



UNIVERSITA' DI PISA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE  
Scuola di Specializzazione in  
Ispezione degli Alimenti di Origine Animale  
Direttore: Prof.ssa Daniela Gianfaldoni

**Indagine sulla presenza di *Coxiella burnetii* in  
formaggi pecorini a latte crudo prodotti in  
Toscana**

**Candidato**

Dott. Roberto Botta

**Relatore**

Dott. Filippo Fratini

**Correlatore**

Dott.ssa Alessia Galiero

**Direttore**

Prof.ssa Daniela Gianfaldoni

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

*a te...*

## INDICE

1 DEFINIZIONE .....	4
2 STORIA .....	4
3 EZIOLOGIA.....	4
4 PATOGENESI.....	5
5 EPIDEMIOLOGIA .....	6
5.1 TRASMISSIONE .....	6
5.2 DIFFUSIONE E NORMATIVA .....	8
6 SINTOMATOLOGIA NELL’UOMO .....	11
7 SCOPO DELLA TESI.....	14
8 MATERIALI E METODI .....	15
8.1 CAMPIONAMENTO .....	15
8.2 ESTRAZIONE DEL DNA .....	15
8.3 <i>ENDPOINT</i> PCR .....	15
8.4 AW.....	16
8.5 <i>REAL TIME</i> PCR .....	16
8.6 MST ANALISI .....	16
9 RISULTATI.....	18
10 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI .....	21
11 BIBLIOGRAFIA .....	22

## 1 DEFINIZIONE

La febbre Q è una zoonosi presente a livello mondiale sostenuta da *Coxiella burnetii*, patogeno molto diffuso in natura ed in grado di contagiare mammiferi, uccelli, rettili ed artropodi. Sebbene negli animali l'infezione sia spesso asintomatica, nei mammiferi essa può causare aborto, parti prematuri, metrite, infertilità e polmonite. Nell'uomo la malattia decorre generalmente in forma asintomatica, ma in alcuni casi l'infezione può portare a malattia acuta o cronica, con sintomi simil-influenzali, polmonite, epatite, endocardite ed aborto (Arricau-Bouvery *et al.*, 2005).

## 2 STORIA

La malattia è stata descritta per la prima volta nel 1935 e definita Febbre Q (in inglese *Query fever*) da Derrick che non riuscì ad identificare l'agente eziologico in un episodio di malattia febbrile in lavoratori di un macello a Brisbane in Australia (Derrick, 1937). Nel 1937 Burnet e Freeman riuscirono ad isolare un germe intracellulare da cavie inoculate con sangue e feci dei pazienti di Derrick ed a classificarlo come *Rickettsia burnetii* (Burnet e Freeman, 1937); tuttavia, solamente nel 1948, attraverso l'osservazione delle caratteristiche colturali e biochimiche del patogeno da parte dell'entomologo Cornelius B. Philip, l'agente eziologico venne riclassificato in un nuovo genere definito *Coxiella* in memoria di Herald R. Cox che per primo isolò questo patogeno e la specie venne chiamata *burnetii* in onore di Burnet.

## 3 EZIOLOGIA

Studi filogenetici basati sull'analisi della sequenza 16S dell'rRNA collocano *Coxiella burnetii* nel gruppo gamma dei Proteobatteri, nell'ordine delle Legionellales, nella famiglia *Coxiellaceae* del quale fanno parte anche i generi *Legionella spp.*, *Rickettsiella spp.* e *Francisella tularensis* (Raoult *et al.*, 2005).

Una volta penetrata nella cellula eucariotica, tramite il meccanismo di fagocitosi, *Coxiella burnetii* si replica nei vacuoli prediligendo nei mammiferi i monociti ed i macrofagi, formando delle simil-spore a loro volta classificate come: *large-cell variant* (LCV) metabolicamente attive e *small-cell variant* (SCV) inattive.

Dal punto di vista antigenico presenta due strutture distinte: la Fase I, isolata da cellule infette animali e umane, patogena, immunogena, caratterizzata da un lipopolisaccaride (LPS) lungo, che evolve nella Fase II avirulenta, con LPS troncato. Essendo gli anticorpi attivi verso la Fase II i primi ad essere prodotti dall'organismo infetto, la presenza di essi nei confronti di una o di entrambe le fasi, permette di determinare se l'infezione è acuta o cronica (Farina e Scatozza, 1998).

#### **4 PATOGENESI**

*Coxiella burnetii*, come già descritto precedentemente, è un batterio strettamente intracellulare ed il suo meccanismo di penetrazione per fagocitosi da parte della cellula ospite è molto più efficiente nella fase II, avirulenta, rispetto alla fase I, virulenta. Questa differenza è dovuta al fatto che l'attacco dei batteri in fase I è mediato solo dall'integrina  $\alpha\beta_3$ , mentre, se il patogeno è in fase II, esso è mediato sia dall'integrina  $\alpha\beta_3$  sia dal recettore del complemento CR3. In quest'ultimo caso l'internalizzazione è più efficiente determinando una migliore replicazione intracellulare e, di conseguenza, in fase II i batteri hanno uno sviluppo più rapido rispetto a quelli in fase I. Entrambe le tipologie saranno quindi evidenziabili all'interno dei fagosomi, ma solo in fase I le simil-spore batteriche riescono a sopravvivere nei macrofagi, mentre in fase II vengono rapidamente eliminate. Inoltre la capacità di sviluppo del microorganismo è legata all'adattamento al pH acido intracellulare (pH 4,5) il quale consente l'ingresso di nutrienti necessari ed al tempo stesso protegge dall'attività battericida di diversi antibiotici. La localizzazione nei vacuoli permette al batterio di sopravvivere e di proliferare in quanto inibisce la fusione del fagosoma con il lisosoma determinando una maturazione incompleta dovuta alla mancata espressione della catepsina D, *marker* cellulare, posseduto

invece dai fagosomi dei batteri non virulenti. Altro fattore determinante la sopravvivenza del patogeno nei macrofagi è la produzione esogena di Interleuchina-10 (IL-10), che ostacola l'attività microbica dei macrofagi (Angelakis e Raoult, 2010; Hackstadt e Williams, 1981; Raoult *et al.*, 2005). In seguito all'infezione, se *Coxiella burnetii* è in fase I determina la produzione solamente di IgM, mentre in fase II stimola sia la produzione di IgM che di IgG (Maurin e Raoult, 1999).

Nella forma acuta la risposta immunitaria cellulo-mediata, è sistemica e determina la formazioni di lesioni granulomatoze caratterizzate da uno spazio centrale vuoto ed un anello di fibrina e definite "granulomi a ciambella". Inoltre si ha una risposta di tipo linfocitario che non è però sufficiente alla completa eliminazione del batterio (Honstetter *et al.*, 2004). Nella forma cronica invece si ha un aumento di citochine infiammatorie, TNF e IL-6, mentre diminuisce la capacità proliferativa dei linfociti in risposta alla stimolazione antigenica di *Coxiella burnetii* (Koster *et al.*, 1985).

## **5 EPIDEMIOLOGIA**

### **5.1 TRASMISSIONE**

La febbre Q è una zoonosi che ha una diffusione cosmopolita, ad eccezione della Nuova Zelanda; i principali *reservoir* sono i mammiferi domestici e selvatici, i volatili e gli artropodi come le zecche. La principale fonte di infezione è rappresentata dai ruminanti domestici quali bovini, ovini e caprini. L'infezione decorre solitamente in forma asintomatica. Le principali sedi di localizzazione sono il parenchima mammario e l'utero e quindi la diffusione ambientale avviene tramite involgii fetali, feci, urine e latte infetti (Babudieri, 1959; Marrie, 2007) (Figura 1).

Gli stessi animali da affezione ed i cani da guardia possono contrarre il patogeno attraverso il morso di zecca, per inalazione, per ingestione di latte contaminato e di involgii fetali infetti; degno di nota è il fatto che questi animali costituiscono una importante fonte di infezione per l'uomo (Stein e Raoult, 1999; Marrie e Raoult, 2002).

Gli artropodi, in particolare le zecche svolgono un ruolo importante per la trasmissione del batterio, che si trova in fase I, ai vertebrati, ai lagomorfi ed alle specie aviarie selvatiche che, a loro volta, con l'eliminazione di *Coxiella burnetii* nelle feci, possono andare a contaminare l'ambiente e di conseguenza il patogeno può essere trasmesso all'uomo per via inalatoria (Maurin e Raoult, 1999).

Nel 1999 Stein e Raoult descrissero episodi di contagio umano che erano avvenuti a seguito dell'esposizione a feci di piccione infette.

La trasmissione nell'uomo è essenzialmente di tipo aerogena e avviene con una frequenza maggiore nei soggetti che si occupano della gestione e del governo degli animali; in questo caso l'andamento della malattia è direttamente collegato alla stagionalità dei parti dei piccoli ruminanti ed alla prima fase della lattazione quando l'escrezione con il latte di *Coxiella burnetii* è maggiore (Tissot-Dupont *et al.*, 1999; Hellenbrand *et al.*, 2001; EFSA, 2010).

Le persone possono infettarsi anche attraverso il semplice contatto con la lana contaminata (Abinati *et al.*, 1955), con il letame (Berri *et al.*, 2003), o con i vestiti contaminati da feci (Babudieri, 1959). Fattori di rischio determinanti nella diffusione della malattia sono rappresentati dalla posizione degli allevamenti, dalla numerosità dei greggi, dalle zone di pascolo e dalle condizioni meteorologiche che se asciutte e ventose fanno sì che *Coxiella burnetii* si diffonda per via aerogena nell'ambiente rappresentando così un rischio di infezione anche per il cittadino urbano. Pertanto la stessa gestione dell'allevamento deve essere considerata un punto critico di controllo della Febbre Q sia negli animali che nell'uomo (EFSA, 2010).

La trasmissione uomo-uomo è molto rara anche sono stati descritti episodi di infezione in seguito a contatto con donne partorienti infette, tramite via trans-placentare (infezione congenita), trasfusioni di sangue (Van der Hoek *et al.*, 2010) ed inoculazione intradermica. Kruszewska e Tylewska-Wierzbanowska hanno dimostrato che la trasmissione per via sessuale è possibile nei topi (1993) ed hanno inoltre dato prova della vitalità di *Coxiella burnetii* in sperma di toro (1997).

L'ingestione di alimenti contaminati quali latte non pastorizzato e prodotti lattiero-caseari a base di latte crudo, rappresenta anch'essa una possibile via di infezione, dovuta alla localizzazione di *Coxiella burnetii* nel parenchima mammario dei ruminanti ed alla conseguente escrezione del patogeno nel latte (Maurin e Raoult, 1999).

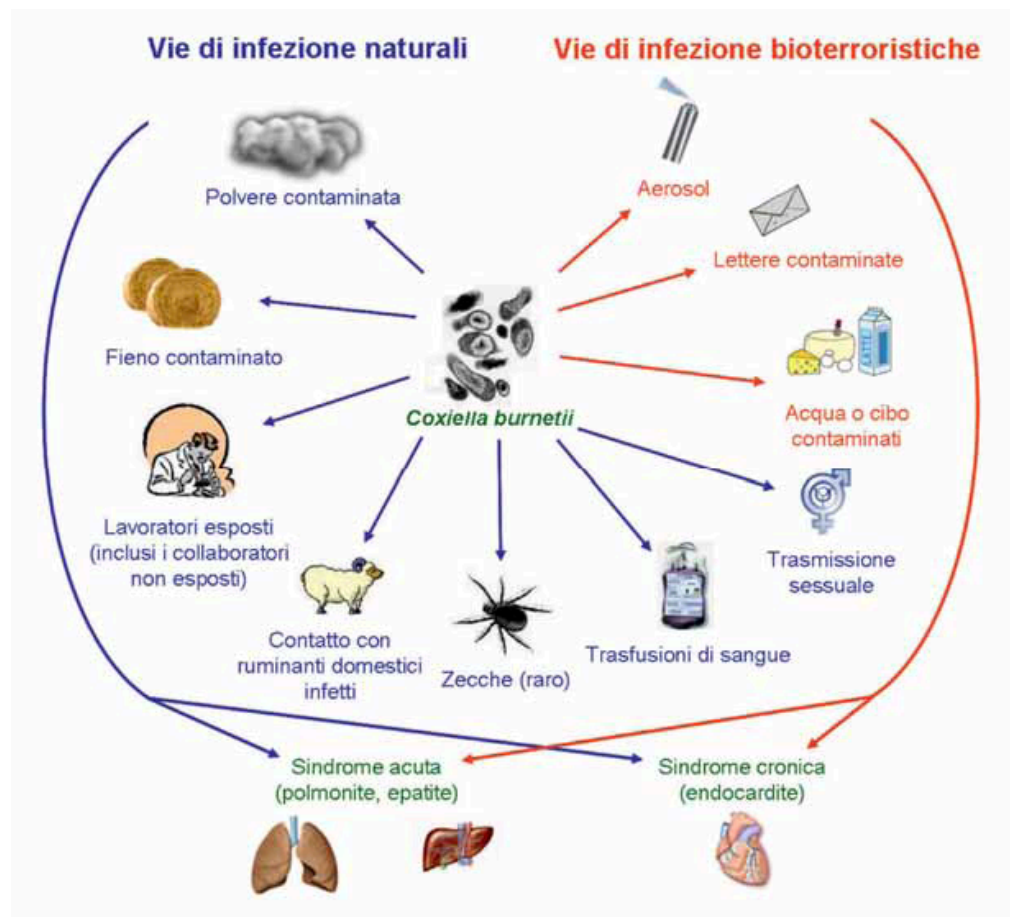


Fig.1. Modalità di trasmissione di *Coxiella burnetii* (Borriello *et al.*, 2015).

## 5.2 DIFFUSIONE E NORMATIVA

Nonostante la febbre Q sia endemica nei ruminanti domestici nella quasi totalità dei Paesi europei, il suo impatto sulla salute e sulle produzioni degli animali è sottostimato in quanto essa decorre prevalentemente in forma asintomatica. Lo stesso può essere detto per quanto riguarda la prevalenza della malattia nell'uomo, poiché molto spesso non viene fatta diagnosi della malattia in quanto la patologia decorre o in forma asintomatica o si manifesta con una sintomatologia simil-influenzale. Inoltre non esistono



raccomandazioni mirate al monitoraggio dell'infezione ed alla denuncia della malattia, la quale non è elencata nell'Allegato I della Direttiva 99/2003 per il monitoraggio delle zoonosi e degli agenti zoonotici (EFSA, 2010); nonostante ciò, la febbre Q umana è contemplata tra le malattie soggette a notifica per quasi tutti i Paesi della Comunità Europea.

In Italia, invece, ai sensi del regolamento di Polizia Veterinaria, gli artt. 142 e 143 riportano i provvedimenti da adottare verso animali presumibilmente infetti che, direttamente o indirettamente, hanno avuto contatto con persone di cui è stata accertata l'infezione. Inoltre, la febbre Q, poiché è considerata una zoonosi professionale, è soggetta alla messa a conoscenza del servizio medico e veterinario di competenza; la malattia è inoltre compresa nella classe II del DM 15.12.1990, classificata come “malattia rilevante perché ad elevata frequenza e/o passibile di interventi di controllo” (DPR 320/54 e successive modifiche ed integrazioni; DM 15.12.1990).

Diversi studi hanno confermato la presenza del patogeno negli allevamenti italiani; Vicari *et al.* (2005), conducendo una ricerca su campioni di latte massale in diverse province dell'Emilia-Romagna, Piemonte e Lombardia in due diversi momenti, hanno messo in evidenza che 337 campioni sui 780 totali (43%) erano positivi al primo prelievo, mentre nel secondo campionamento si era riscontrata una positività del 60% (173 positivi su 287 campioni) mostrando un aumento dell'incidenza dell'infezione. Inoltre altri studi hanno confermato l'utilità diagnostica della metodica PCR a partire da campioni di latte massale ed hanno avvalorato l'ipotesi che un unico esito diagnostico negativo è insufficiente a dichiarare un allevamento non infetto e quindi hanno evidenziato la necessità di svolgere almeno due controlli annuali all'interno dello stesso allevamento. Oltre a ciò, queste ricerche hanno confermato l'ampia diffusione dell'infezione da *C. burnetii* in Italia e sono in linea con i risultati ottenuti negli altri Paesi europei confermandone l'endemicità, in un momento storico in cui sia in Italia che in vari Paesi europei è molto diffusa la vendita diretta di latte crudo bovino attraverso i distributori automatici (Vicari *et al.*, 2005; Guatteo *et al.*, 2007; Rodolakis *et al.*, 2007).

In riferimento a ciò, Petruzzelli *et al.* (2013), analizzando campioni di latte massale prelevati in aziende localizzate nelle Marche che avevano la licenza

alla vendita di latte crudo bovino attraverso distributori automatici, hanno messo in evidenza che su un totale di 130 campioni 21 erano positivi, con una prevalenza pari al 27%.

In una prova sperimentale, in cui il latte bovino ed il latte di pecora sono stati infettati sperimentalmente prima della caseificazione, Babudieri e Moscovici (1950) hanno dimostrato, inoculando in cavie campioni di formaggio ottenuto con latte bovino infetto, che *Coxiella burnetii* sopravvive per 17 giorni. Sfortunatamente, non sono disponibili dati sul genotipo del ceppo utilizzato per contaminare il latte, la dose infettante, i valori di pH, di umidità o la percentuale di NaCl che caratterizzavano i formaggi analizzati. Analogamente, nello studio di Šipka (1958) la vitalità di *Coxiella burnetii* è stata valutata inoculando in cavie campioni di formaggio, prodotti a partire da latte bovino naturalmente infetto; inoltre Šipka (1958), a differenza di Babudieri e Moscovici (1950), ha misurato il pH, l'umidità e la percentuale di NaCl dei campioni. Da questo studio è emerso che *Coxiella burnetii* può sopravvivere fino 42 giorni di stagionatura in formaggi caratterizzati da valori di pH compreso tra 7,34 e 6,34, da un contenuto di umidità che varia dal 50,08% al 52,16% e da percentuali di NaCl comprese tra 7,14% e 8,36%; al contrario, *Coxiella burnetii* non era più vitale dal quarantanovesimo giorno di maturazione in poi (pH 6,34, umidità 51,42%, NaCl 8,32%). Questi due studi indicano che la stagionatura, influenzando l'*aw* (*activity water*), il pH e la percentuale di NaCl, potrebbe avere un impatto sulla vitalità del patogeno nei prodotti lattiero-caseari. Purtroppo, anche per quanto riguarda lo studio di Šipka (1958), non sono disponibili dati riguardanti il ceppo che contaminava il latte.

Al contrario, Eldin *et al.* (2013) e Hirai *et al.* (2012) hanno dichiarato che il consumo di formaggio infetto non costituisce un rischio per la salute pubblica dal momento che l'agente patogeno non era vitale nei formaggi venduti al dettaglio che essi hanno analizzato inoculando i campioni in topi; inoltre, solo Hirai *et al.* (2012) hanno analizzato le sequenze di DNA dei campioni positivi che si sono rivelati appartenere al gruppo Priscilla. Con riferimento a questo, sono necessari ulteriori studi, poiché la vitalità di *Coxiella burnetii* nel formaggio potrebbe essere influenzata dal ceppo

infettante: infatti, fino ad oggi, nessuna ricerca ha valutato come la sopravvivenza di *Coxiella burnetii* al pH, all'aw ed alla stagionatura nei formaggi sia influenzata dal genotipo coinvolto.

## 6 SINTOMATOLOGIA NELL'UOMO

Vista la grande variabilità del quadro clinico, la diagnosi di febbre Q deve essere accertata attraverso l'ausilio di specifici test di laboratorio; inoltre le manifestazioni cliniche sono direttamente influenzate dalla via di infezione, dalla dose infettante, dall'età e dal sesso. L'esposizione umana al batterio per via aerogena causa polmonite, mentre quella intraperitoneale provoca epatite (Marrie *et al.*, 1996); inoltre nel caso in cui la dose infettante sia elevata si può avere miocardite (Maurin e Raoult, 1999). Oltre a ciò, il genere e l'età influiscono sulla manifestazione clinica della malattia: i maschi presentano una sintomatologia più grave rispetto alle donne (Tissot-Dupont *et al.*, 1992); inoltre la prevalenza dei casi clinici nei bambini aumenta significativamente con l'età, mentre la sintomatologia si osserva maggiormente nei soggetti di età superiore ai 15 anni (Maltezou e Raoult, 2002). Nell'uomo l'infezione può causare sieroconversione asintomatica, oppure una forma acuta caratterizzata da episodio febbrili autolimitanti con un periodo di incubazione di circa venti giorni (*range* 14-39 giorni). La variabilità dei sintomi causati dalla Febbre Q fanno sì che non esistano forme tipiche e che solitamente l'esordio è improvviso con rialzi termici e sintomi simil-influenzali (Tissot-Dupont e Raoult, 2007). I rialzi febbrili possono raggiungere i 40 °C di temperatura corporea in 2-4 giorni, per poi decrescere dai 5 ai 14 giorni successivi con una durata maggiore negli anziani e nei soggetti non trattati, fino ad una persistenza dell'infezione di 57 giorni (Derrick, 1973). La forma acuta si può manifestare con una polmonite atipica, anche se generalmente si presentano sintomi lievi quali tosse secca, febbre con murmuri anormali all'auscultazione (Raoult *et al.*, 1990) con diffusione pleurica del batterio non evidenziabile radiograficamente. I sintomi presentano una durata minima di 10 giorni fino a 3 mesi, con una mortalità dello 0,5-1,5% dei pazienti (Tissot-Dupont *et al.*, 1992).

L'epatite si presenta in circa 1/3 dei pazienti affetti da Febbre Q generalmente in tre forme: epatite con epatomegalia, epatite asintomatica e febbre prolungata; alla biopsia epatica si evidenziano granulomi caratteristici (Marrie, 1988; Angelakis e Raoult, 2010).

Nel 5-21% dei pazienti sono presenti lesioni cutanee; *rash* aspecifico caratterizzato da lesioni maculari rosa o papule purpuriche o rosse sul tronco e di rado eritema nodoso (Maurin e Raoult 1999; Raoult *et al.*, 2005).

Raramente, circa nel 2% dei casi clinici, possono verificarsi pericardite, miocardite e patologie neurologiche che si manifestano con una comune cefalea determinata da meningite, meningoencefalite o neuropatie periferiche (Bernit *et al.*, 2002; Raoult *et al.*, 2005). La principale causa di decessi in seguito ad infezione con *Coxiella burnetii* è rappresentata dalla miocardite (Fournier *et al.*, 2001) che può essere associata a versamento pericardico fino a determinare pericardite con sintomatologia aspecifica caratterizzata da febbre e dolore toracico (Tissot-Dupont e Raoult, 2007).

Inoltre, qualora individui che presentano condizioni predisponenti quali lesioni alle valvole cardiache, problemi vascolari o immunodeficienza, si infettino con *Coxiella burnetii*, dopo la forma acuta, possono sviluppare la forma cronica dopo poco tempo (6 settimane) o negli anni successivi all'infezione primaria; tra le manifestazioni croniche più comuni si evidenziano endocarditi ed infezioni vascolari; meno frequenti sono gli aneurismi aortici e le infezioni alle ossa, al fegato o agli organi riproduttivi (Maurin e Raoult, 1999). La prevalenza della malattia presenta un rapporto maschi/femmine del 75% e si manifesta maggiormente ad un'età superiore a 40 anni (Houpikian *et al.*, 2002). Degno di nota è il fatto che l'endocardite e le infezioni vascolari in corso di febbre Q cronica generalmente esitano nel decesso del soggetto qualora non siano trattate con un antibiotico per un periodo che può andare da almeno 18 mesi fino a un trattamento a vita (Maurin e Raoult, 1999).

Ulteriori forme patologiche causate da *C. burnetii* sono le infezioni osteoarticolari, tra cui osteomielite, artrosi e l'interessamento dell'innesto aortico con attigua osteomielite vertebrale (Maurin e Raoult, 1999), epatite cronica negli alcolisti (Raoult *et al.*, 2000), pseudotumori splenici e

polmonari (Lipton *et al.*, 1987), infezione del drenaggio ventricolo-peritoneale (Lohuis *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda la sfera riproduttiva, nelle donne gestanti si ha localizzazione di *Coxiella* nella parete uterina e nel parenchima mammario con rischi immediati non solo per la madre, ma anche per il feto; infatti, se l'infezione viene contratta nei primi tre mesi di gravidanza essa causa aborto, mentre nelle fasi successive può determinare parto prematuro e nascita di neonati sottopeso. La Febbre Q può, a lungo termine, evolvere nella forma cronica o causare aborti spontanei in gravidanze successive, morte neonatale (26%), morte fetale intrauterina (5,3%), sebbene un esito ostetrico normale sia possibile (15,8%). L'infezione transplacentare del feto in utero risulta possibile con conseguenze non ancora conosciute, mentre la sua associazione con complicanze ostetriche resta ipotetica (Carcopino *et al.*, 2007). Durante la gravidanza nelle donne colpite si ha febbre, sintomi simil-influenzali, trombocitopenia grave, ed inoltre sono stati segnalati casi di polmonite atipica (Maurin e Raoult, 1999), nonostante la malattia possa decorrere anche in forma asintomatica (Marrie, 1993).

Negli ultimi 30 anni, grazie allo sviluppo di tecniche diagnostiche di laboratorio più sensibili, è stato possibile effettuare una diagnosi ed un trattamento della patologia più rapidi, diminuendo significativamente la cronicizzazione della malattia e quindi riducendo l'insorgenza di gravi forme patologiche quali l'insufficienza cardiaca, l'epatomegalia, la sindrome infiammatoria, l'anemia, la leucopenia e l'alterazione della funzionalità epatica (Houpikian *et al.*, 2002). Infatti anche la prognosi della Febbre Q cronica è migliorata nel corso di pochi anni, con un abbassamento dei casi letali dal 37% dell'anno 1987 (Raoult *et al.*, 1987) al 15% tra 1997 e il 2000 (Tissot-Dupont e Raoult, 2007) fino a raggiungere valori inferiori al 5% nel 1999 (Raoult *et al.*, 1999). Degno di nota è il fatto che questo miglioramento è direttamente correlato non solo alla diagnosi precoce, ma anche al conseguente trattamento rapido ed efficace (Siegman\_Igra *et al.*, 1997).

## 7 SCOPO DELLA TESI

*Coxiella burnetii* è l'agente eziologico della febbre Q che colpisce sia gli animali sia l'uomo e che ha diffusione cosmopolita. Attualmente vi sono pochi studi che hanno valutato la presenza del batterio nei formaggi e, sebbene la via di infezione principale sia quella respiratoria, ad oggi la via orale non può essere esclusa in quanto la sopravvivenza di *Coxiella burnetii* è stata messa in evidenza sperimentalmente in formaggi a latte crudo.

Lo scopo della tesi è stato quello di valutare la presenza di *Coxiella burnetii* in formaggi Toscani non solo per valutare la prevalenza dell'infezione sul territorio, ma anche per analizzare quali siano i genotipi maggiormente diffusi. Il ruolo dei prodotti lattiero-caseari nella trasmissione umana di *Coxiella burnetii* è ancora controverso e non unanimemente condiviso. Poiché in Italia il latte di pecora viene solitamente consumato sottoforma di formaggi ed attualmente l'attitudine dei consumatori si rivolge sempre di più ai prodotti a latte crudo, appare quanto mai importante valutare quale sia il livello di contaminazione di questa specifica categoria di prodotti.

## 8 MATERIALI E METODI

### 8.1 CAMPIONAMENTO

Sono stati raccolti 70 campioni di formaggio pecorini, prodotti in Toscana, nelle provincie di Pisa, Livorno, Lucca, Grosseto, Pistoia, Siena, Arezzo; i campioni di formaggio erano stati prodotti a partire da latte massale crudo.

Il campionamento è stato effettuato nel periodo compreso tra il 2014 ed il 2015.

I formaggi sono stati classificati in base ai valori:

- all'aw (*activity water*) in freschi (aw 0,97-0,99), semistagionati (aw 0,96-0,93) e stagionati (aw 0,92-0,81);
- al tipo di produzione in industriali ed artigianali.

I campioni sono stati analizzati presso il laboratorio di Microbiologia applicata alle produzioni animali del Dipartimento di Scienze Veterinarie.

### 8.2 ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA è stato estratto direttamente da 1,5 ml di ciascun omogenato di formaggio ottenuto omogeneizzando ciascun campione (10 gr) con 90 ml di una soluzione di sodio citrato (2% w/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per mezzo di uno Stomacher blender (230 rev/min per 1 min). L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando un kit commerciale e seguendo le istruzioni del produttore (RealPure Spin food stool bacteria, Durviz).

La qualità del DNA è stata valutata in merito all'integrità mediante corsa in gel di agarosio (0,8% p/v).

### 8.3 ENDPOINT PCR

Le reazioni sono state effettuate utilizzando i *primer* QBT-1 5'-TATGTATCCACCGTAGCCAGTC-3' e QBT-2 5'-CCCAACAACACCTCCTTATTC-3' (Hoover *et al.*, 1992), i quali amplificano una regione di 687 bp della sequenza IS1111. Per ogni campione sono stati utilizzati 12,5 µL della master mix (2X KAPA Taq ReadyMix with dye master mix kit, Kapa Biosystems, USA), 0,6 µM di ciascun *primer*, 5 µL di DNA e 4,5 µL di acqua sterile (Ultra Pure Water DNase and RNase-free, Biological Industries, Israel). L'amplificazione è stata eseguita utilizzando il termocicizzatore Thermal Cycler-

LifePro (Bioer Technology) adottando le seguenti condizioni di amplificazione: 5 minuti a 95 °C e 40 cicli di 30 sec a 95 °C, 30 sec a 60 °C, 1 min a 72 °C, seguiti da una fase finale di estensione alla stessa temperatura (72 °C) per 5 min (Lamas *et al.*, 2009). Inoltre, sono stati utilizzati un controllo positivo (Nine Mile strain, ATCC VR-615) ed un controllo negativo (Ultra Pure Water DNase and RNase-free, Biological Industries, Israel) che sono stati incorporati in ogni saggio di PCR. Per ciascun campione è stata effettuata una corsa elettroforetica in gel di agarosio (1,5% p/v) di 12 µl di ogni amplificato.

#### **8.4 AW**

Per ogni campione di formaggio è stata misurata l'aw (*activity water*) utilizzando il Rotronic HygroPalm HP23-AW-A meter (Rotronic).

#### **8.5 REAL TIME PCR**

È stato eseguito un saggio di Real time PCR il quale prevedeva l'amplificazione di un *target* di 86 bp della sequenza IS1111 utilizzando i *primers* CoxbS (5'-GATAGCCCGATAAGCATCAAC-3') e CoxbAs (5'-GCATTCGTATATCCGGCATC-3') (Panning *et al.*, 2008), e la sonda 6FAM-TGCATAATTCATCAAGGCACCAATGGT-TAMRA (Di Domenico *et al.*, 2014). Per ogni campione sono stati utilizzati 10 µL di master mix (2x TaqMan Fast Universal PCR Master Mix), 300 nM della sonda, 900 nM di ciascun primer, 5 µL di DNA ed acqua sterile fino al raggiungimento di un volume finale di 20 µL. L'amplificazione è stata eseguita con il termocicizzatore 7900HT Fast Real time PCR System (Applied Biosystems) utilizzando le seguenti condizioni di amplificazione: denaturazione iniziale a 95 °C per 20 s, seguita da 35 cicli di 95 °C per 1s, 60 °C per 20 s.

#### **8.6 MST ANALISI**

È stata eseguita l'analisi MST utilizzando il protocollo descritto da Di Domenico *et al.* (2014). Ciascuna reazione consisteva in 1x PCR Buffer II (Applied Biosystems), 200 nM di ciascun *primer* (Glazunova *et al.*, 2005), 200 µM dNTPs (Promega), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> Solution (Applied Biosystems), 0,03U/µL AmpliTaqGold<sup>TM</sup> (Applied



Biosystems), 5 µL di DNA ed acqua sterile fino a raggiungere un volume finale di 50 µL. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando il termocicizzatore GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) adottando le seguenti condizioni di amplificazione: denaturazione iniziale di 10 min a 95 °C, seguita da 45 cicli di denaturazione per 30 s a 95 °C, *annealing* per 30 s a 57 °C, ed estensione per 30 s a 72 °C, con un'estensione finale a 72 °C per 7 min. I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit Expin™ PCR SV (GeneAid) e sequenziati per mezzo di BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) ed il 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I dati delle sequenze ottenute sono stati analizzati assemblati utilizzando DNASTar Navigator e le sequenze sono state confrontate con quelle riportate nel database consultabile sul sito [http://ifr48.timone.univmrs.fr/mst/coxiella\\_burnetii/strains.html](http://ifr48.timone.univmrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html).

## 9 RISULTATI

L'analisi condotta ha permesso di identificare il DNA di *Coxiella burnetii* in 22/70 (31,42%) formaggi pecorini (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati ottenuti mediante i saggi di *end point* PCR, *Real time* PCR e l'analisi MST.

	N° campione	Stagionatura	aw	Codice Allevamento/caseificio	End point	Real time	MST
					PCR	PCR (Ct)	
<b>Formaggi artigianali</b>	C F	Fresco	0,978	10	-	-	/
	79	Fresco	0,971	12	-	-	/
	12	Fresco	0,972	13	+	+ (31)	ST32
	17	Fresco	0,975	10	-	-	/
	56	Fresco	0,975	14	-	+ (38)	/
	21	Fresco	0,976	15	-	-	/
	38	Fresco	0,985	16	-	-	/
	59	Fresco	0,971	18	-	-	/
	69	Fresco	0,975	20	-	-	/
	D F	Semistagionato	0,963	9	-	-	/
	D FS	Semistagionato	0,957	9	-	-	/
	20	Semistagionato	0,945	19	-	-	/
	37	Semistagionato	0,948	24	-	-	/
	18	Semistagionato	0,953	10	-	-	/
	39	Semistagionato	0,966	12	-	-	/
	41	Semistagionato	0,954	25	-	-	/
	26	Semistagionato	0,949	19	-	-	/
	C FS	Semistagionato	0,954	10	-	-	/
	51	Semistagionato	0,946	29	+	+ (35)	/

57	Semistagionato	0,957	14	+	+ (37)	/
58	Semistagionato	0,932	14	-	-	/
60	Semistagionato	0,95	18	-	-	/
61	Semistagionato	0,958	18	-	-	/
63	Semistagionato	0,957	31	-	-	/
64	Semistagionato	0,93	31	-	+ (38)	/
65	Semistagionato	0,947	31	-	-	/
67	Semistagionato	0,942	32	-	+ (38)	/
68	Semistagionato	0,945	32	-	-	/
76	Semistagionato	0,933	33	-	-	/
78	Semistagionato	0,933	33	-	-	/
25	Stagionato	0,797	19	-	-	/
86	Stagionato	0,92	34	-	-	/
87	Stagionato	0,88	34	-	-	/
88	Stagionato	0,901	34	-	-	/
D ST	Stagionato	0,91	9	-	-	/
C ST	Stagionato	0,926	10	-	-	/
19	Stagionato	0,867	10	-	-	/
22	Stagionato	0,883	15	-	-	/
23	Stagionato	0,898	19	-	-	/
24	Stagionato	0,864	19	-	-	/
42	Stagionato	0,862	35	-	-	/
45	Stagionato	0,919	36	-	-	/
66	Stagionato	0,921	32	-	-	/
73	Stagionato	0,903	25	-	-	/
74	Stagionato	0,907	25	-	-	/
75	Stagionato	0,92	25	+	+ (33)	/

	77	Stagionato	0,922	33	-	-	/
<b>Formaggi industriali</b>	40	Fresco	0,97	17	-	+ (37,5)	/
	71	Fresco	0,976	21	-	-	/
	30	Semistagionato	0,953	11	-	-	/
	32	Semistagionato	0,935	22	+	+ (36)	/
	35	Semistagionato	0,939	23	+	+ (32)	/
	43	Semistagionato	0,969	26	-	+ (35,5)	/
	27	Semistagionato	0,959	27	-	-	/
	46	Semistagionato	0,954	26	-	-	/
	47	Semistagionato	0,967	28	+	+ (34)	/
	49	Semistagionato	0,9443	28	+	+ (31)	ST12
	50	Semistagionato	0,951	28	+	+ (34)	/
	52	Semistagionato	0,952	30	-	+ (39)	/
	53	Semistagionato	0,939	30	-	-	/
	54	Semistagionato	0,942	30	-	-	/
	13	Semistagionato	0,966	6	+	+ (36)	/
	14	Semistagionato	0,953	26	-	-	/
	70	Semistagionato	0,934	21	+	+ (31)	ST12
	28	Stagionato	0,921	26	-	-	/
	29	Stagionato	0,908	26	+	+ (35)	/
	31	Stagionato	0,925	11	-	+ (39)	/
	44	Stagionato	0,893	26	+	+ (32)	/
	48	Stagionato	0,819	28	+	+ (32)	/
	55	Stagionato	0,928	30	+	+ (30)	ST32

## 10 DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nonostante i *primers* utilizzati nella *endpoint* PCR e nella *Real time* PCR amplificassero una sequenza appartenente alla stessa regione del genoma di *Coxiella burnetii*, il fatto che 22/70 campioni fossero positivi al saggio di *Real time* PCR, mentre, di questi, solo 15/70 fossero positivi anche al saggio di *endpoint* PCR, può essere dovuto al fatto che la *Real time* PCR è caratterizzata da una maggiore sensibilità (Valasek e Repa, 2005). Infatti, I campioni che sono risultati falsi negativi alla *endpoint* PCR erano quelli caratterizzati da elevati Ct.

Per quanto riguarda il processo di produzione dei formaggi, comparando il tasso di positività registrato per i formaggi artigianali (7/70) a quello dei formaggi industriali (15/70), il fatto che i formaggi industriali fossero positivi con una percentuale maggiore di quelli artigianali potrebbe essere dovuto al fatto che i primi sono stati prodotti a partire da latte proveniente da un numero maggiore di animali ed di greggi, come suggerito da Eldin *et al.* (2013).

Inoltre, poiché *Coxiella burnetii* è un patogeno obbligato, il fatto che i formaggi semistagionati e quelli stagionati fossero positivi con una percentuale maggiore di quella evidenziata per i formaggi freschi potrebbe essere dovuta al fatto che nei primi *Coxiella burnetii* potrebbe essere più concentrata a causa del minore contenuto di umidità.

Per quanto riguarda il potenziale rischio per la salute umana in seguito al consumo di formaggi infetti con *Coxiella burnetii* bisogna considerare che la trasmissione del batterio dagli animali all'uomo avviene principalmente per via inalatoria (Van den Brom *et al.*, 2015). Al contrario, sebbene la trasmissione di *Coxiella burnetii* per via orale attraverso l'ingestione di formaggio infetto non sia stata ancora del tutto chiarita, attualmente il consumo di formaggio infetto non può essere escluso come fattore di rischio per lo sviluppo della febbre Q nell'uomo (EFSA, 2010). In riferimento a ciò, è stato dimostrato per via sperimentale che *Coxiella burnetii* può sopravvivere in formaggi prodotti a partire da latte crudo (Babudieri e Moscovici, 1950; Šipka, 1958).

Dunque risulta opportuno trattare termicamente il latte (63 °C per 30 minuti o 72 °C per 15 secondi, Juffs e Deeth, 2007) prima della caseificazione ed utilizzare *starters* commerciali.

L'analisi MST ha permesso di evidenziare per la prima volta in Italia la presenza dei genotipi ST12 ed ST32; infatti fino ad oggi in sono stati descritti solamente i genotipi

ST16, ST18 e ST29 in campioni umani, mentre tre nuovi ST profili, uno simile a ST20, uno a ST8 e uno a ST27 sono stati evidenziati in latte bovino, in un feto di capra ed in latte di capra (Di Domenico *et al.*, 2014). Oltre a ciò, sebbene il genotipo ST12 sia già stato descritto in campioni umani in Francia, Svizzera e Senegal, il nostro studio ha permesso di identificarlo per la prima volta in campioni animali. Inoltre, sebbene il genotipo ST32 sia stato già evidenziato in una placenta di capra in Austria ed in campioni umani in Germania ed in Francia, la nostra ricerca ha consentito di mettere in evidenza per la prima volta questo genotipo in un campione ovino.

In conclusione, altri studi devono essere condotti per valutare la presenza di *Coxiella burnetii* nei greggi ovi-caprini in Toscana per meglio capire quali siano i genotipi maggiormente coinvolti negli episodi di malattia che possono colpire non solo gli animali, ma anche l'uomo attraverso il consumo di alimenti.

## 11 BIBLIOGRAFIA

Abinati F.R., Welsh H.H., Winn J.F., Lennette E.H., 1955, Q fever studies. XIX. Presence and epidemiologic significance of *Coxiella burnetii* in sheep wool. Am J Hyg 61 (3): 362-370.

Angelakis E., Raoult D., 2010, Q fever. Vet Microbiol 140: 297-309.

Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., 2005, Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis ?, Vet Res 36(3):327-349.

Babudieri B., 1959, Q fever. A zoonosis. Adv Vet Sci 5: 81-182.

Babudieri B., Moscovici C., 1950, Research on the behavior of *Coxiella burnetii* in relation to various physical and chemical agents. Sup Sanit 13 (9-10): 739-748.

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.

Berri M., Rousset E., Champion J.L., Arricau-Buoverly N., Russo P., Pepin M., Rodolakis A., 2003, Ovine manure used as a garden fertiliser is suspected to be a contamination source of two human Q fever cases. Vet Rec 153: 269-270.

Borriello G., Iovane G., Galiero G., 2010, Q fever in domestic ruminants. Large Anim Rev 16 (6): 273-283.

Burnet F. M., Freeman M., 1937, Experimental studies on the virus of Q fever. Med J Aust 2:299-302.

Carcopino X., Raoult D., Bretelle F., Boubli L., Stein A., 2007, Managing Q fever during pregnancy the benefits of long-term cotrimoxazole therapy. Clin Infect Dis 45: 548-555.

D.M. 15 dicembre 1990. Sistema informativo della malattie infettive e diffuse. GU n. 6 del 08/01/1991.

D.P.R. 14 gennaio 1997, n. 54. Regolamento recante attuazione delle direttive 92/46 e 92/47/CEE in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e di prodotti a base di latte. GU n. 59 del 12/03/1997.

D.P.R. 8 febbraio 1954, n. 320. Regolamento di Polizia Veterinaria (artt. 154-158). GU n. 142 del 24/06/1954.

Derrick E.H., 1937, Q fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Med J Aust 2: 281-299.

Derrick E.H., 1973, The course of infection with *Coxiella burnetii*. Med J Aust 1: 1051-1057.

Di Domenico M., Curini V., De Massis F., Di Provvido A., Scacchia M., Cammà C., 2014, *Coxiella burnetii* in Central Italy: Novel Genotypes Are Circulating in Cattle and Goats. Vector Borne Zoonotic Dis 14: 710-715.

Eldin C., Angelakis E., Renvoise A., Raoult D., 2013, *Coxiella burnetii* DNA, but not viable bacteria, in dairy products in France. Am J Trop Med Hyg 88: 765-769.

EFSA (European Food Safety Authority) 2010. Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). Scientific opinion on Q fever. EFSA J 8 (5): 1595-1708.

Farina R., Scatozza F., 1998, Trattato di malattie infettive degli animali. UTET. Torino, pp:464-467.

Fournier P.E., Etienne J., Harle J.R., 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.

Glazunova O., Roux V., Freylikman O., Sekeyova Z., Fournous G., Tyczka J., Tokarevich N., Kovacava E., Marrie T.J., Raoult D., 2005, *Coxiella burnetii* genotyping. Emerg Infect Dis 11 (8): 1211-1217.

Guatteo R., Beaudeau F., Joly A., Seegers H., 2007, *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. Vet Res 38: 849-860.

Hackstadt T., Williams J.C., 1981, Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cell by *Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 78: 3240-3244.



Hellenbrand W., Breurer T., Petersen L., 2001, Changing epidemiology of Q fever in Germany. 1947-1999. *Emerg Infect Dis* 7: 789-796.

Hirai A., Nakama A., Chiba T., Kai A., 2012, development of a method for detecting *Coxiella burnetii* in cheese samples. *J Vet Med Sci* 74: 175-180.

Honstetter 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 Tolllike receptor 4. *J Immunol* 172: 3695-3703.

Hoover T.A., Vodkin M.H., Williams J.C., 1992, A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol* 174 (17): 5540-5548.

Houpikian P., Habib G., Mesana T., Raoult D., 2002, Changing clinical presentation of Q fever endocarditis. *Clin Infect Dis* 34: E28-E31.

Juffs H., Deeth H., 2007, Scientific Evaluation of Pasteurisation for Pathogen Reduction in Milk and Milk Products. FSANZ. Canberra pp: 43-47.

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.

Kruszewska D., Tylewska-Wierzbanowska S.T., 1993, *Coxiella burnetii* penetration into the reproductive system of male mice, promoting sexual transmission of infection. *Infect Immun* 61: 4188-4195.

Kruszewska D., Tylewska-Wierzbanowska S.T., 1997, Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. Res Vet Sci 62: 299-300.

Lamas C.C., Rozental T., Bóia M.N., Favacho A.R., Kirsten A.H., da Silva A.P., de Lemos E.R., 2009, Seroprevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in human immunodeficiency virus-positive patients in Jacarepaguá , Rio de Janeiro, Brazil. Clin Microbiol Infect 15 Suppl 2: 140-141.

Lipton J.H., Fong T.C., Gill M.J., Burgess K., Elliott P.D., 1987, Q fever inflammatory pseudotumor of the lung. Chest 92:756-757.

Lohuis P.J.F.M., Ligtenberg P.C., Dieperslost R.J.A., de Graaf M., 1994, Q fever in a patient with a ventriculo-peritoneal drain. Case report and short review of the literature. Netherlands J Med 44: 60-64.

Maltezou H.C., Raoult D., 2002, Q fever in children. Lancet Infect Dis 2: 686-691.

Marrie T., 1988, Liver involvement in acute Q fever. Chest 94: 896-898.

Marrie T.J., Raoult D., 2002, Update on Q fever, including Q fever endocarditis. Curr Clin Top Infect Dis 22: 97-124.

Marrie T.J., 1993, Q fever in pregnancy. Report of two cases. Infect Dis Clin Pract 2: 207-209.

Marrie T.J., 2007, Epidemiology of Q fever. In : Raoult D., Parola P. (eds) Rickettsial diseases. Informa Healthcare. New York pp: 281-289.

Marrie T.J., Stein A., Janigan D., Raoult D., 1996, Route of infection determines the clinical manifestation of acute Q fever. *J Infect Dis* 173: 484-487.

Maurin M., Raoult D., 1999, Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12: 518-553.

Panning, M., Kilwinski, J., Greiner-Fischer, S., Peters, M., Kramme, S., Frangoulidis, D., Meyer, H., Henning, K., Drosten, C., 2008. High throughput detection of *Coxiella burnetii* by real-time PCR with internal control system and automated DNA preparation. *BMC Microbiology*, 8(1), 1.

Petruzzelli A., Amagliana G., Micci E., Fogliani M., Di Renzo E., Brandi G., Tonucci F., 2013, Prevalence assessment of *Coxiella burnetii* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in bovine rawmilk through molecular identification. *Food Control* 32: 532-536.

Raoult D., Etienne J., Massip P., Iacono S., Prince M.A., Beaurian P., Benichou S., Auvergnat J.C., Mathieu P., Bachet P., 1987, Q fever endocarditis in the south of France. *J Infect Dis* 155: 570-573.

Raoult D., Houpiqian P., Tissot-Dupont H., Riss J.M., Arditi-Djiane J., Brouqui P., 1999, Treatment of Q fever endocarditis: comparison of two regimens containing doxycycline and ofloxacin or hydroxychloroquine. *Arch Int Med* 159: 167-173.

Raoult D., Levy P.Y., Harlé J.R., Etienne J., Massip P., Goldstein F., Micoud M., Beytout J., Gallais H., Remy G., Capron J.P., 1990, Chronic Q fever: diagnosis and follow-up. *Ann NY Acad Sci* 590: 51-60.

Raoult D., Marrie T., Mege J., 2005, Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis* 5(4): 219-226.

Raoult D., Tissot-Dupont H., Foucault C., Gouvernet J., Fournier P.E., Bernit E., Stein A., Nesri M., Harlé J.R., Weiller P.J., 2000, Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1383 infections. *Medicine* 79: 109-123.

Rodolakis A., 2009, Q Fever in dairy animals. *Ann NY Acad Sci* 1166: 90-93.

Siegmán-Ygra Y., Kaufman O., Keysary A., Rzotkiewicz S., Shalit I., 1997, Q fever endocarditis in Israel and a worldwide review. *Scand J Infect Dis* 29: 41-49.

Šipka, M., 1958. Survival of *Coxiella burnetii* in cheese. *Veterinarski Glasnik*, 12, 9-12.

Stein A., Raoult D., 1999, Pigeon pneumonia in Provence. A bird borne Q fever outbreak. *Clin Infect Dis* 29: 617-620.

Tissot-Dupont H., Raoult D., 2007, Clinical aspects, diagnosis and treatment of Q fever. In: Raoult D., Parola (eds) *Rickettsial Diseases*. Informa Healthcare. London pp: 291-301.

Tissot-Dupont H., Raoult D., Brouqui P., Janbon F., Peyramond D., Weiller P.J., Chicheportiche C., Nesri M., Poirier R., 1992, Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med* 93: 472-484.

Tissot-Dupont H., Torres S., Nesri M., Raoult D., 1999, Hiperendemic focus of Q fever related to sheep and wild. *Am J Epidemiol* 150: 67-74.

Valasek, M.A., Repa, J.J., 2005. The power of real-time PCR. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*, 29(3), 151-159.

Van den Brom R.V., Engelen E.V., Roest H.I., Hoek W.V., Vellema P., 2015 *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review *Vet Microbiol* 181(1-2):119-129 DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.011.

Van der Hoek W., Dijkstra F., Schimmer B., Schneeberger P.M., Vellema P., Wijkmans C., Ter Schegget R., Hackert V., Van Duynhoven Y., 2010, Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill* 25: 15-26.

Vicari N., Faccini S., Ricchi M., Garbarino C., Decastelli L., Boldini M., Rosignoli C., Dalmaso A., Bronzo V., Fabbi M., 2013, Occurrence of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk from northwestern Italy. *Vet Rec* 172 (26): 687. DOI: 10.1136/vr.101423.