (serología), que posteriormente se confirman mediante técnicas moleculares (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). La seroprevalencia de *C. burnetii* en muestras de leche ha sido reportada en Estados Unidos (96,0 %) (Pearson et al., 2014) y Grecia (95,0 %) (Mioni et al., 2020), así como en Brasil (23,8 %) (Pexara et al., 2018) y Ecuador (12,6 %) (Carbonero et al., 2015).

La clamidiosis ocasionada por *Chlamydia abortus*, una bacteria Gram negativa e intracelular obligada, ha sido asociada con el aborto enzoótico e infertilidad en rumiantes y signos similares a la gripe en seres humanos (Fonseca-Salazar et al., 2015; Sachse et al., 2015). La transmisión del agente ocurre por contacto directo con

secreciones conjuntivales, genitales, uterinas, placentas y fetos abortados. Puede ocurrir por monta natural o inseminación artificial, como también por inhalación del agente en ambientes contaminados, ya que es muy resistente y puede sobrevivir por meses en el ambiente (Fonseca-Salazar et al., 2015; Reinhold et al., 2011). En los bovinos causa endometritis, vaginitis, metritis, retenciones placentarias, natimueitos o nacimientos prematuros, y en los toros epididimitis, orquitis y vesiculitis (Fonseca-Salazar et al., 2015; Praga-Ayala et al., 2014). El diagnóstico directo se realiza mediante técnicas moleculares, analizando leche y productos de abortos, mientras que el diagnóstico serológico es útil para determinar prevalencias en una población (Sachse et al., 2009). Las seroprevalencias de *C. abortus* se han determinado en China (11,9 %) (Sun et al., 2015), Bélgica (4,2 %) (Yin et al., 2014) y México (4,87 %) (Campos-Hernández et al., 2014) mediante serología, y por análisis molecular de hisopados vaginales, Martínez et al. (2022) reportaron un 25,7 % de positivos. Los tres agentes ocasionan infecciones persistentes en los bovinos, y *C. burnetii* y *C. abortus* enfermedad zoonótica en humanos (Turin et al., 2022). En un análisis preliminar realizado con un banco de 92 sueros recolectados en el año 2017, de bovinos que habían abortado y resultaron seronegativos a brucelosis y neosporosis, se determinó por primera vez la presencia serológica de *B. besnoiti* (31,5 %), *C. burnetii* (36,9 %) y *C. abortus* (58,6 %) (Fallas-Elizondo et al., 2017), por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo determinar la seroprevalencia y distribución de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en fincas en la zona Huetar Norte de Costa Rica.

Metodología

Tipo y lugar del estudio

Se realizó un estudio transversal descriptivo en bovinos de la zona Huetar Norte de Costa Rica. La zona se eligió por la importante población bovina presente (428 844 cabezas de ganado), el 33,5 % del total de los bovinos del país (1 278 817 reses) (INEC, 2014). Las temperaturas cálidas (24°C-30°C) que predominan y el régimen de lluvias de todo el año (IMN, 2008) favorecen la presencia de los vectores y, con eso, la transmisión de los agentes.

Tipo, tamaño y toma de la muestra

El total de animales estudiados fue de 600. El tamaño de muestra se calculó en dos fases: primero, se determinó la cantidad de animales a muestrear para estimar la prevalencia a nivel de animal. Se usó la fórmula de cálculo para la estimación de un porcentaje, con los siguientes parámetros: 50 % de prevalencia esperada, 4 % error aceptado, 95 % de confianza y tamaño poblacional de 400 mil individuos.

De manera complementaria, para aumentar la representatividad de la muestra, se incluyó la mayor cantidad de fincas posible. Se asumió un riesgo idéntico de infección en los animales dentro de las fincas, y dentro de los distritos, así como en toda la región. Para aumentar la probabilidad de obtener al menos un animal positivo en cada finca, se utilizó la fórmula de Cannon & Roe (1982), asumiendo una prevalencia intra-hato de 20 % para los tres agentes (Fallas-Elizondo et al., 2017), un intervalo de confianza del 95 % y un tamaño de población promedio de entre 70 y 100 animales en edad de muestreo. Los cálculos fueron realizados en el paquete Winepiscopo 2.0 (Thrusfield et al., 2001).

De ese modo, fueron seleccionadas, al azar, 40 fincas (21,1 %) de una lista de 189 fincas de la zona Huetar Norte. Se localizaron en los distritos de Aguas Zarcas (5), Ciudad Quesada (9), Fortuna (4), Monterrey (2),

Muelle (3), Venecia (5) y Zarcero (12). En estas fincas se tomaron muestras de sangre de 15 animales adultos por finca, hasta completar la totalidad de animales requeridos para el estudio.

Las muestras de sangre se realizaron con tubos, agujas y funda del sistema Vacutainer. Luego fueron remitidas, en refrigeración, al laboratorio de Medicina Poblacional de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, por personal médico veterinario de la Cooperativa Dos Pinos. En el laboratorio, fueron centrifugadas por 10 minutos a 10 000 g, se separó el suero y se guardó a -20°C hasta su análisis mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Análisis serológico

Se utilizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) indirectos de la compañía IDVET (Montpellier, Francia). Se procedió de acuerdo con las especificaciones del ente fabricante. Primero, se dejó que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente, y se colocaron los sueros a analizar en microplacas no sensibilizadas para evitar diferencias en los tiempos de incubación de las muestras. Al mismo tiempo, se preparó la solución de lavado, se diluyó una parte de la solución concentrada en 20 partes de agua destilada. A las placas sensibilizadas con el antígeno se agregó 90µl del buffer de dilución a cada pocillo, se colocó 10µl de cada suero a analizar y 10µl del suero control positivo y negativo por duplicado.

Para las pruebas de *B. besnoiti* y *C. burnetii* se incubaron los sueros por 45 minutos a temperatura ambiente; para *C. abortus* durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de realizar tres lavados se diluyó el conjugado 1:10 con el buffer de dilución, se agregó 100µl a cada pocillo y se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron otros tres lavados y se agregó 100µl de la solución de sustrato a todos los pocillos, se dejó incubando 15 minutos en la oscuridad y se detuvo la reacción con 100µl de solución de parada.

Por último, se llevaron las placas al lector de ELISA Multiskan EX de Thermo Labsystems®, y se hizo la lectura de las densidades ópticas (DO) a 450nm. Para considerar válidos los ensayos, las DO de los sueros controles positivos debían de resultar >0,350, y el cociente de la media de la DO de los controles positivos y la media de la DO de los controles negativos >3.

Para *B. besnoiti* se utilizó el IDScreen® *Besnoitia* Indirect 2.0 ELISA con una sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) reportada de 97,2 % y 100 %, respectivamente (García-Lunar et al., 2013). El porcentaje S/P de los sueros se calculó con la siguiente fórmula: $(DO \text{ muestra} / DO \text{ control positivo}) \times 100$. Sueros con S/P <25 % se consideraron negativos, ≥25 % y <30 % positivos débiles (+), ≥30% y <50% positivos fuertes (++) y ≥50% positivos muy fuertes (+++) (Tinkler et al., 2024).

Para *C. burnetii* se utilizó el IDScreen® Q Fever Indirect ELISA, con Se y Sp reportadas de 100 % (Hong-Bo Ni et al., 2011), y se utilizó la siguiente fórmula: $[(DO \text{ muestra} - DO \text{ control negativo}) / (DO \text{ control positivo} - DO \text{ control negativo})] \times 100$. Sueros con S/P ≤40 % se consideraron negativos, >40 % y ≤50 % positivos débiles (+), >50 % y ≤80 % positivos fuertes (++) y >80 % positivos muy fuertes (+++).

Para *C. abortus* se utilizó el ID Screen® *Chlamydomphila abortus* Indirect Multi-species ELISA (70,4 % Se y 95,6 % Sp) (Díaz et al., 2014). El porcentaje S/P de los sueros se calculó con la siguiente fórmula: $(DO \text{ muestra} / DO \text{ control positivo}) \times 100$. Los sueros con S/P ≤50 % se consideraron negativos, >50 % y <60 % positivos débiles (+), ≥60 % y ≤70 % positivos fuertes (++) y >70 % positivos muy fuertes (+++).

Análisis de los datos

Se calculó la seroprevalencia de cada agente a nivel global, por distritos, y por fincas.

Resultados

Para *B. besnoiti* se determinó una seroprevalencia global de 27,3 % y una seroprevalencia de 80,0 % a nivel de fincas. Se detectaron animales positivos en todos los distritos analizados, menos en la Fortuna. Las seroprevalencias más altas se encontraron en Aguas Zarcas (64,0 %), Venecia (36,6 %) y Zarcero (33,3 %) (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Seroprevalencia global de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en hatos bovinos lecheros y de doble propósito de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018

Distrito	<i>B. besnoiti</i> % (+/total)	<i>C. burnetii</i> % (+/total)	<i>C. abortus</i> % (+/total)
Aguas Zarcas	64,4 (58/90)	17,7 (16/90)	3,3 (3/90)
Ciudad Quesada	9,6 (13/135)	19,2 (26/135)	2,9 (4/135)
Fortuna	0 (0/45)	2,2 (1/45)	0 (0/45)
Monterrey	3,3 (1/30)	10,0 (3/30)	3,3 (1/30)
Muelle	11,1 (5/45)	8,8 (4/45)	0 (0/45)
Venecia	36,6 (22/60)	5,0 (3/60)	0 (0/60)
Zarcero	33,3 (65/195)	24,6 (48/195)	0 (0/195)
Total % (+/total)	27,3 (164/600)	16,8 (101/600)	1,3 (8/600)

Cuadro 2. Seroprevalencia de *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* a nivel de hatos bovinos lecheros y de doble propósito de la Región Huetar Norte de Costa Rica, 2018

Distrito	<i>B. besnoiti</i> % (+/total)	<i>C. burnetii</i> % (+/total)	<i>C. abortus</i> % (+/total)
Aguas Zarcas	100,0 (5/5)	83,3 (5/6)	33,3 (2/6)
Ciudad Quesada	88,8 (8/9)	77,7 (7/9)	44,4 (4/9)
Fortuna	0 (0/4)	33,3 (1/3)	0 (0/3)
Monterrey	100,0 (1/1)	100,0 (2/2)	50,0 (1/2)
Muelle	100,0 (3/3)	66,6 (2/3)	0 (0/3)
Venecia	100,0 (4/4)	50,0 (2/4)	0 (0/4)
Zarcero	84,6 (11/13)	69,2 (9/13)	0 (0/13)
Total % (+/total)	80,0 (32/40)	70,0 (28/40)	17,5 (7/40)

El 51,2 % (84/164) de las muestras positivas a *B. besnoiti* obtuvo valores de 25-30% S/P (débiles +), un 27,4 % (45/164) entre 30-50 % S/P (medios ++) y 21,4 % (35/164) positivas de S/P mayor a 50 % (muy fuertes +++), según la clasificación sugerida por Tinkler et al. (2024). El distrito con mayor cantidad de seropositivos en las tres categorías fue Zarcero (39 %, 65/164).

Para *C. burnetii* se determinó una seroprevalencia de 16,8 %, mientras que en un 70 % de las fincas se encontraron animales seropositivos. Estos se encontraron en todos los distritos, sobre todo en Zarcero (24,6 %), Ciudad Quesada (19,2 %) y Aguas Zarcas (17,7 %) (Cuadro 1 y 2). Los sueros positivos se ubicaron sobre todo en la categoría de reacciones positivas fuertes (47,5 %, 48/101), seguido de positivas débiles (37,6 %, 38/101) y, en menor cantidad, positivas muy fuertes (14,9 %, 15/101). El distrito con mayor cantidad de seropositivos en las tres categorías (+, ++, +++) fue Zarcero (47 %, 48/101).

La seroprevalencia de *C. abortus* en la Región Huetar Norte fue de 1,3 %. El porcentaje de fincas con animales positivos (17,5 %) se concentraron en tres distritos: Aguas Zarcas (3,3 %), Monterrey (3,3 %) y Ciudad Quesada (2,9 %) (Cuadro 1 y 2). El 87,5 % de los sueros positivos mostraron reacciones muy fuerte positivas (+++), un 12,5 % fuerte positivas (++) y ningún suero positivo débil (+). El 50 % (4/8) de los seropositivos (+++ y ++) se encontraron en Ciudad Quesada.

En 36 animales (6,5%) se detectaron coinfecciones de *B. besnoiti* con *C. burnetii*. Estos animales se encontraban en 12 (30,0 %) hatos, sobre todo en Zarcero (10), pero también en Aguas Zarcas (1) y Ciudad Quesada (1).

Discusión

Se logró determinar, por primera vez, la prevalencia serológica de *B. besnoiti* (27,3 %), *C. burnetii* (16,8 %) y *C. abortus* (1,3 %) en la zona Huetar Norte de Costa Rica; además, este es el primer reporte de seroprevalencia para *B. besnoiti* y *C. burnetii* en Centroamérica.

En Brasil, Uzeda et al. (2014) obtuvieron un 3,4 % (70/2014) de seroprevalencia para *B. besnoiti* mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFAT), establecieron una exposición del ganado brasileño al agente, fundamentado en los altos títulos de anticuerpos determinados en algunos sueros. Sin embargo, al analizar los sueros positivos mediante Western Blot, estos no mostraron los patrones característicos descritos por otros grupos de trabajo, por lo que los autores concluyeron la presencia de una cepa de *B. besnoiti* con composición antigénica diferente a las descritas en el continente europeo y africano. No obstante, otros estudios refutaron esas conclusiones e indicaron que, más bien, se podían haber debido a reacciones cruzadas con anticuerpos dirigidos contra *Neospora caninum* y *Sarcocystis* spp. (García-Lunar et al., 2015; Gondim et al., 2017). Además de este trabajo en Brasil, no se tienen datos de prevalencia en otros países de Latinoamérica. En Costa Rica sorprende la alta prevalencia de anticuerpos detectada, tanto en un análisis preliminar (Fallas-Elizondo et al., 2017) como en la presente investigación. El estudio del 2017 se realizó con vacas seronegativas a *N. caninum*, que habían abortado, resultando un 31,5 % positivos a *B. besnoiti*, prevalencia similar detectada en el presente trabajo, con lo que se descarta reacciones falsas positivas debido a anticuerpos contra *N. caninum*. Sin embargo, para confirmar los resultados obtenidos en la presente investigación, se recomienda determinar la presencia de anticuerpos contra *Sarcocystis* spp. en sueros positivos a *B. besnoiti* o confirmar sueros mediante Western Blot (García-Lunar et al., 2015; Gondim et al., 2017).

En Australia se reporta un 18,4 % (159/869) de *B. besnoiti* en bovinos de leche, mediante la técnica de ELISA (Nasir et al., 2012), y 87,3 % (55/63) en hatos bovinos de España mediante un ELISA *in-house* (Gutiérrez-



Expósito et al., 2014). En Europa, la enfermedad se considera endémica y su presencia se observa más en bovinos de carne, por su manejo extensivo y porque la monta natural es una vía de transmisión. Además, ocurre más en animales mayores de 2 años, así como más frecuentemente en machos que en hembras (Alvarez-García et al., 2014). La amplia distribución de *B. besnoiti* a nivel de fincas (80 %) en la región Huetar Norte se puede deber, por un lado, a la presencia de tábanos y moscas, y al manejo de las vacas en forma extensiva y, por otro, a la monta natural que se utiliza en esa región (Anastácio et al., 2022). Es importante resaltar que se detectaron, sobre todo, reacciones positivas débiles: (51,2 %, 84/164) a *B. besnoiti*. La razón por la que no se encontró el agente en los quistes que presentaron algunos bovinos seropositivos se debe, probablemente, a la forma en que se tomó la muestra (raspado del quiste), ya que los entes productores no estaban anuentes a que se tomara una biopsia, para no dañar el cuero, así como solo permitieron el análisis de tres muestras (Jacquiet et al., 2010). Sin embargo, se demuestra la necesidad de seguir investigando sobre la epidemiología e importancia de este protozooario en nuestro país, sobre todo por tratarse de un agente que ocasiona infección persistente, para el que aún no se cuenta con medicamentos o vacunas (Gollnick et al., 2015).

La prevalencia de *C. burnetii* (16,8 %) determinada en esta región de Costa Rica es similar a la reportada en bovinos de leche de Ecuador (12,6 %) (Carbonero et al., 2015), Costa Rica 7,7 % (Villagra et al., 2018), y 28,0 % de México (Salinas-Meléndez et al., 2002). Los resultados coinciden, además, con los hallazgos de Villagra-Blanco et al. (2018) que determinaron la presencia serológica de *C. burnetii* en caprinos de la región Huetar Norte. Sorprende la amplia distribución, ya que en un 70 % de las fincas analizadas existían reactores positivos y la mitad de los animales mostraron reacciones positivas altas. Dado que la infección se considera persistente en bovinos, y *C. burnetii* se considera un agente zoonótico que se transmite a las personas mediante leche, productos de abortos, orina o heces de animales infectados, es importante dar seguimiento a estos hatos seropositivos e informar a las autoridades de salud, para que tomen las medidas correspondientes (Kersh et al., 2013; OIE, 2021). Se recomienda implementar medidas de bioseguridad en estos hatos, para prevenir una diseminación del agente a otros hatos (Paul et al., 2012) y tratar de aislar el agente. También, realizar más investigaciones, para determinar la presencia del agente en hatos bovinos de Costa Rica y establecer si ocurren manifestaciones clínicas en los bovinos, como aborto, muerte fetal, partos de crías débiles o prematuros, o si cursa en forma asintomática (Saegerman et al., 2015), además, si las personas que trabajan con estos animales han presentado fiebre, cefalea, mialgias, tos, fatiga, escalofríos, sudores nocturnos, náuseas o vómitos debido a la fiebre Q (McQuiston et al., 2002). Para controlar esta zoonosis es importante también controlar las garrapatas, que podrían transmitir el agente entre los animales, asimismo es importante recordar que las bacterias son excretadas con las heces, orina o membranas fetales de animales infectados, y pueden permanecer viables durante meses y ser transportadas en forma de polvo por el viento a otros lugares, y ser, así, una fuente de infección para personas y animales (Salinas-Meléndez et al., 2002).

La prevalencia determinada para *C. abortus* fue baja (1,3 %), lo que concuerda con resultados previos en bovinos de Poás (0,5 %) (Fonseca et al., 2015), equinos del Valle Central (4,8 %) (Jiménez et al., 2014) y ovinos de todas las regiones del país (5,2 %) (Villagra-Blanco et al., 2015). Los distritos en los que se encontró la mayor cantidad de seropositivos fueron en Ciudad Quesada (n=4) y Aguas Zarcas (n=3), con reacciones fuertes positivas 87,5 % (7/8), las cuales, según O'Neill et al. (2018), indican que estos animales han abortado recientemente. A pesar de que no se pudo determinar la presencia del agente en muestras vaginales, probablemente por la pequeña cantidad de muestras analizadas (n=4) y por la excreción intermitente del agente, es importante seguir realizando investigaciones para establecer su presencia en el país, tomar en cuenta este agente como

diagnóstico diferencial en abortos y evitar su diseminación (Borel et al., 2010). En un 6,5 % (39/600) de los casos se establecieron coinfecciones *B. besnoiti* y *C. burnetii*, lo cual no ha sido reportado con anterioridad.

Conclusiones

Se determinó por primera vez la presencia de anticuerpos contra *B. besnoiti*, *C. burnetii* y *C. abortus* en bovinos de la región Huetar Norte de Costa Rica, y se reporta por primera vez la seroprevalencia para *B. besnoiti* y *C. burnetii* en Centroamérica. La seroprevalencia determinada para *B. besnoiti* en esa región, a nivel global (27,3 %) y a nivel de fincas (80 %), fueron altas. Un 51,7 % de las vacas seropositivas mostraron bajos títulos de anticuerpos. La prevalencia detectada para *C. burnetii* (16,8 %) fue similar en otros países latinoamericanos, sin embargo, se determinó una gran cantidad de fincas analizadas con reactores positivos (70 %). Un 47,5 % de los animales seropositivos mostraron altos títulos de anticuerpos contra el agente. Para *C. abortus* se determinó una prevalencia baja (1,3 %) y una distribución limitada en las fincas (17,5 %), empero, 87,5 % de los animales seropositivos mostraron títulos de anticuerpos muy altos contra el agente. Solamente en un 6,5 % de las muestras se determinaron coinfecciones para *B. besnoiti* y *C. burnetii*.

Recomendaciones

Debido a la alta seroprevalencia de *B. besnoiti* detectada en el presente estudio, y a que un 51,7 % de las vacas seropositivas mostraron bajos títulos de anticuerpos es importante, en futuros estudios, descartar reacciones falsas positivas, ya sea confirmando los seropositivos en ELISA con otra técnica serológica (ejemplo Western Blot) o demostrando la ausencia de anticuerpos contra *N. caninum* y *Sarcocystis* spp. Además, se recomienda seguir investigando estos agentes infecciosos para lograr aislarlos o detectarlos molecularmente. Es importante informar al Servicio Nacional de Salud Animal (SENASA), al personal veterinario y a los entes productores sobre los resultados de la presente investigación, para que tomen en cuenta los tres agentes en el diagnóstico diferencial de patologías reproductivas en bovinos, e implementen protocolos para prevenir su diseminación, en particular de *C. burnetii* y *C. abortus* por su potencial zoonótico. Asimismo, se recomienda alertar a las autoridades del Ministerio de Salud para que incluyan la coxielosis y clamidiosis como diagnóstico diferencial en casos de insuficiencia cardíaca valvular, enfermedades respiratorias y abortos.

Agradecimientos

Las autoras y el autor agradecemos a los entes productores de leche y al equipo médico veterinario de la empresa Dos Pinos en la zona Huetar Norte, liderado por el Dr. Alfredo Sequeira, por su disposición y colaboración en la toma de muestras. El proyecto fue financiado por fondos del proyecto 054530 “Diagnóstico e Investigación en Medicina Poblacional”, FUNDAUNA.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Referencias

- Agerholm, J. S. (2013). Coxiella burnetii associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(1), 13. <http://dx.doi.org/10.1186/1751-0147-55-13>
- Álvarez-García, G., García-Lunar, P., Gutiérrez-Exposito, D., Shkap, V., & Ortega-Mora, L. M. (2014). Dynamics of Besnoitia besnoiti infection in cattle. *Parasitology*, 141(11), 1419-1435. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000729>
- Anastacio, C., Bexiga, R., Nolasco, S., Zúquete, S., Delgado, I. L. S., Nunes, T., & Leitão, A. (2022). Impact of endemic besnoitiosis on the performance of a dairy cattle herd. *Animals*, 12(10), 1291. <https://doi.org/10.3390/ani12101291>
- 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(35), 4392-4402. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.04.010>
- Barkallah, M., Gharbi, Y., Hassena, A. B., Slima, A. B., Mallek, Z., Gautier, M., ... & Fendri, I. (2014). Survey of infectious etiologies of bovine abortion during mid-to late gestation in dairy herds. *PloS one*, 9(3), e91549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091549>
- 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. *Research in Veterinary Science*, 83(1), 47-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.11.001>
- Bielawska-Drózd, A., Cieřlik, P., Mirski, T., Gawel, J., Michalski, A., Niemcewicz, M., & Kocik, J. (2014). Prevalence of Coxiella burnetii in environmental samples collected from cattle farms in Eastern and Central Poland (2011–2012). *Veterinary Microbiology*, 174(3), 600-606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.034>
- Biesenkamp-Uhe, C., Li, Y., Hehnen, H. R., Sachse, K., & Kaltenboeck, B. (2007). Therapeutic Chlamydia abortus and C. pecorum vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with Chlamydia infection. *Infection and Immunity*, 75(2), 870-877. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00691-06>
- Borel, N., Dumrese, C., Ziegler, U., Schifferli, A., Kaiser, C., & Pospischil, A. (2010). Mixed infections with Chlamydia and porcine epidemic diarrhea virus-a new in vitro model of chlamydial persistence. *BMC Microbiology*, 10(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-201>
- Campos-Hernández, E., Vázquez-Chagoyán, J. C., Salem, A. Z., Saltijeral-Oaxaca, J. A., Escalante-Ochoa, C., López-Heydeck, S. M., & de Oca-Jiménez, R. M. (2014). Prevalence and molecular identification of Chlamydia abortus in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 46(6), 919-924. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-014-0585-6>
- Cannon, R. M., & Roe, R. T. (1982). Livestock disease survey: A field manual for veterinarians. *Australian Government Publishing Service*.
- Carbonero, A., Guzmán, L., Montaña, K., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., & Saa, L. (2015). Coxiella burnetii seroprevalence and associated risk factors in dairy and mixed cattle farms from Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.007>

- Cortes, H. C., Reis, Y., Gottstein, B., Hemphill, A., Leitão, A., & Müller, N. (2007). Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Veterinary Parasitology*, 146(3-4), 352-356. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.003>
- Cortes, H., Leitão, A., Gottstein, B., & Hemphill, A. (2014). A review on bovine besnoitiosis: A disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916). *Parasitology*, 141(11), 1406-1417. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182014000262>
- Damasceno, I. A. D. M., & Guerra, R. C. (2018). Coxiella burnetii and Q fever in Brazil: A public health issue. *Ciência & Saúde Coletiva*, 23(12), 4231-4239. <https://doi.org/10.1590/1413-812320182312.27772016>
- Díaz, J. M., Fernández, G., Prieto, A., Valverde, S., Lago, N., Díaz, P., & Díez-Baños, P. (2014). Epidemiology of reproductive pathogens in semi-intensive lamb-producing flocks in North-West Spain: A comparative serological study. *The Veterinary Journal*, 200(2), 335-338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.022>
- Duron, O., Jourdain, E., & McCoy, K. D. (2014). Diversity and global distribution of the Coxiella intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks and tick-borne diseases*, 5(5), 557-563. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.003>
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K. D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., ... & Arnathau, C. (2015). The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, Coxiella burnetii. *PLoS Pathogens*, 11(5), e1004892. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004892>
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., ... & Raoult, D. (2017). From Q fever to Coxiella burnetii infection: a paradigm change. *Clinical microbiology reviews*, 30(1), 115-190. <https://doi.org/10.1128/cmr.00045-16>
- European Food Safety Authority (EFSA) (2010) Bovine besnoitiosis: an emerging disease in Europe. European Food Safety Authority. *EFSA J* 8:1499–1514.
- Fallas-Elizondo, D., Chacón-Calderón, J., Romero-Zúñiga, J. J., & Dolz, G. (2017). Evidencia serológica de *Besnoitia besnoiti*, *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetii* y *Chlamydia abortus* en hatos bovinos de Costa Rica. *Ponencia en XXI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Colegio de Médicos Veterinarios de Costa Rica, San José, Costa Rica*. <https://doi.org/10.15359/rcv.36-3.16>
- Fonseca-Salazar, L., Murillo-Herrera, J., Romero-Zúñiga, J. J., & Dolz, G. (2015). Chlamydia abortus in Dairy Farms in Costa Rica. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 5(4), 179-185. <https://www.advetresearch.com/index.php/AVR/article/download/63/60>
- García-Lunar, P., Ortega-Mora, L. M., Schares, G., Gollnick, N. S., Jacquet, P., Grisez, C., & Álvarez-García, G. (2013). An inter-laboratory comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection in bovines. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60(1), 59-68. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01318.x>

- García-Lunar, P., Moré, G., Campero, L., Ortega-Mora, L. M., & Álvarez-García, G. (2015). Anti-Neospora caninum and anti-Sarcocystis spp. specific antibodies cross-react with Besnoitia besnoiti and influence the serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Veterinary Parasitology*, 211(1-2), 49-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.027>.
- Gollnick, N. S., Scharr, J. C., Schares, G., & Langenmayer, M. C. (2015). Natural Besnoitia besnoiti infections in cattle: Chronology of disease progression. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1-16. <http://dx.doi.org/10.1186/s12917-015-0344-6>
- Gondim, L. F., Mineo, J. R., & Schares, G. (2017). Importance of serological cross-reactivity among Toxoplasma gondii, Hammondia spp., Neospora spp., Sarcocystis spp. and Besnoitia besnoiti. *Parasitology*, 144(7), 851-868. <https://doi.org/10.1017/S0031182017000063>.
- Gregory, L., de França, V. P., & Cortés, H. (2018). Besnoitiose bovina: revisão de literatura. *Medicina Veterinária*, 12(3), 165-173. <https://doi.org/10.26605/medvet-v12n3-2391>
- Gutiérrez-Expósito, D., Esteban-Gil, A., Ortega-Mora, L. M., García-Lunar, P., Castillo, J. A., Marcén, J. M., & Álvarez-García, G. (2014). Prevalence of Besnoitia besnoiti infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees. *The Veterinary Journal*, 200(3), 468-470. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.008>
- Hireche, S., Ababneh, M. M. K., Bouaziz, O., & Boussena, S. (2016). Seroprevalence and molecular characterization of Chlamydia abortus in frozen fetal and placental tissues of aborting ewes in northeastern Algeria. *Tropical Animal Health and Production*, 48(2), 255-262. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-015-0944-y>
- Hong-Bo, N. I., Si-Guo, L. I. U., Hai-Fang, J. I. A. N. G., Chun-Ren, W. A. N. G., & Ai-Dong, Q. I. A. N. (2011). Seroprevalence of Q fever in dairy cows in northeastern China. *African Journal of Microbiology Research*, 5(23), 3964-3967. <http://www.academicjournals.org/ajmr>
- Instituto Meteorológico Nacional. (2008). Clima en Costa Rica- Zona Norte. <https://www.imn.ac.cr/documents/10179/31165/ZonaNorte.pdf/c08ed9c6-3d27-4f76-a20a-7cac913fb6d8>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2014). Censo Agropecuario 2014. Resultados generales ganado vacuno. <http://www.inec.go.cr/censos/censo-agropecuario-2014>
- Jacquet, P., Liénard, E., & Franc, M. (2010). Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary Parasitology*, 174(1), 30-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.013>
- Jaton, K., Peter, O., Raoult, D., Tissot, J. D., & Greub, G. (2013). Development of a high throughput PCR to detect Coxiella burnetii and its application in a diagnostic laboratory over a 7-year period. *New Microbes and New Infections*, 1(1), 6-12. <http://dx.doi.org/10.1002/2052-2975.8>
- Jiménez, D., Romero-Zúñiga, J.J., Dolz, G. (2014). Serosurveillance of infectious agents in equines of the Central Valley of Costa Rica. *Open Veterinary Journal*, 4, 107-112. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4629603/>
- Kersh, G. J., Fitzpatrick, K. A., Self, J. S., Priestley, R. A., Kelly, A. J., Lash, R. R., ... & Anderson, A. D. (2013). Presence and persistence of Coxiella burnetii in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1697-1703. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01511-12>

[org/10.1128/AEM.03472-12](https://doi.org/10.1128/AEM.03472-12)

- Martínez-Serrano, M. G., Díaz-Aparicio, E., Palomares-Reséndiz, G., Tórtora-Pérez, J. L., Ramírez-Álvarez, H., Ortega-Hernández, N., ... & Cervantes-Morali, J. J. C. (2022). Presence of Chlamydia abortus in colostrum, milk, and vaginal discharge samples of sheep. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 35(3), 165-173. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v35n2a04>
- McQuiston, J. H., Childs, J. E., & Thompson, H. A. (2002). Q fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(6), 796-799. <http://dx.doi.org/10.2460/javma.2002.221.796>
- Mioni, M. D. S. R., Costa, F. B., Ribeiro, B. L. D., Teixeira, W. S. R., Pelicia, V. C., Labruna, M. B., ... & Megid, J. (2020). Coxiella burnetii in slaughterhouses in Brazil: A public health concern. *Plos One*, 15(10), e0241246. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0241246>
- Nasir, A., Lanyon, S. R., Schares, G., Anderson, M. L., & Reichel, M. P. (2012). Sero-prevalence of Neospora caninum and Besnoitia besnoiti in South Australian beef and dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 186(3-4), 480-485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.032>
- Oficina Internacional de Epizootias (OIE) (2021). *Fichas de información general sobre enfermedades animales- Fiebre Q*. <https://www.oie.int/doc/ged/D13999.PDF>
- O'Neill, L. M., O'Driscoll, Á., & Markey, B. (2018). Comparison of three commercial serological tests for the detection of Chlamydia abortus infection in ewes. *Irish Veterinary Journal*, 71(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1186/s13620-018-0124-2>
- Özdal, N., Oğuz, B., Kılınç, Ö. O., Karakuş, A., & Değer, S. (2019). Prevalence of ELISA-detected specific antibodies against Besnoitia besnoiti in cattle of the Eastern and Southeastern Anatolian regions, Turkey. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(2), 143. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6716274/>
- Pacheco, R. C., Echaide, I. E., Alves, R. N., Beletti, M. E., Nava, S., & Labruna, M. B. (2013). Coxiella burnetii in ticks, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 19(2), 344. <https://doi.org/10.3201%2Fid1902.120362>
- Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A. B., & Agerholm, J. S. (2012). Factors associated with Coxiella burnetii antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 107(1-2), 57-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.05.015>
- Pearson, T., Hornstra, H. M., Hilsabeck, R., Gates, L. T., Olivas, S. M., Birdsall, D. M., & Keim, P. (2014). High prevalence and two dominant host-specific genotypes of Coxiella burnetii in US milk. *BMC Microbiology*, 14(1), 1-9. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-14-41>
- Pexara, A., Solomakos, N., & Govaris, A. (2018). Q fever and prevalence of Coxiella burnetii in milk. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 65-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.004>
- Praga-Ayala, a. R., de Oca-Jiménez, R. M., Ortega-Santana, C., Salem, A. Z. M., Cubillos-Godoy, V., Fernández-Rosas, P., & Monroy-Salazar, H. G. (2014). Low seroprevalence of chlamydia abortus in dairy cows of hot environment in southern of mexico. *Life science journal*, 11(11).



https://www.researchgate.net/profile/Humberto-Monroy-Salazar/publication/277247482_Low_seroprevalence_of_Chlamydia_abortus_in_dairy_cows_of_hot_environment_in_southern_of_Mexico/links/5564aaa508aec4b0f4858f6f/Low-seroprevalence-of-Chlamydia-abortus-in-dairy-cows-of-hot-environment-in-southern-of-Mexico.pdf

- Reinhold, P., Liebler-Tenorio, E., Sattler, S., & Sachse, K. (2011). Recurrence of *Chlamydia suis* infection in pigs after short-term antimicrobial treatment. *The Veterinary Journal*, 187(3), 405-407. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.01.008>
- Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Musella, V., Bosco, A., Cortes, H., & Cringoli, G. (2013). First cross-sectional serological survey on *Besnoitia besnoiti* in cattle in Italy. *Parasitology Research*, 112(4), 1805-1807. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3241-y>
- Sachse, K., Bavoil, P. M., Kaltenboeck, B., Stephens, R. S., Kuo, C. C., Rosselló-Móra, R., & Horn, M. (2015). Emendation of the family Chlamydiaceae: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Systematic and applied microbiology*, 38(2), 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.004>
- Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., & Longbottom, D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary Microbiology*, 135(1-2), 2-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.040>
- Saegerman, C., Speybroeck, N., Dal Pozzo, F., & Czaplicki, G. (2015). Clinical indicators of exposure to *Coxiella burnetii* in dairy herds. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(1), 46-54. <https://doi.org/10.1111/tbed.12070>
- Salinas-Meléndez, J. A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., & Fimbres-Durazo, H. (2002). Estudio serológico de la fiebre 'Q' en animales de Nuevo León. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(2), 75-78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2002/mi022f.pdf>
- Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Cortes, H. C. E., Rostaher, A., Selmaier, J., & Gollnick, N. S. (2009). First *in vitro* isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. *Veterinary parasitology*, 163(4), 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.033>
- Slaba, K., Skultety, L., & Toman, R. (2005). Efficiency of various serological techniques for diagnosing *Coxiella burnetii* infection. *Acta Virologica*, 49(2), 123-7. <http://www.dolfinin.com/pdf/lit/av08slaba2.pdf>
- Sun, W. W., Meng, Q. F., Cong, W., Shan, X. F., Wang, C. F., & Qian, A. D. (2015). Herd-level prevalence and associated risk factors for *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Chlamydia abortus* and bovine viral diarrhoea virus in commercial dairy and beef cattle in eastern, northern and northeastern China. *Parasitology Research*, 114(11), 4211-4218. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4655-0>
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J. P., & Frankena, K. (2001). WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *The Veterinary Record*, 148(18), 567-572. <https://doi.org/10.1136/vr.148.18.567>

- Tinkler, S. H., Villa, L., Manfredi, M. T., Walshe, N., & Jahns, H. (2024). First report of *Besnoitia bennetti* in Irish donkeys: an emerging parasitic disease in Europe. *Irish Veterinary Journal*, 77(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13620-024-00263-2>
- Turin, L., Surini, S., Wheelhouse, N., & Rocchi, M. S. (2022). Recent advances and public health implications for environmental exposure to *Chlamydia abortus*: from enzootic to zoonotic disease. *Veterinary Research*, 53(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01052-x>
- Uzeda, R. S., Andrade, M. R., Corbellini, L. G., Antonello, A. M., Vogel, F. S., & Gondim, L. F. P. (2014). Frequency of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in Brazilian cattle. *Veterinary Parasitology*, 199(3-4), 242-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.025>
- Villagra-Blanco, R., Dolz, G., Montero-Caballero, D., & Romero-Zúñiga, J. J. (2015). Detection of antibodies against *Chlamydophila abortus* in Costa Rican sheep flocks. *Open Veterinary Journal*, 5(2), 122-126. <https://www.ajol.info/index.php/ovj/article/view/128134/117684>
- Villagra-Blanco, R., Esquivel-Suárez, A., Wagner, H., Romero-Zúñiga, J. J., Taubert, A., Wehrend, A., ... & Dolz, G. (2018). Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii*-, *Neospora caninum*-and *Coxiella burnetii*-infections in dairy goat flocks from Costa Rica. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 14, 79-84. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.09.006>
- Yin, L., Schautteet, K., Kalmar, I. D., Bertels, G., Van Driessche, E., Czaplicki, G., ... & Vanrompay, D. (2014). Prevalence of *Chlamydia abortus* in Belgian ruminants. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 83(4), 164-170. <http://dx.doi.org/10.21825/vdt.v83i4.16642>