



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	2
Interfaz personas – animales – medio ambiente (<i>One Health</i>).....	2
El topillo campesino (<i>Microtus arvalis</i>)	3
<i>Coxiella burnetii</i> (agente causal de la Fiebre Q)	6
Justificación	8
Objetivos e hipótesis planteadas en el estudio.....	9
Material y métodos	10
Diseño experimental y área de estudio.....	10
Muestreo de topillo campesino	10
Necropsia y toma de muestras.....	11
Extracción de ADN	12
PCR en tiempo real	14
Análisis de hipótesis	16
Resultados	20
Efectos del uso de diferentes tipos de muestras biológicas para el estudio	20
Prevalencia de <i>C. burnetii</i> en las poblaciones de estudio	21
Resultados del análisis de hipótesis	21
Discusión.....	23
Consideraciones metodológicas.....	23
Discusión de resultados.....	24
Conclusiones.....	26
Valoración personal.....	27
Bibliografía.....	28
Anexos	32

Resumen

Las poblaciones de topillo campesino (*Microtus arvalis*) en Europa, y en España, han experimentado una explosión demográfica en los últimos 30 años debido a cambios antropogénicos sobre el medio ambiente. Esto ha generado repercusiones negativas de carácter socioeconómico y sanitario. El control biológico de estas plagas de roedores es una de las medidas propuestas como alternativa al uso de rodenticidas que puede afectar negativamente a otras especies, en particular a los depredadores del topillo. Es posible que favoreciendo la presencia de depredadores se pueda controlar la circulación de patógenos asociados a estos roedores y proteger, de una forma - desde un punto de vista ambiental - más sostenible, la salud de las personas y de otros animales. En 2009 se instalaron 300 cajas nido en 3 zonas de estudio en Castilla y León (NO, España) para favorecer el asentamiento de cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) y lechuza común (*Tyto alba*). Durante 2012 y 2014 se tomaron muestras de topillo campesino (n=521) de las tres zonas de estudio y se analizó la infección por *Coxiella burnetii* mediante PCR en tiempo real en muestras de bazo (n=503) y grasa (n=18). Se estudió el efecto de factores como el hábitat, características individuales de los topillos, la depredación o la densidad de topillos sobre el riesgo de infección por *C. burnetii*. Los resultados mostraron que los depredadores cazan con mayor probabilidad topillos infectados por *C. burnetii* si lo comparamos con la prevalencia media de la población, lo cual podría indicar que el control biológico basado en depredadores generalistas podría ser una herramienta útil para el control asociado de estos patógenos. Se observaron diferencias estadísticamente significativas según el sexo, siendo más probable la infección en machos que en hembras probablemente asociado a diferencias comportamentales. También se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia en las tres provincias de muestreo. Sin embargo, no se encontró un efecto de la densidad de topillo sobre el riesgo de infección por *C. burnetii*.

Palabras clave: *Coxiella burnetii* / Control biológico / Epidemiología / Fauna silvestre / Roedores/ Topillo campesino / Zoonosis

Abstract

Common vole populations (*Microtus arvalis*) in Europe and Spain have experienced a demographic explosion in the last 30 years due to anthropogenic changes in the environment. This situation has brought up negative socio-economic and sanitary impacts. The biological control of these rodent plagues has been proposed as an alternative measure to the use of rodenticides that can negatively affect other species, particularly predators of voles. It is possible that acting in favour of predators presence would account in the control of the circulation of pathogens associated with these rodents and thereby protect, in a more environmentally sustainable way, the health of people and animals. In 2009, 300 nest boxes were installed

in three study areas in Castilla y León (NW, Spain) with the intention of favouring the settlement of common kestrel (*Falco tinnunculus*) and barn owl (*Tyto alba*) populations. During 2012 and 2014 common vole samples were taken (n=521) from these three study areas, and *Coxiella burnetii* infection was analysed by real time PCR in spleen (n=503) and adipose tissue (n=18) samples. The effect of factors such as habitat, individual characteristics, predation or the density of voles on the risk of infection by *C. burnetii* were studied. Results showed that infected voles' preying probability is higher if we compare it with the average prevalence of infection in the population, which could indicate that the biological control based on generalist predators is a valuable tool for pathogen control. Statistically significant differences were observed between sexes, being the probability of infection higher in males than in females, probably associated to behavioural differences. Statistically significant differences in prevalence were observed in the three study areas, too. However, no effects of vole density on the risk of *C. burnetii* infection were observed.

Key words: Biological control / *Coxiella burnetii* / Common vole / Epidemiology / Rodents / Wildlife / Zoonoses

Introducción

Interfaz personas – animales – medio ambiente (*One Health*)

"*One Health*" es un concepto introducido a principios del siglo XXI en el ámbito de la salud pública. Se entiende como una integración multidisciplinar cuyo objetivo es abordar problemas sanitarios desde un punto de vista holístico. Integrando la salud de las personas, animales y ecosistemas (*Figura 1*), y mediante la implementación de políticas sanitarias adecuadas, pretende elaborar estrategias de prevención y control de patógenos que sean aplicables desde un nivel local a una escala mundial (OIE, 2017).



Figura 1. La tríada "Una Salud", interfaz de enfermedades compartidas entre personas y animales domésticos y silvestres, y el medio ambiente (Thompson, 2013).

En este marco de “un mundo, una salud”, cabe destacar la importancia de las enfermedades infecciosas emergentes (EIDs, del inglés "*Emerging Infectious Diseases*"), ya que la mayoría (63%) son zoonóticas y proceden de animales (Taylor et al., 2001). Dentro de estas EIDs zoonóticas, un 71,8% tienen su origen en fauna silvestre, representando la mayor amenaza para la salud mundial dentro de las EIDs (Jones et al., 2008).

Los cambios en el medio ambiente producidos por el ser humano, el cambio climático y la globalización, están dando lugar a una serie de variaciones en la ecología de los reservorios y vectores de patógenos en todo el mundo, afectando a su distribución y abundancia. Algunos han experimentado cambios importantes en su distribución geográfica acompañados de un incremento en el rango de hospedadores, como es el caso del virus Nipah en la península de Malasia, o el virus que produce el SRAS (Síndrome Respiratorio Agudo Severo) (Bengis et al., 2004).

La epidemiología de patógenos zoonóticos y la ecología de los reservorios están muy relacionadas. Situaciones donde la sobreabundancia y agregación de hospedadores son elevadas, como es el caso de algunas especies de ungulados silvestres, los patógenos se ven favorecidos por un aumento en el contacto entre animales infectados y animales susceptibles. En estas situaciones aumenta la probabilidad de transmisión hacia personas, animales domésticos y especies de fauna silvestre (Gortázar et al., 2006). En Europa, un buen ejemplo es el del jabalí eurasiático (*Sus scrofa*). Este desempeña un importante papel en el mantenimiento y transmisión del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en Europa, es decir, es un reservorio verdadero de tuberculosis animal (Naranjo et al., 2008), y ha generado un aumento importante en la prevalencia de este y otros patógenos debido a su reciente explosión demográfica, entre otros factores (Ruiz-Fons, 2017).

El topillo campesino (*Microtus arvalis*)

La mayor parte de los reservorios de patógenos zoonóticos son especies de mamíferos, principalmente roedores (Mills y Childs 1998), y precisamente el orden de los roedores (Orden Rodentia) es el más abundante y diverso dentro de los mamíferos del planeta. El topillo campesino (*Microtus arvalis* Pallas, 1778), de la familia Cricetidae, se encuentra dentro de este grupo. Es un micromamífero herbívoro de pequeño tamaño (8-13 centímetros de longitud), con un pelaje pardo-amarillento que habita zonas herbáceas extendido desde el oeste de Europa hasta Rusia central.

Los cambios producidos en Europa en los usos del suelo en las últimas décadas han resultado, junto con otros factores, en un incremento drástico en la población de *M. arvalis*. Su asociación a zonas de cultivo y las oscilaciones demográficas cíclicas que experimenta esta especie ha dado lugar a elevadas pérdidas económicas asociadas a daños en zonas de agricultura intensiva, razón por la que se la considera especie

plaga (Jacob y Tkadlec 2010). Además, el efecto de este cambio poblacional ha tenido una repercusión negativa en la salud pública ya que los picos poblacionales (momentos de máxima abundancia) están asociados a brotes de ciertas enfermedades en humanos como la tularemia (Luque-Larena et al., 2015).

Hasta mediados del S. XX la distribución del topillo campesino en España estaba limitada en áreas de montaña de la mitad norte de la Península. A finales de los años 90 la especie se había extendido por casi toda la cuenca del Duero en la C.A. de Castilla y León hasta que, finalmente, acabó colonizando la región por completo, catalogándose como plaga (Figura 2) (Luque-Larena et al., 2013).

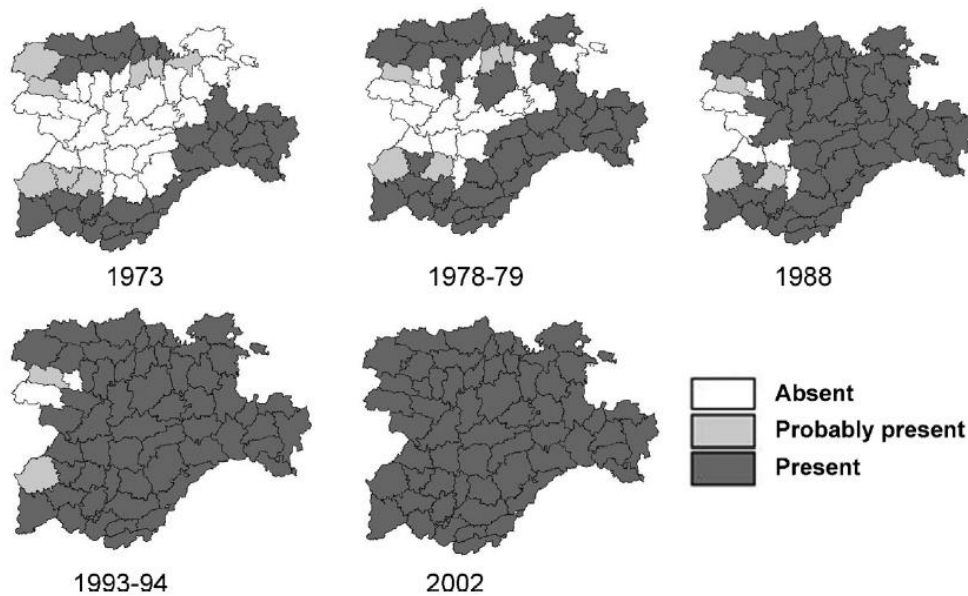


Figura 2. Proceso de colonización de *M. arvalis* en la Comunidad Autónoma de Castilla y León en 29 años. El mapa presenta mediante blanco o gris la presencia o ausencia de *M. arvalis* en comarcas agrarias (n=59). Blanco, ausencia; gris claro, probable presencia; gris oscuro, presencia (Jareño, 2014).

Dinámica poblacional de *M. arvalis*.

La dinámica poblacional de los topillos (*Microtus* spp.), descrita por primera vez por Charles Elton (1924), y confirmada estadísticamente por un estudio teórico temporal de datos de 79 años (Steen et al., 1990), sigue un patrón poblacional que se presenta en forma de ciclos a lo largo del tiempo. Estos ciclos están modulados por una serie de factores extrínsecos, como la depredación (Elton, 1942), patógenos y la disponibilidad de alimento, e intrínsecos, entre los que destaca el comportamiento espacial o las variaciones denso-dependientes en el éxito reproductivo o la dispersión (Krebs, 1994). En el año 2001 aparecen nuevos modelos que explican que estos patrones poblacionales dependen de la interacción de estos factores (Hanski et al., 2001; Lambin et al., 2006).

Los ciclos demográficos se dividen en tres partes: a) fase de ascenso, b) pico poblacional y c) fase de declive (Figura 3). La fase de ascenso comienza a partir de las poblaciones que han sobrevivido al cuello de botella

que se produce en el declive del ciclo anterior. En este momento, la estructura social es estable y se produce una agregación de grupos de individuos, junto con un aumento de sociabilización en hembras reproductoras. Los topillos se benefician de esta situación, agregación en pequeños grupos, debido a una menor competición por el alimento, mayor capacidad de termorregulación, crianza conjunta entre las distintas hembras y disminución del infanticidio. Todo esto da lugar a una amplia dispersión espacial y a la colonización del hábitat si hay suficientes recursos, lo que conduce a un aumento de la densidad de individuos hasta alcanzar el pico poblacional. Tras el pico poblacional se produce la fase de declive, que podría ocurrir por causas diversas. Por ejemplo, el incremento en la presión de depredación en la fase de pico podría dar lugar a una serie de acontecimientos en cadena. Los machos tienen una actividad mayor que las hembras, es decir, se mueven más y en un territorio de mayor tamaño, lo que hace que estén más expuestos a la depredación. Con la desaparición de machos dominantes y territoriales se rompen las estructuras sociales de cada grupo. En estas situaciones otros machos ocupan el lugar de los machos dominantes y esto produce un aumento en la tasa de infanticidio. En este escenario las hembras también presentan cambios comportamentales por los que se desplazan más y se exponen a ser depredadas. Esta consecución de situaciones da lugar a una bajada brusca de la densidad de la población y representa la fase de declive (Andreassen et al., 2013).

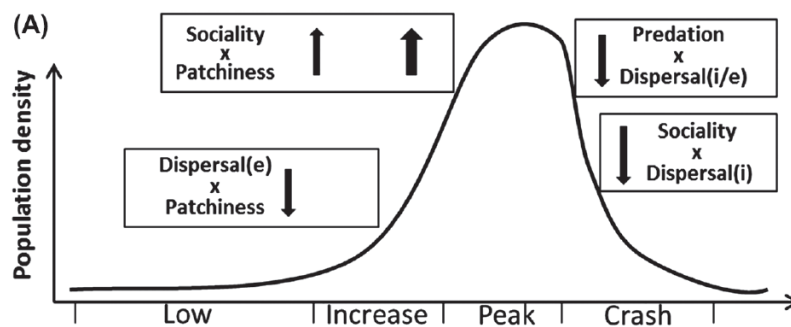


Figura 3. Representación gráfica de las diferentes fases de un ciclo poblacional de *Microtus arvalis* y algunos de los factores extrínsecos e intrínsecos que intervienen en cada fase (Andreassen et al., 2013).

Zoonosis denso-dependientes asociadas a picos poblacionales de *Microtus arvalis*.

La aparición de brotes en humanos de enfermedades transmitidas por roedores puede estar asociada a cambios en la densidad de los roedores (Ostfeld y Holt, 2004). Un ejemplo publicado en 2004 con datos de Kazajistán, muestra una correlación directa entre la prevalencia de peste (causados por la bacteria *Yersinia pestis*) y la abundancia del principal roedor reservorio en esta zona, *Rhombomys opimus* (Davis, 2004).

En el caso de España, se ha visto una relación entre brotes de zoonosis y momentos de máxima abundancia (fase de pico poblacional) de topillo campesino. Un ejemplo destacable son los dos brotes de tularemia

(causada por la bacteria *Francisella tularensis*) en humanos que tuvieron lugar en la Comunidad Autónoma de Castilla y León (España), durante los años 1997-1998 y 2007-2008. Ambos brotes estaban asociados al aumento de la población de *M. arvalis*. En este caso *M. arvalis* actúa como un hospedador secundario (*spillover host*) y la transmisión de *F. tularensis* está muy vinculada a la gran densidad poblacional (Aldea-Mansilla et al., 2008; Luque-Larena et al., 2015). Entre las fases de declive y ascenso son otros los hospedadores reservorios de *F. tularensis* (Gyuranecz et al., 2011) y por ello no se considera al topillo campesino como verdadero reservorio de la tularemia.

Microtus arvalis como reservorio de múltiples patógenos zoonóticos.

M. arvalis puede infectarse por numerosos agentes infecciosos a la vez, actuando como potencial fuente de múltiples patógenos zoonóticos (Schmidt et al., 2014). Los momentos de pico poblacional pueden implicar una mayor carga ambiental de estos microorganismos, bien por una mayor probabilidad de transmisión, o bien por un aumento en el “stress” que produzca mayor vulnerabilidad en los individuos frente a patógenos. Esta situación produciría un aumento de su presencia en el medio ambiente debido a una mayor contaminación mediante excreciones o cadáveres de topillos. De este modo, aumenta la probabilidad de contagio a otros reservorios u hospedadores, como el ser humano.

El topillo campesino puede infectarse y portar patógenos con potencial zoonótico como el virus Tula (TULV) del género *Hantavirus*, *Listeria monocytogenes*, *Babesia microti* o *Echinococcus multilocularis*, entre otros. Estos son algunos de los patógenos que estos roedores pueden mantener y transmitir de forma directa o indirecta al ser humano, pero además pueden participar en el ciclo enzoótico de enfermedades transmitidas por garrapatas, como es el caso de la enfermedad de Lyme. El topillo campesino puede transmitir las espiroquetas del género *Borrelia* (*B. burgdorferi*, *B. garinii* y *B. afzelii*) causantes de la enfermedad de Lyme a garrapatas de la especie *Ixodes ricinus* que posteriormente pueden infectar al ser humano a través de la picadura (Meerburg et al., 2009; Schmidt et al., 2014).

Coxiella burnetii (agente causal de la Fiebre Q)

La fiebre Q es una zoonosis distribuida por todo el mundo salvo Nueva Zelanda. El agente causal de esta enfermedad es *C. burnetii*, una bacteria intracelular Gram-negativa. *C. burnetii* tiene un amplio rango de hospedadores, incluyendo mamíferos, aves, peces, reptiles y artrópodos, mayoritariamente garrapatas (Maurin y Raoult 1999). Inicialmente, como el resto de bacterias intracelulares, fue incluida dentro del orden Rickettsiales. En el año 1993 se publicó un estudio filogenético basado en la secuenciación del gen 16S ARNr de *C. burnetii* (Stein et al., 1993) que dio lugar a la reclasificación de la bacteria. Esta fue incluida en el orden Legionellales, perteneciente a la clase Gammaproteobacteria, familia Coxiellaceae.

Resulta difícil estimar la prevalencia de infección por *C. burnetii* en todo el mundo, dado que, aunque en algunos países desarrollados se ha convertido en una enfermedad de declaración obligatoria en humanos (ej. la mayor parte de países de la Unión Europea), en los países en vías de desarrollo los recursos disponibles y la relevancia frente a otras enfermedades con efectos mucho más devastadores sobre la salud humana hacen difícil su diagnóstico (Caetano et al., 2017).

Se ha demostrado que *C. burnetii* infecta a casi todos organismos del Reino Animal, entre ellos, roedores, ungulados, carnívoros, mamíferos marinos, micromamíferos, aves domésticas, reptiles, peces y muchas especies de garrapatas. Se sabe que los roedores, entre ellos *M. arvalis*, están implicados en el mantenimiento de *C. burnetii*. Sin embargo, se desconoce mucho acerca de su papel epidemiológico y de los factores que condicionan el mantenimiento, propagación geográfica y transmisión de esta bacteria zoonótica (Meerburg y Reusken 2011).

Los rumiantes domésticos, como vacas, cabras y ovejas, son los principales reservorios de *C. burnetii* para el ser humano. En los pequeños rumiantes la infección por *C. burnetii* puede causar cuadros de fallo reproductivo, incluyendo pérdidas embrionarias y fetales, por ej. mortalidad embrionaria que resulta en retornos a celo o abortos que se producen al final de la gestación. La mayoría de casos en humanos suelen ser infecciones subclínicas, pero cuando son sintomáticas suelen presentarse inicialmente con cuadros agudos febriles acompañados de malestar y dolor de cabeza, entre otros síntomas. La mayoría de pacientes con curso agudo de fiebre Q se recuperan en 2 o 3 semanas sin tratamiento. Sin embargo, en algunas ocasiones estos cuadros agudos desembocan en hepatitis o neumonía agudas que se pueden complicar. Un porcentaje de los casos clínicos agudos evolucionan hacia cuadros crónicos más severos (Maurin y Raoult, 1999). Aunque a priori parece que la transmisión desde la fauna silvestre hacia el ser humano no es importante por la gran prevalencia en rumiantes domésticos, es cada vez más evidente que diversas especies de fauna silvestre son importantes en el mantenimiento de la bacteria en la naturaleza (González-Barrio et al., 2015). Las especies de fauna silvestre podrían ser una fuente importante de contagio para los ungulados domésticos con los que coexisten que actúan como reservorios principales de *C. burnetii* para el ser humano (Caetano et al., 2017). Así, la transmisión desde la fauna silvestre puede ser tanto directa como indirecta mediada por hospedadores domésticos.

C. burnetii se excreta en orina, heces y leche de animales infectados. Las concentraciones más altas de bacterias aparecen en la placenta, membranas fetales y líquido amniótico. Algunas formas de esta bacteria presentan elevada resistencia ambiental, y el viento puede transportar estas formas de resistencia a largas distancias desde el origen, aunque la transmisión por cercanía es más frecuente. La transmisión, tanto a humanos como animales susceptibles, se produce fundamentalmente por inhalación de aerosoles o

partículas de polvo contaminadas con esas formas de resistencia ambiental de *C. burnetii*. La transmisión de *C. burnetii* es, en cierta medida, dependiente de densidad de hospedadores susceptibles, razón por la que los cambios poblacionales en el topillo campesino podrían derivar en cambios en la dinámica de transmisión de este agente infeccioso (Caetano et al., 2017).

Justificación

Se puede decir que *C. burnetii* es un patógeno multi-hospedador, es decir, que abarca una amplia red de hospedadores. En este tipo de patógenos la identificación de reservorios y hospedadores secundarios, entre ellos especies de fauna silvestre que intervienen en la amplia red epidemiológica de mantenimiento y transmisión, es crucial para poder establecer medidas de control y vigilancia (Bengis et al., 2004; Viana et al., 2014). Dentro de esta red, los roedores y en este caso *M. arvalis*, podrían desempeñar un importante papel de mantenimiento de *C. burnetii*. Al ser portadores de múltiples patógenos, pueden participar en el escenario epidemiológico de otras muchas enfermedades.

En las últimas décadas, la C. A. de Castilla y León ha presenciado plagas cíclicas del topillo campesino. En otoño de 2013 la Junta de Castilla y León declaró la presencia de una nueva plaga de topillo campesino en la Comunidad Autónoma. En otras ocasiones en esta misma región han utilizado productos rodenticidas para controlar plagas de *M. arvalis*. En primavera del año 2007, se llevó a cabo un procedimiento de control de plagas de roedores mediante la distribución de clorofacinona, un rodenticida anticoagulante de primera generación, en grano esparcido con abonadoras, durante el verano de ese mismo año se distribuyó de nuevo en tubos. En primavera del año 2008, se empleó bromadiolona, rodenticida anticoagulante de segunda generación, metida en huras de topillo. En un estudio publicado un año más tarde se observaba que las zonas donde se había aplicado tratamiento con estas sustancias mostraban una prevalencia más alta de *Francisella tularensis* en los topillos, especialmente en los que se encontraron muertos (66.7%) (Vidal et al., 2009). Además, se observó que la distribución de este tipo de veneno en el medio ambiente puede acabar afectando a otras especies, bien por consumo directo o bien por intoxicaciones secundarias por depredar sobre topillos envenenados o carroñear sobre topillos muertos por rodenticidas (Mougeot et al., 2011). En 2017 se publicó un estudio llevado a cabo en Castilla y León, en el que se observaba que los polluelos de cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) con concentraciones altas de bromadiolona en sangre, tenían una condición corporal menor que polluelos en los que no se detectó esta sustancia (Martínez-Padilla et al., 2017). La pérdida de biodiversidad, como es el caso de depredadores, afecta a la transmisión de enfermedades infecciosas entre seres humanos, animales y plantas. Este efecto se ve sobre todo con la pérdida de especies depredadoras generalistas. Favorecer las poblaciones de estas especies, puede de forma indirecta proteger la salud de las personas, mediante el control de poblaciones que actúan como

reservorios para patógenos que afectan al ser humano (Keesing et al., 2010; Ostfeld y Holt, 2004). Con el objetivo de obtener herramientas alternativas al uso de rodenticidas para controlar las plagas de topillos, hace unos años se impulsó una iniciativa basada en el control biológico de *M. arvalis*. Así, en el año 2009 se empezaron a instalar cajas nido en áreas específicas de la C.A. de Castilla y León con el fin de favorecer el anidamiento de especies rapaces generalistas y depredadores de topillos, en particular de cernícalo vulgar y lechuza común (*Tyto alba*).

En este trabajo, se evalúa como el control biológico vinculado a favorecer la presencia de depredadores generalistas puede afectar a la circulación de agentes zoonóticos en poblaciones de topillo campesino y contribuir a su control. Como modelo de estudio se utilizó la bacteria *C. burnetii*, cuya denso-dependencia de hospedador (González-Barrio et al., 2015) puede ser indicadora de cómo pueden contribuir los depredadores al control de otros patógenos zoonóticos, p. ej. *Francisella tularensis*. Aunque no se han observado efectos clínicos de la infección por *C. burnetii* sobre *M. arvalis*, a diferencia de *F. tularensis* (Rossow et al., 2014), ambos patógenos podrían verse afectados de la misma forma por los depredadores, siendo esta bacteria a priori un buen modelo para aproximar el efecto sobre otros patógenos zoonóticos.

Objetivos e hipótesis planteadas en el estudio

- 1) En primer lugar, con intención de profundizar en la epidemiología de *C. burnetii* en *M. arvalis* y para poder construir, a posteriori, unas bases científicas más sólidas de estrategias para el control de las infecciones por patógenos zoonóticos en estos roedores, se plantearon una serie de cuestiones básicas de funcionamiento de la epidemiología de este patógeno. Se planteó un primer estudio bajo la hipótesis de que el hábitat y algunas características individuales de los topillos vinculadas al comportamiento (ej. sexo), a condición corporal o a condición inmunológica, modulan el riesgo de infección.
- 2) En segundo lugar se abordó el objetivo principal de este estudio: comprobar si existe una depredación selectiva por parte del cernícalo vulgar y de la lechuza común (depredadores generalistas), hacia topillos infectados por agentes patógenos utilizando *C. burnetii* como modelo. La hipótesis para el diseño de este estudio es que la probabilidad de un topillo infectado por patógenos de ser depredado es mayor que la de un individuo no infectado (a priori "sano").
- 3) Por último, el tercer objetivo de este estudio pretende evaluar los posibles cambios en la prevalencia de patógenos asociados a cambios en la abundancia de topillos. La hipótesis planteada en este caso es que la prevalencia de *C. burnetii* en poblaciones de topillos varía en función del momento del ciclo poblacional en el que se encuentran estos micromamíferos, pudiendo ser *C. burnetii* un patógeno denso-dependiente, es decir, con prevalencias más altas en momentos de máxima abundancia y más bajas en momentos de baja abundancia de topillos.

Material y métodos

Diseño experimental y área de estudio

El área de estudio se localiza en la meseta norte de la Península, concretamente en las provincias de Palencia (Boada de Campos y Capillas), Valladolid (Villalar de los Comuneros) y Zamora (San Martín de Valderaduey), en la C.A. de Castilla y León. En cada provincia se seleccionó un área de 2000 hectáreas de hábitat agrícola predominante. Se seleccionaron zonas similares en cada una de las tres áreas réplica del estudio en relación al paisaje y a los usos del suelo. Entre los años 2009 y 2010 se instalaron de forma dispersa 50 cajas nido para cernícalo vulgar y 50 para lechuza común en cada área de estudio, en total 300 cajas (Figura 4, Paz et al., 2013). En estas zonas se realizó un control de abundancia de topillos, además del seguimiento de la ocupación y reproducción de rapaces en las cajas nido (Jareño, 2014, Capítulo 5).



Figura 4. Izda.: macho de cernícalo vulgar con un ejemplar de topillo campesino recién cazado sobre una de las cajas nido del proyecto de control biológico. Dcha.: voluntaria de GREFA revisa el interior de la caja nido (GREFA, Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Hábitat).



Figura 5. Trampas Sherman para captura en vivo de micromamíferos (BIOWEB Colombia).

Muestreo de topillo campesino

A lo largo del estudio, que comprendió los años 2012 y 2014, se realizaron capturas de topillo campesino mediante cajas trampa. Se colocaron aproximadamente 1300 trampas Sherman LFTA (8x9x23cm;

Sherman®, H.B. Sherman Traps, Tallahassee, FL, EEUUAA) (Figura 5), distribuidas en 12 parcelas por provincia. Dentro de cada parcela se colocaron 35 trampas, en 2012 se distribuyeron en las bocas de las colonias, en parcelas de alfalfa y en la linde de éstas, mientras que en 2014 se colocaron en forma de T (Paz et al., 2013). En 2014 se registró el tipo de cultivo en el que estaban colocadas las cajas trampa (cereal *versus* alfalfa) así como el sistema de cultivo (regadío *versus* secano). Las capturas se realizaron de forma continuada durante el periodo de estudio con revisión diaria. Durante las capturas un porcentaje de los topillos capturados fueron tranquilizados con ketamina (Imalgene 500) a dosis de 10 mg/kg por vía intramuscular y posterior eutanasiados por dislocación cervical. Este estudio se realizó con la aprobación del Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad de Castilla - La Mancha y los procedimientos con los animales cumplieron con la normativa vigente.

Con frecuencia semanal y durante los meses de cría de los depredadores (mayo y junio) del año 2014 se recogieron topillos directamente de las cajas nido ocupadas por parejas de ambas especies de rapaces depredadoras. Los ejemplares recolectados fueron topillos campesinos cazados por las aves rapaces y transportados a las cajas nido para alimentar a sus crías. Se seleccionaron los individuos que conservaban el cuerpo más íntegro y cazados recientemente. A pesar de este protocolo de muestreo, muchos de los topillos recolectados no tenían cabeza y algunos presentaban la cavidad torácica y abdominal vacías.

De forma paralela a los muestreos de cajas nido y a los trampeos en 2014, se recolectaron todos los cadáveres de topillo campesino encontrados en las zonas de estudio. Todos los ejemplares para estudio fueron inmediatamente conservados en congelación a -20°C hasta la realización de las necropsias en el edificio del IREC (Instituto de investigación en Recursos Cinegéticos) en Ciudad Real.

Para este trabajo se utilizaron finalmente ejemplares de topillo campesino recogidos durante los años 2012 y 2014. En Valladolid, la población de topillos se ha mantenido estable (Paz et al., 2013), mientras que, en Palencia y Zamora, si se han presentado mayores oscilaciones en la población de topillos, presentando baja abundancia en el año 2012 (Jareño, 2014, Capítulo 5) y alcanzando el pico poblacional en el año 2014, con un mayor incremento de la población de Palencia (Juan José Luque-Larena et al., 2015; Viñuela et al., 2015).

Necropsia y toma de muestras

Siguiendo el protocolo de necropsias de micromamíferos utilizado en el IREC (ver Anexo I), se realizó una necropsia reglada en los ejemplares de topillo seleccionados para el estudio (Figura 6). La necropsia se realizó en la sala de necropsias del IREC (Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos, Ciudad Real) que presenta un nivel 2 de bioseguridad.

Durante las necropsias se tomaron datos biométricos como la longitud cabeza-cuerpo (LCC), el peso (en gramos), tamaño y peso de los principales órganos parenquimatosos (hígado, bazo, riñones) y de órganos reproductores masculinos (testículos) (ver Anexo II). Los individuos fueron sexados durante la necropsia. En la necropsia se recogió cualquier evidencia de lesiones macroscópicas en los principales órganos de los sistemas respiratorio, circulatorio, digestivo, sanguíneo, urinario y reproductor. Se recolectaron muestras de estos órganos que fueron conservadas a -20°C hasta los análisis.



Figura 6. Fotografía tomada durante las necropsias de una hembra de *Microtus arvalis* junto a las crías recién nacidas.

Extracción de ADN

Finalizadas las necropsias y obtenidas las muestras de todos los topillos incluidos en el estudio, se extrajo material genético (ADN) de las muestras de bazo recolectadas. Algunos de los animales cazados y recogidos en cajas nido no tenían bazo, por lo que en base a un estudio publicado en 2014 que señala la detección de *C. burnetii* en tejido adiposo hasta 4 meses post-infección (Bechah et al., 2014), la grasa subcutánea recogida de estos individuos fue utilizada como muestra alternativa. Para comprobar si utilizar esta muestra en lugar de bazo pudo ocasionar algún sesgo en el estudio se comparó la proporción de muestras de grasa positivas en relación a la proporción de bazos positivos en individuos cazados por depredadores en 2014. La hipótesis de que la diferencia en estas proporciones es estadísticamente significativa se analizó realizando un test de chi-cuadrado con el paquete "stats" de Rv3.4.0 en RStudio v1.0.143 (© 2009-2016 RStudio Inc., Boston, MA, EEUUAA).

La extracción de ADN se hizo utilizando el kit NucleoSpin®Tissue (MACHEREY-NAGEL, Düren, Alemania), mediante un protocolo estándar modificado para tejidos y cultivos celulares de humanos y animales. El protocolo y el equipamiento utilizados se explican a continuación:

1) Preparación de la muestra.

- a. Cortar 25mg del tejido en trozos más pequeños (homogeneizar) e introducir en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

2) Lisado de la muestra.

- a. Añadir 180 µL de Buffer T1 y una bola de carburo de tungsteno de 3mm (Qiagen N.V., Hilden, Alemania). Lisar la muestra en homogeneizador por agitación (TissueLyser II, Qiagen N.V., Hilden, Alemania).
- b. Añadir 25 µL de una solución de Proteinasa K y aplicar un vórtex para mezclarlo y mantener en Eppendorf® Thermomixer Compact (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EEUU) entre 1 a 3 horas en condiciones de 56°C y agitación constante a 850 rpm.
- c. Añadir 200 µL de Buffer T3, aplicar un vórtex para mezclar el contenido y mantener en Eppendorf® Thermomixer Compact durante 10 minutos en condiciones de 70°C y 350rpm.

3) Ajuste de las condiciones de unión del ADN

- a. Añadir 210 µL de etanol absoluto (pureza 100%) y aplicar un vórtex para mezclar el contenido.

4) Unión del ADN

- a. Colocar una columna 'NucleoSpin®Tissue Column' del kit dentro de un tubo de colección de 2mL, añadir la muestra a la columna y centrifugar durante 1 minuto a 11,000 x g.

5) Lavado de la membrana de sílice.

- a. Adición de 500 µL de 'Buffer BW' del kit y centrifugar 1 minuto a 11,000 x g.
- b. Adición de 600 µL de 'Buffer B5' del kit y centrifugar 1 minuto a 11,000 x g.

6) Secado de la membrana de sílice.

- a. Centrifugar 1 minuto a 11,000 x g para desechar los restos de etanol que podrían interferir en los resultados de la PCR.

7) Elución del ADN (en este paso se siguieron diferentes procedimientos en función de si la muestra procedía de bazo o grasa para optimizar cantidad y concentración de material genético).

- a. Añadir 50 µL (en el caso del bazo) o 30 µL (en el caso de la grasa) de tampón de elución, incubar 1 minuto a Tª ambiente y centrifugar durante 1 minuto a 11,000 x g.
- b. Añadir 50 µL (en el caso del bazo) o 30 µL (en el caso de la grasa) de tampón de elución, incubar 1 minuto a Tª ambiente y centrifugar durante 1 minuto a 11,000 x g.

Se obtuvieron 100 µL y 60 µL de elución de ADN para cada muestra de bazo y grasa, respectivamente. Las muestras se congelaron a -20°C en tubos de 0,2mL hasta su análisis. Durante la extracción se intercalaron columnas sin muestra (1 por cada 10 muestras) con el objetivo de obtener controles de extracción para detectar posibles contaminaciones cruzadas durante el proceso. Todo el proceso de extracción se hizo en

cabina de nivel de bioseguridad 2 para minimizar contaminaciones cruzadas (Bio II Advance, Telstar Life Science, Terrassa, España).

PCR en tiempo real

Las muestras de ADN obtenidas se analizaron para la detección de presencia de material genético de *C. burnetii* mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real según protocolo previamente descrito (IS1111a; González-Barrio et al., 2015). La PCR es una técnica de biología molecular utilizada para la detección de fragmentos de ADN basada en la obtención de un elevado número de copias de estos fragmentos a partir de una secuencia específica localizada en el genoma diana. Este tipo de PCR, en tiempo real, además permite la amplificación y detección simultáneas y la semi-cuantificación de copias de ADN diana en la muestra original (Figura 7).

El proceso de amplificación consiste en la repetición de un número específico de ciclos sucesivos donde se aplican diferentes temperaturas en intervalos de tiempo determinados. En cada ciclo el aumento de temperatura inicial hasta 95°C hace que el ADN se desnaturalice, separándose en las dos cadenas que lo componen. Mientras el ADN permanece separado, los cebadores o "*primers*" y la sonda de ADN utilizada en este caso se unen en lugares específicos de cada cadena con las condiciones de Tª adecuadas (60°C en este caso, *Tabla 1*). Los cebadores actúan de iniciadores para que la enzima ADN polimerasa empiece a formar una cadena complementaria a partir de cada cebador, y cuando llega a la zona donde se ha unido la sonda marcada con un fluoróforo la fase de elongación se detiene y se libera la sonda, emitiendo una fluorescencia que es detectada por el termociclador.

Para llevar a cabo esta técnica son necesarios una serie de reactivos entre los cuales se incluyen dos cebadores ("*forward*" y "*reverse*"), que son cadenas cortas de oligonucleótidos que se utilizan como punto de partida para que la enzima ADN polimerasa inicie la replicación de la cadena de ADN. Además, para la PCR en tiempo real, es necesario utilizar secuencias de nucleótidos (sonda) unidas a un fluoróforo capaces de emitir fluorescencia detectada por el termociclador en cada ciclo. En este caso se utilizó una sonda molecular muy específica de la secuencia de amplificación de ADN (González-Barrio et al., 2015; *Tabla 2*). Además, se utilizó un mix con los desoxirribonucleótidos (dNTPs), el tampón de reacción y la enzima polimerasa para la PCR (SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix, Bio- Rad, EEUUAA). La preparación del mix y la adición de las muestras de ADN extraídas de los bazos/grasa de los topillos se realizó en cabina de flujo laminar de nivel de bioseguridad II para evitar contaminaciones cruzadas (Mini V/PCR Vertical Laminar Flow Bench, Telstar, España). La amplificación de ADN se realizó en un laboratorio diferente al que se utilizó para realizar el proceso de extracción con la finalidad de reducir al máximo el riesgo de contaminaciones cruzadas.

Las reacciones de PCR se realizaron en placas de 96 pocillos estériles y libres de ADNasas y ARNasas en termociclador iQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUUAA). Cada alícuota contenía un volumen total de 20 µL (Tabla 3). Con la finalidad de corroborar la ausencia de contaminaciones cruzadas, por cada 25 muestras de PCR se utilizó un control negativo de PCR en el que en lugar de copia de ADN se incorporaron 7 µL de agua de PCR estéril y libre de ADNasas y ARNasas. Los controles de extracción también se analizaron mediante PCR. Finalmente, para comprobar el funcionamiento correcto de cada reacción de PCR se incluyó un control positivo de PCR por cada reacción. Como control positivo se utilizó una muestra de ADN extraída de una vacuna comercial frente a *C. burnetii* (Coxevac, CEVA Santé Animale, Francia).

Tabla 1. Protocolo de PCR en tiempo real para amplificación de ADN de *C. burnetii*.

Número de ciclos	Temperatura	Duración
50	95,0 °C	1 segundo
	60,0 °C	12 segundos

Tabla 2. *Primers* y sonda utilizados en la detección de *C. burnetii* con PCR en tiempo real.

Primer o sonda	Secuencia (5'-3') ^a	Localización ^b	Tamaño del amplicón (pb) ^c
QKF3	GTGGTGCCAAGCGATTTAT	7216–7235	78
QKR3	GTTTCATCCGCGGTGTTAAT	7293–7274	
QKP3	FAM-TTTAGCGAGCGAAGC	7253–7272	
	GGTGG-TAMRA		

^a FAM: 6- carboxifluoresceína; TAMRA: 6- carboxitetrametilrodamina

^b Posiciones en la secuencia del genoma completo de *C. burnetii* RSA493 (Número de acceso al GenBank AE016828) que codifica el gen de transposasa del elemento de inserción de ADN específico de *C. burnetii* IS1111a.

^c pb: pares de bases.

Tabla 3. Reactivos y volúmenes respectivos utilizados en PCR en tiempo real para detección de *C. burnetii*.

Reactivo	Volumen
Buffer de reacción + nucleótidos + enzima	10 µL
Primer 1	1 µL
Primer 2	1 µL
Sonda	1 µL
ADN	7 µL

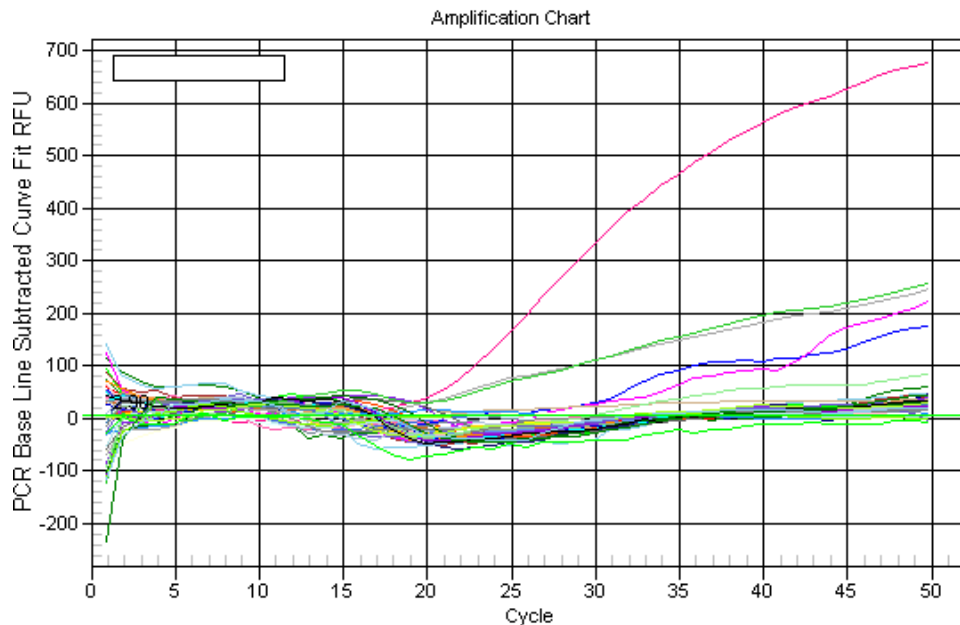


Figura 7. Gráfica resultante de una de las PCR en tiempo real hechas durante el proceso para *C. burnetii*.

Las muestras se consideraron positivas a partir de un umbral del valor Ct (ciclo de amplificación) inferior a 40 según protocolo anteriormente descrito (González-Barrio et al., 2015).

Análisis de hipótesis

Para comprobar las hipótesis del estudio planteadas se analizaron los datos obtenidos mediante pruebas estadísticas apropiadas a la naturaleza de dichos datos. Los análisis estadísticos se realizaron en dos fases:

A) En una primera fase se realizó una exploración de datos según Zuur et al. (2010) con la finalidad de explorar la naturaleza de los datos de las diferentes variables registradas y corroborar que todos los requisitos de las pruebas estadísticas empleadas son cumplidos. De esta forma se evita cometer errores estadísticos y ofrecer resultados erróneos que conduzcan a interpretaciones incorrectas.

En este primer paso se estudió la naturaleza de las variables respuesta utilizadas en cada uno de los modelos estadísticos a realizar en función de las hipótesis planteadas en el estudio. En esta fase se estudió la presencia de valores 'outlier' o atípicos en las covariables continuas o discretas, identificando dichos valores y procediendo a eliminarlos del estudio o a transformar la covariable en caso de querer mantenerlos. También se estudiaron las correlaciones entre covariables en el modelo mediante matrices de correlaciones de Pearson (para covariables continuas), tests de chi-cuadrado (para covariables categóricas) y mediante test ANOVA (covariables continuas *versus* categóricas) y se evitó incluir covariables altamente correlacionadas en los modelos estadísticos para evitar fenómenos de

multicolinealidad. Se analizó la homogeneidad de varianzas de covariables continuas en función de los diferentes niveles de las covariables categóricas, el balance de casos en cada nivel de las covariables categóricas, la necesidad de incluir interacciones en el modelo y se estudió la independencia de las covariables registradas. A partir de este primer paso se seleccionaron las covariables que podían ser incluidas en cada modelo estadístico (Tabla 4).

B) Modelos de regresión logística binaria

La variable respuesta que se utilizó para testar las 3 hipótesis planteadas en los objetivos tiene una naturaleza categórica con dos niveles (0: PCR negativo, 1: PCR positivo), es decir, es una variable binomial en la que se registra la presencia/ausencia de ADN de *C. burnetii* en muestras de cada topillo analizado al nivel de individuo. La naturaleza de esta variable condiciona los análisis estadísticos a realizar y en este caso el análisis más adecuado es utilizar modelos estadísticos de regresión logística binaria o modelos lineales generalizados utilizando una variable binomial. Este tipo de modelos estadísticos basados en estadística frecuentista resultan útiles para abordar cuestiones de riesgo de infección en términos de probabilidad, se utilizan cuando una variable de respuesta dicotómica puede estar influenciada por una o más variables independientes o predictores (covariables). Se hicieron tres modelos de regresión logística binaria basados en los objetivos planteados inicialmente, con el fin de analizar la veracidad de las hipótesis propuestas:

Modelo 1: Análisis del riesgo de infección por *C. burnetii* en función del hábitat y factores individuales.

Este primer modelo se construyó para analizar si el hábitat y algunos factores individuales de los topillos tienen un efecto sobre la probabilidad de infección por *C. burnetii*. La disponibilidad de alimento es uno de los principales factores que modulan de forma positiva los ciclos de esta especie (Krebs, 1994), y dada la asociación del topillo campesino con zonas agrícolas (Jacob y Tkadlec, 2010), es importante considerar el factor hábitat dentro de la epidemiología de los patógenos relacionados con esta especie. Después de la cosecha de especies herbáceas como la alfalfa o los cereales, suele quedar lo que se conoce como “rastrojo”, restos de tallos de las plantas que suele ser aprovechado por ganado, principalmente rumiantes y otras especies. Este factor podría, por un lado, aumentar la tasa de contacto entre topillos y rumiantes, principal reservorio de *C. burnetii*, favoreciendo la transmisión inter-específica. Por otro lado, especies herbáceas más proteicas como la alfalfa podrían albergar mayores densidades de topillos al ofrecer un recurso más apropiado para la especie (Jareño, 2014). De igual forma, el sistema de cultivo (regadío *versus* seco) influye en la funcionalidad y habitabilidad de las madrigueras de los topillos. Las parcelas que utilizan sistemas de regadío suelen inundar las madrigueras, por lo que cabría esperar que en estas hubiese una menor densidad de topillos que en las parcelas en régimen de seco. Las consecuencias de una

presencia menor de topillos por el efecto del regadío en las madrigueras podrían modular la transmisión de patógenos.

El comportamiento social de esta especie también puede influir en la epidemiología de patógenos. Los machos son individuos dominantes y territoriales, lo que da lugar a una actividad más dinámica respecto a las hembras, las cuales suelen agruparse en grupos matriarcales y tienen un área de campeo más restringida (Andreassen et al., 2013). Estas diferencias etológicas darían pie a pensar que el área de campeo de los animales podría solaparse con las de otros individuos de la misma u otras especies como se muestra en un ejemplo de topillo nórdico en la Figura 8, estas zonas de solapamiento beneficiarían la transmisión tanto directa como indirecta de microorganismos, sobre todo en aquellos de elevada resistencia ambiental, como es el caso de *C. burnetii*.

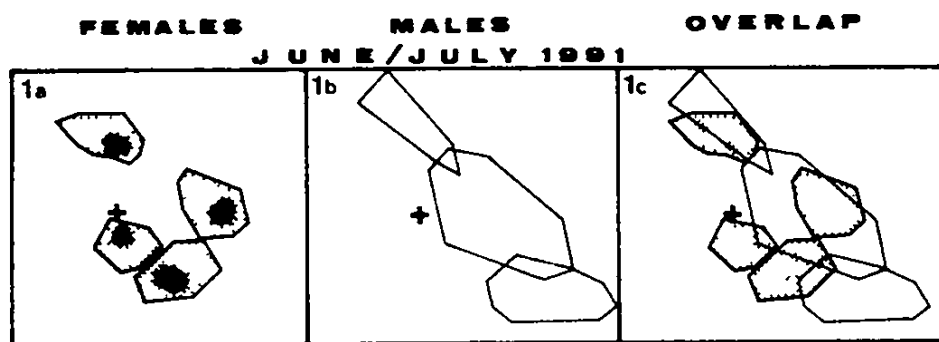


Figura 8. Áreas de campeo de hembras y machos de topillos de topillo nórdico (*Microtus oeconomus*) (Gliwicz, 1997).

Teniendo en cuenta los condicionantes anteriores, se consideró el hábitat como un posible factor de riesgo para la infección por *C. burnetii*, esperando por un lado un efecto positivo del mejor hábitat, la alfalfa, por favorecer mayores densidades o poblaciones temporalmente más estables de topillos, pero también podría esperarse que una buena alimentación podría producir un efecto contrario mejorando la condición inmunológica de los individuos y disminuyendo la susceptibilidad de infección frente a patógenos. La primera hipótesis que se propuso en este estudio es que la probabilidad de infección de los topillos por *C. burnetii* es dependiente del hábitat y factores intrínsecos del individuo.

Así, las covariables fijas utilizadas para este modelo (ver Tabla 4) fueron: 1) tipo de cultivo (Categórica; 1: alfalfa, 2: cereal); 2) sistema de cultivo (Categórica; 1: secano, 2: regadío); 3) sexo (Categórica; 1: macho, 2: hembra); 4) índice de condición inmunológica (Continua), calculado como los valores residuales de la regresión entre la longitud cabeza-cuerpo y el peso del bazo para cada individuo y utilizada como una aproximación a la condición inmunológica del individuo según estudios previos (Vicente, Pérez-Rodríguez, y Gortazar 2007); 5) provincia de origen (Categórica; 1: Valladolid, 2: Zamora, 3: Palencia). Los individuos

seleccionados para este modelo fueron todos los topillos capturados vivos en el año 2014 en los que se pudieron tomar datos biométricos de cada individuo a la par que se registró el tipo de cultivo de la zona de captura.

Modelo 2: Análisis de la hipótesis de depredación positiva sobre individuos infectados

Este segundo modelo se construyó con el objetivo de analizar la segunda hipótesis del estudio, según la cual la depredación por rapaces generalistas sobre topillos infectados por patógenos sería mayor que sobre topillos no infectados. La base de esta hipótesis es que los patógenos pueden tener efectos clínicos o subclínicos que interfieran en la capacidad de huida o de ocultamiento de los topillos infectados en comparación con aquellos no infectados y que, en última instancia, podría resultar en que potenciar la presencia de depredadores generalistas resultase en un control biológico de los patógenos que circulan en las poblaciones de topillo campesino. Para este modelo se seleccionaron los individuos capturados con trampas Sherman, los individuos hallados muertos y los individuos recogidos en las cajas nido que fueron cazados por los depredadores, todos ellos de 2014. Las covariables fijas empleadas para generar el modelo fueron: 1) procedencia del individuo (Categórica; 1: capturado vivo, 2: hallado muerto, 3: cazado por depredadores); 2) sexo (Categórica; 1: macho, 2: hembra); y 3) provincia de origen (Categórica; 1: Valladolid, 2: Zamora, 3: Palencia).

Modelo 3: Análisis de la hipótesis de cambios en la prevalencia de *C. burnetii* en la población de topillos en función de variaciones en la abundancia del hospedador

Este tercer modelo se generó con la finalidad de estudiar el efecto de cambios en la abundancia de topillo campesino asociado a variaciones en su ciclo poblacional sobre la prevalencia de patógenos, tomando como modelo *C. burnetii*. Las covariables fijas utilizadas para este modelo fueron: 1) año (Categórica; 1: 2012, 2: 2014), ya que la abundancia de topillos en las zonas de estudio fue baja en 2012 y elevada en 2014 (Jareño, 2014, Capítulo 5; Paz et al., 2013; Viñuela et al., 2015); 2) sexo (Categórica; 1: macho, 2: hembra); y 3) provincia de origen (Categórica; 2: Zamora, 3: Palencia). Debido a que en el año 2012 solamente se tomaron muestras de topillos en trampas Sherman, no se consideraron en el análisis los individuos de 2014 hallados muertos o cazados por depredadores, sólo los capturados con trampas. Dado que no se tienen disponibles muestras del año 2012 procedentes de la provincia de Valladolid, ésta no fue considerada en el estudio.

La selección del mejor modelo en cada una de las hipótesis analizadas se hizo utilizando un sistema de paso adelante (*forward stepwise*) basado en cambios en el criterio de información de Akaike (AIC) (Akaike, 1974). El proceso comienza por el modelo nulo, sin incluir ninguna de las covariables seleccionadas. A continuación, se introducen las covariables una a una en el modelo y se realizan todos los modelos posibles

con una sólo covariable. En base al AIC se selecciona el modelo que genera una disminución en el AIC con respecto al modelo nulo. Si se da este caso se continúa añadiendo covariables realizando modelos múltiples con 2, 3 o más covariables. El proceso se detiene bien cuando el valor de AIC de los modelos para de disminuir, bien cuando todas las covariables han sido introducidas en el modelo. El modelo seleccionado como modelo que mejor explica la variable respuesta es el modelo con menor AIC, cuya diferencia de AIC con el siguiente modelo con menor AIC es mayor o igual a 2 ($\Delta AIC \geq 2$) y que constituye el modelo más parsimonioso, es decir, aquel con menos variables de entre modelos con similar valor de AIC. Cada grupo de modelos se hizo con el mismo tamaño muestral para que los valores de AIC de los diferentes modelos fuesen comparables.

Tabla 4. Variables independientes utilizadas en los modelos de regresión logística binaria.

Código de la variable	Tipo de covariable	Descripción de la variable
Sex	Factor	Sexo (1: macho, 2: hembra)
Cin	Continua	Índice de condición inmunológica
Cult	Factor	Tipo de cultivo (1: alfalfa, 2: cereal).
Rs	Factor	Sistema de cultivo (1: secano, 2: regadío).
Procedencia	Factor	Procedencia del individuo (1: capturado vivo, 2: hallado muerto; 3: cazado)
Prov	Factor	Provincia (1: Valladolid, 2: Zamora, 3: Palencia).
Año	Factor	Año (1: 2012, 2: 2014).

La realización de todos los análisis estadísticos se hizo utilizando los paquetes "Matrix", "lattice", "stats" y "lme4" de R v3.4.0 (Zuur et al., 2010) en software libre RStudio v1.0.143 (© 2009-2016 RStudio Inc., Boston, MA, EEUUAA). *R Studio* es un *software* libre que utiliza R, un lenguaje de programación para análisis estadístico. Los gráficos presentados fueron construidos en Microsoft Excell (Microsoft Corp., CA, EEUUAA). Para el contraste de hipótesis se empleó un punto de corte del valor de p de 0,05.

La expresión gráfica del riesgo de infección por *C. burnetii* se expresó como la frecuencia de individuos PCR positivos con respecto al tamaño muestral, es decir, como la prevalencia de infección en tanto por cien (%). Cada valor de seroprevalencia calculado fue asociado a unos valores de precisión dependientes del tamaño muestral y la frecuencia de positivos calculando el intervalo de confianza al 95% (IC95%) para la proporción. Para esto se utilizó el test de Clopper-Pearson para intervalos de confianza exactos utilizando el paquete "stats" de R v3.4.0 en RStudio v1.0.143

Resultados

Efectos del uso de diferentes tipos de muestras biológicas para el estudio

En algunos de los cadáveres recogidos de cajas nido en el año 2014 no se pudo obtener el bazo. Como se refleja en la sección anterior, de estos animales (n=18) se analizaron muestras de grasa subcutánea en comparación con el resto de animales cazados por depredadores en los que se analizaron muestras de

bazo (n=86). El test de chi-cuadrado realizado señaló que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p=0,3006$) en la proporción de positivos en grasa (9/18, 47,4%) y bazo (29/86, 33,7%), razón por la cual se confirma la hipótesis nula y se concluye que utilizar grasa y bazo en este estudio no constituye un sesgo importante.

Prevalencia de *C. burnetii* en las poblaciones de estudio

En total, 521 individuos de las tres provincias fueron muestreados y posteriormente analizados mediante PCR en tiempo real para determinar la presencia de ADN de *C. burnetii* indicativa de infección por este agente patógeno (ver Anexo III). De los 521 topillos analizados 93 resultaron positivos, dando lugar a una prevalencia global del 17,9%, (IC95%: 14,7-21,4). El rango de prevalencia de infección por *C. burnetii* osciló entre el 5,6% (IC95%: 1,1-15,1) de la población de Zamora en el año 2012 al 15,6% (IC95%: 9,4-23,8) en la población palentina en 2014 (Tabla 5).

Tabla 5. Prevalencia con un intervalo de confianza del 95 % en las poblaciones de topillo campesino de las zonas de estudio en Palencia, Valladolid y Zamora en condiciones de baja abundancia (2012) y de alta abundancia (2014).

Provincia	Prevalencia (%) (positivos/total individuos) (IC 95%)		
	Año	2012 (baja abundancia)	2014 (alta abundancia)
Palencia		14,4 (17/118) (8,6-22,1)	15,6 (17/109) (9,4-23,8)
Valladolid	-		16,7 (6/36) (6,4-32,8)
Zamora		5,6 (3/55) (1,1-15,1)	7,9 (6/76) (3,0-16,4)

Resultados del análisis de hipótesis

Modelo 1: Análisis del riesgo de infección por *C. burnetii* en función del hábitat y factores individuales

El modelo seleccionado (Tabla 6) con el valor de AIC más bajo fue el modelo nulo, es decir, el modelo que no incluye ninguna de las covariables consideradas.

Modelo 2: Análisis de la hipótesis de depredación positiva sobre individuos infectados

En este caso, el modelo seleccionado fue el modelo con las covariables Procedencia del individuo, sexo y provincia por poseer el AIC más bajo (Figura 9). A pesar del ajuste, este modelo sólo explica un 10,3% de la varianza (devianza) total de la variable respuesta.

Los resultados del modelo (Tabla 6) demuestran que el riesgo de infección por *C. burnetii* en las hembras es menor que el de los machos y que esta diferencia es estadísticamente significativa. En este subconjunto de datos se observó una prevalencia de infección por *C. burnetii* del 26,7% (IC95%: 20,3-34) frente al 15,7% (IC95%: 10,7-21,9) en las hembras.

Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de infección en función de la Procedencia de los individuos. Los individuos cazados presentan un riesgo de infección 1,5 veces superior al de los individuos vivos y mayor que el de los individuos hallados muertos. La prevalencia de infección por *C. burnetii* observada fue del 13,1% (IC95%: 9-18,3) en animales capturados vivos, del 28,0% (IC95%: 12,1-49,4) en animales hallados muertos y del 36,5% (IC95%: 27,3-46,6) en animales cazados por las rapaces depredadoras.

Finalmente, este modelo señala que el riesgo de infección por *C. burnetii* difiere en relación a la provincia de estudio (Figura 9), con menor nivel de prevalencia en Zamora (12,6%, IC95%: 18,2-38,2) en comparación con Palencia (23,9%, IC95%: 7,1-20,3) y Valladolid (27,4%, IC95%: 17,4-31,4).

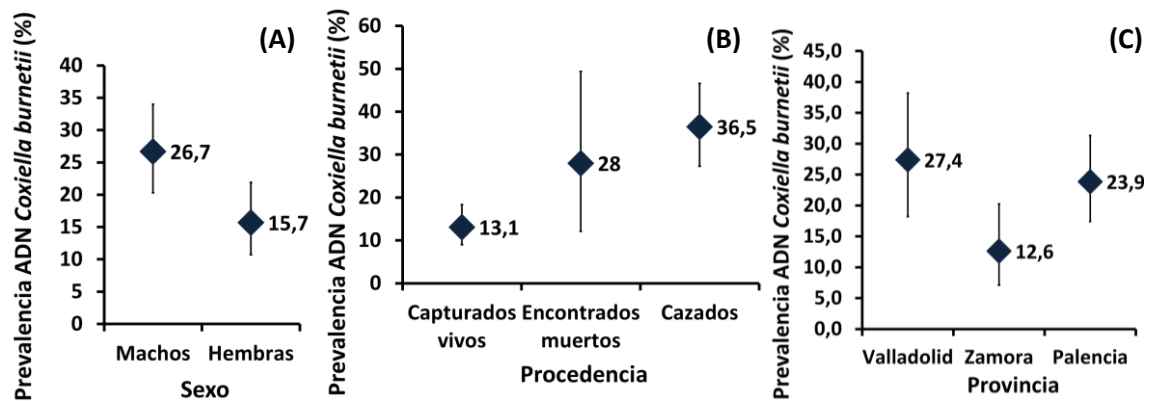


Figura 9. Prevalencia de infección por *C. burnetii* e intervalo de confianza al 95% asociado en el subconjunto de datos de la población de *Microtus arvalis* en 2014 (Modelo 2) en función de: (A) Sexo; (B) Procedencia del individuo; y (C) Provincia.

Modelo 3: Análisis de la hipótesis de cambios en la prevalencia de *C. burnetii* en la población de topillos en función de variaciones en la abundancia del hospedador.

Para el análisis de la tercera hipótesis del estudio se seleccionó como mejor modelo aquel que incluía la covariable provincia (Tabla 6; Figura 10). Este modelo tan sólo pudo explicar el 2,6% del total de la varianza (devianza) de la variable respuesta. En este estudio realizado únicamente sobre animales capturados con cajas trampa se observó un riesgo de infección mucho más elevado (del orden de 2,4 veces) en los topillos de las zonas de estudio en la provincia de Palencia (15,0%, IC95%: 2,7-11,9) frente al riesgo experimentado por los topillos de la provincia de Zamora (6,2%, IC95%: 10,6-20,3).

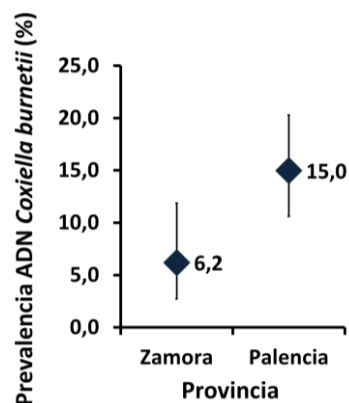


Figura 10. Prevalencia de infección por *C. burnetii* e intervalo de confianza al 95% asociado en el subconjunto de la población de *Microtus arvalis* analizado en el Modelo 3 y en relación a la provincia de origen.

Tabla 6. Resultados obtenidos de los modelos de regresión logística binaria.

	Variable	Categoría	B	Std. Err.	Z	P	AIC	ΔAIC	DE (%)
m1 ^a	Intercepto	-	-2,0281	0,2379	-8,527	<2e-16 ***	125,7	-	-
m2	Intercepto	-	-1,6393	0,3646	-4,496	6,91e-06 ***	335,9	27,6	10,3
	Sex	Macho	Ref	Ref	Ref	^a 0.01859 *			
		Hembra	-0,6573	0,2829	-2,332	0,0202 *			
	Procedencia	Capturado	Ref	Ref	Ref	^a 7,299e-06 ***			
		Muerto	0,7170	0,5054	1,419	0,1559			
		Cazado	1,5080	0,3212	4,695	2,67e-06 ***			
	Prov	Valladolid	Ref	Ref	Ref	^a 0.01574 *			
		Zamora	-0,6829	0,3985	-1,714	0,0866			
		Palencia	0,3739	0,3646	1,025	0,3051			
m3	Intercepto	-	-2,7163	0,3651	-7,441	9,99e-14 ***	255,7	4,7	2,6
	Prov	Zamora	Ref	Ref	Ref	0,009904**			
		Palencia	0,9800	0,4097	2,392	0,0168 *			

Código del valor significativo: (*) 0.05; (**) 0.01; (***) 0.001

^a m1: Modelo 1; m2: Modelo 2; m3: Modelo 3

Discusión

Este estudio proporciona información complementaria a otros estudios de cómo la dinámica poblacional de *M. arvalis* puede influir en la circulación de patógenos, tomando como ejemplo la bacteria *C. burnetii*, en función de diferentes factores de la ecología de este roedor, además de un avance significativo en el conocimiento en epidemiología de patógenos compartidos con especies silvestres y domésticas. El genotipado de algunas cepas de *C. burnetii* presentes en las poblaciones de topillo estudiadas demuestra que estas son las típicas del ganado ovino (González-barrio et al., 2016), con el cual el topillo campesino comparte hábitat. Además, considerando las particularidades epidemiológicas de *C. burnetii* como su alta

resistencia ambiental, este modelo puede servir para el estudio de otros patógenos compartidos por ganado, otros animales silvestres o personas con el topillo campesino.

Consideraciones metodológicas

Los resultados obtenidos son puramente correlacionales y descriptivos debido a la naturaleza del estudio. Si la finalidad del estudio es establecer relaciones de causa-efecto entre las covariables estudiadas y el riesgo de infección, deberían plantearse experimentos replicados en una situación controlada, haciendo inferencia en factores determinantes como posibles predictores del riesgo de infección de *C. burnetii*.

En segundo lugar, el tamaño muestral en los diferentes subgrupos fue balanceado, salvo en los animales encontrados muertos. Muchos de los topillos mueren dentro de las madrigueras, por lo que es imposible encontrarlos todos mediante la inspección del terreno. Este muestreo fue totalmente oportunista, aunque también homogéneo. Sería recomendable homogeneizar estos muestreos, pero las oportunidades que brinda el muestreo de la fauna silvestre, y más de este tipo, oportunistas, dificultan poder conseguir una cantidad de individuos más equitativa.

En tercer lugar, hay que considerar algunos aspectos epidemiológicos importantes en la descripción del desarrollo y evolución de patógenos en hospedadores, como son la distribución geográfica y el tiempo. En este punto, cabe señalar que el estudio podría haber presentado mayor solidez mediante una evaluación continuada en el tiempo, no sólo en los años 2012 y 2014. Esto no sólo da pie a proponer cambios en la metodología de posibles futuros trabajos, también es una recomendación para futuras investigaciones, y futuros planteamientos de vigilancia activa de enfermedades en fauna silvestre.

Sería recomendable un cambio en la metodología de detección de *C. burnetii*, ya que resulta más efectiva a partir de tejido adiposo al permitir una detección del agente hasta 4 meses post-infección, cuando ya no se detecta la bacteria en sangre, hígado, pulmones o bazo (Bechah et al., 2014).

Discusión de resultados

Los resultados mostraron que el hábitat y factores individuales, exceptuando el sexo, no son determinantes en el riesgo de infección por esta bacteria. El sexo, sin embargo, aunque sólo fue una covariable estadísticamente significativa en el segundo modelo, en todos los modelos se observó cómo disminuía la probabilidad de infección en hembras respecto a los machos. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de partida de que los machos, debido a su actividad y comportamiento más dinámico que las hembras (Andreassen et al., 2013), podrían tener mayor probabilidad de contacto con posibles focos de transmisión de forma tanto directa como indirecta, aumentando de este modo la probabilidad de contagio y pudiendo explicar una prevalencia más alta que en las hembras. Corroboraríamos así parte de la hipótesis planteada en el objetivo 1.

Por otro lado, los resultados observados en topillos capturados vivos, encontrados muertos y cazados en 2014, mostraron diferencias significativas. En los que habían sido cazados por aves rapaces se vio una prevalencia más alta de *C. burnetii* que los otros dos subgrupos, siendo más del doble que en el caso de los capturados vivos. Esto se encuentra en la misma línea que la segunda hipótesis; los depredadores podrían ser selectivos en la caza de topillos y podrían estar seleccionando individuos más enfermos, o con más signos clínicos debido a una o varias enfermedades concomitantes producidas por patógenos infecciosos, entre ellos patógenos zoonóticos como *C. burnetii*. Si esto fuera así, la depredación podría producir dos efectos importantes en el control de patógenos mediante el control de las plagas de topillos, uno, mediante la eliminación de individuos enfermos y otro efecto, como desencadenante de la fase de declive del ciclo poblacional (Andreassen et al., 2013). En caso de ser así, sería una herramienta muy útil, además de una buena alternativa al uso de rodenticidas que generan problemas medioambientales antes mencionados (Martínez-Padilla et al., 2017; Vidal et al., 2009).

La hipótesis de la existencia de una posible dependencia de la densidad de topillos sobre la prevalencia de *C. burnetii* en este caso no se pudo confirmar. Los resultados del análisis estadístico no mostraron diferencias significativas entre periodos con abundancia baja y alta en la zona de estudio. Esto podría significar dos cosas, o bien que el efecto de la denso-dependencia sea poco potente (quizás asociado a la capacidad de resistencia ambiental de *C. burnetii*), por tanto, habría que aumentar el tamaño muestral para poder valorar efectos estadísticamente significativos, y por otro lado, podría significar que este patógeno no es denso-dependiente para esta especie, a diferencia de otras especies como los rumiantes (González-Barrio et al., 2015; Piñero et al., 2014). Como se comenta en la sección de consideraciones metodológicas, un muestreo enfocado a una serie de años larga podría arrojar luz sobre la denso-dependencia en la transmisión de este patógeno asociada al topillo campesino como se ha hecho para otros patógenos (Luque-Larena et al., 2015).

En cuanto al lugar de donde procedían los animales, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las tres provincias, siendo los topillos provenientes de Zamora los que presentaban menor probabilidad de infección frente a los de las provincias de Valladolid y Palencia. Como se comenta anteriormente, las variaciones en la abundancia de topillos en Valladolid fueron menores que en Zamora y Palencia entre 2012 y 2014, por lo que es probable que en Valladolid algún factor extrínseco como el contacto con ganado ovino infectado por *C. burnetii*, entre otros factores, pueda determinar los niveles de prevalencia de infección observados. En relación a los cambios entre Palencia y Zamora parece que, a pesar de ser territorios cercanos y muy similares ambientalmente, las abundancias son mayores en Palencia, quizás explicando en parte la esperada denso-dependencia en la transmisión de *C. burnetii*.

Alternativamente, la exposición a otros factores que favorezcan la transmisión podría ser mayor en las zonas de estudio en Palencia que en Zamora.

Una de las consideraciones a tener en cuenta en este estudio está en relación a la presencia y posible variación en la abundancia de los depredadores. Se podría pensar que las especies de depredadores podrían disminuir al reducirse la población de topillos, tras la fase de declive, y por tanto el control biológico no ser permanente. Sin embargo, la ventaja de las especies depredadoras generalistas, como son el cernícalo vulgar y la lechuza común (SEO BirdLife, 2017), es que en los períodos inter-epizoóticos de los ciclos de los topillos, estas aves podrían alimentarse de otras presas ya que no necesitan una sola especie, a diferencia de depredadores especialistas, para sobrevivir. Sin embargo, tener en cuenta estos datos para estudios futuros mejorará la capacidad de modelizar el riesgo de transmisión y mantenimiento de *C. burnetii* en las poblaciones de topillo campesino de Castilla y León.

Para terminar, es importante mencionar la devianza explicada en los diferentes modelos. El segundo modelo fue el que explicaba mayor porcentaje de varianza total sobre la variable de respuesta (10,3%). Esto implica que los factores que se incluyeron no son suficientes para poder explicar el riesgo de infección por *C. burnetii*, o bien que no se estudiaron los factores más importantes en el riesgo de infección por *C. burnetii*. Para futuras investigaciones sería recomendable ampliar el abanico de variables independientes que puedan influir sobre el riesgo de infección, ya que es probable que haya variables, o la interacción de éstas, que expliquen un mayor porcentaje de la varianza y puedan dar lugar a una aproximación mayor en los factores que modulan el riesgo de infección.

Este trabajo supone el primer estudio sobre la dinámica epidemiológica de *C. burnetii* en las poblaciones de topillo campesino de Castilla y León, por lo que proporciona una base importante para progresar en el conocimiento de este patógeno zoonótico en el futuro.

Conclusiones

- 1) *Coxiella burnetii* es una bacteria que está presente en las poblaciones de topillo campesino (*Microtus arvalis*) situadas en la Comunidad Autónoma de Castilla y León en prevalencias de infección comparables a las observadas en rumiantes domésticos y especies silvestres.
- 2) Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de *C. burnetii* entre las poblaciones de topillo campesino procedentes de las tres zonas de estudio en Castilla y León, siendo Zamora la que presentaba la prevalencia más baja frente a las poblaciones de Palencia y Valladolid.
- 3) La prevalencia de *Coxiella burnetii* en ejemplares de topillo campesino depredados por aves rapaces como el cernícalo vulgar (*Falco tinnunculus*) y la lechuza común (*Tyto alba*) es mayor que la prevalencia media de la población, lo que podría relacionarse con una presión de depredación diferencial por parte

de estas aves hacia topillos infectados. Así, el control biológico basado en depredadores podría constituir una herramienta para el control de los patógenos presentes en las poblaciones de topillo campesino.

- 4) La prevalencia de *Coxiella burnetii* en machos es más alta que en hembras de topillo campesino, probablemente debido a diferencias comportamentales entre ambos sexos de esta especie.
- 5) En el marco de este estudio, no se hallaron diferencias en la prevalencia de *C. burnetii* asociadas a los cambios en la densidad de población de topillo campesino, probablemente debido a que sólo se estudiaron dos años diferentes. Así, demostrar el efecto del control biológico basado en depredadores sobre la prevalencia de patógenos deberá analizarse en el futuro en base a series temporales largas.

Valoración personal

Este trabajo lo he desarrollado y elaborado durante el curso 2016-2017 en el grupo de Sanidad y Biotecnología (SaBio) del Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos (IREC) de Ciudad Real (C.A. de Castilla la Mancha, España), en colaboración con investigadores del grupo de ecología y gestión de fauna silvestre de dicho instituto y del Departamento de Ecología de la Universidad Autónoma de Madrid, como tema principal de la asignatura de Trabajo de Fin de Grado de la Facultad de Veterinaria en la Universidad de Zaragoza. Lo he combinado con un período de estancias que me ha permitido acceder a un amplio rango de áreas de conocimiento ofrecidas por el IREC.

He adquirido una gran experiencia, tanto a nivel profesional y formativo, como personal. Principalmente me he formado en el estudio y manejo de fauna silvestre, aplicado tanto desde un punto de vista veterinario como multidisciplinar, colaborando con profesionales de distintas áreas de ciencias de la vida y de la salud. Concretamente, he adquirido conocimientos en investigación básica en epidemiología, ecología, estadística aplicada y técnicas de biología molecular aplicadas a fauna silvestre. Ha sido un excelente complemento a la carrera de veterinaria, he adquirido mayor perspectiva en epidemiología de enfermedades infecciosas. Creo que los veterinarios aquí jugamos un papel importante, y que esta profesión aporta una visión global de la salud.

Algunos de los proyectos en los que he participado y la función que he desempeñado se describen a continuación.

Proyecto TOPILLAZO (ref. CGL2011-30274/BOS). Colaboración con el trabajo de fin de grado, necropsias, toma de muestras y medidas biométricas, técnicas de biología molecular en (*Microtus arvalis*).

Valoración del riesgo de transmisión de Fiebre Hemorrágica de Crimea Congo en colaboración con la Dirección General de Salud Pública y Consumo. Responsable de la organización de muestreo de garrapatas

en fauna silvestre para la detección del virus causante de la Fiebre Hemorrágica de Crimea-Congo en la Comunidad Autónoma de Castilla la Mancha.

Proyecto de “Micobacterias inactivadas por calor como inmunógenos en rumiantes: vía de administración, respuesta del hospedador y diagnóstico” (ref. AGL2014-56305-C3-1-R). Participación en preparación y colocación de cebos con vacuna de micobacterias inactivadas, revisión de cámaras de fototrampeo.

Otras colaboraciones. Responsable de la organización de vigilancia activa en enfermedades de fauna silvestre. Participación en estima de abundancia y densidad de poblaciones de ungulados silvestres. Toma de muestras y diagnóstico anatomopatológico para vigilancia activa de tuberculosis en ungulados silvestres. Estudio de mortalidad en rayones utilizando técnicas de radio-seguimiento o *radio-tracking*. Colaboración en un proyecto de investigación de determinación de interacciones entre ungulados silvestres en el Parque Nacional de Doñana.

Bibliografía

-
- Akaike, H. (1974). A New Look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6), 716-723.
- Aldea-Mansilla, C., Nebreda, T., García de Cruz, S., Dodero, E., Escudero, R., Anda, P., & Campos, Á. (2008). Tularemia: una década en la provincia de Soria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1), 21-26.
- Andreassen, H. P., Glorvigen, P., Rémy, A., & Ims, R. A. (2013). New views on how population-intrinsic and community-extrinsic processes interact during the vole population cycles. *Oikos*, 122(4), 507-515.
- Bechah, Y., Verneau, J., Amira, A. Ben, Barry, A. O., Lépolard, C., Achard, V., Panicot-Dubois, L., Textoris, J., Capo, C., Ghigo, E. & Mege, J. L. (2014). Persistence of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in murine adipose tissue. *PLoS ONE*, 9(5).
- Bengis, R. G., Leighton, F. A., Fischer, J. R., Artois, M., Mörner, T., & Tate, C. M. (2004). The Role of Wildlife in Emerging and Re- Emerging Zoonoses. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23 (2)(September 2004), 497-511.
- Caetano, J. C., Ferreira, S., & Silva, G. J. Da. (2017). *The principales and practice of Q fever. The one health paradigm*.
- Davis, S. (2004). Predictive Thresholds for Plague in Kazakhstan. *Science*, 304(5671), 736-738.
- Elton, C. S. (1924). Periodic fluctuations in the numbers of animals: their causes and effects. *British Journal of Experimental Biology*, 2, 119-163.
- Elton, C. S. (1942). Voles, mice and lemmings. Problems in population dynamics. Oxford, UK: Clarendon.

- Gliwicz, J. (1997). Space use in the root vole: basic patterns and variability. *Ecography*, 20(4), 383-389.
- González-Barrio, D., Ávila, A. L. V., Boadella, M., Beltrán-Beck, B., Barasona, J. Á., Santos, J. P. V, Queirós, J. & Ruiz-Fons, F. (2015). Host and environmental factors modulate the exposure of free- ranging and farmed red deer (*Cervus elaphus*) to *Coxiella burnetii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6223-6231.
- González-barrio, D., García, J. T., Jado, I., Olea, P. P., Viñuela, J., & Ruiz-Fons, F. (2016). Have small mammals been neglected as *Coxiella burnetii* reservoirs? En *12th Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA), Berlin 2016* (pp. 1-2).
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., & Vicente, J. (2006). Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*, 52(2), 81-87.
- Gyuranecz, M., Rigó, K., Dán, Á., Földvári, G., Makrai, L., Dénes, B., Fodor, L., Majoros, G., Tirják, L. & Erdélyi, K. (2011). Investigation of the Ecology of *Francisella tularensis* During an Inter-Epizootic Period. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(8), 1031-1035.
- Hanski, I., Henttonen, H., Korpimäki, E., Oksanen, L., & Turchin, P. (2001). Small-rodent dynamics and predation. *Ecology*, 82(6), 1505-1520.
- Jacob, J., & Tkadlec, E. (2010). Rodent outbreaks in Europe: dynamics and damage. *Rodent outbreaks: ecology and impacts*, (January), 207.
- Jareño, D. (2014). *Las plagas de topillo campesino (Microtus arvalis) en Castilla y León: efectos del clima, los cambios en el uso del suelo, e impacto sobre el ecosistema global. Tesis doctoral.*
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.
- Keesing, F., Belden, L. K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C. D., Holt, R. D., ... Ostfeld, R. S. (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468(7324), 647-652.
- Krebs, C. J. (1994). POPULATION CYCLES REVISITED CHARLES. *Journal of Mammology*, Vol. 77, No. 1, pp 8-24, 77(1), 8-24.
- Lambin, X., Bretagnolle, V., & Yoccoz, N. G. (2006). Vole population cycles in northern and southern Europe: Is there a need for different explanations for single pattern? *Journal of Animal Ecology*, 75(2), 340-349.
- Luque-Larena, J. J., Mougeot, F., Roig, D. V., Lambin, X., Rodríguez-Pastor, R., Rodríguez-Valín, E., ... Escudero, R. (2015). Tularemia Outbreaks and Common Vole (*Microtus arvalis*) Irruptive Population Dynamics in Northwestern Spain, 1997–2014. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(9), 568-570.
- Luque-Larena, J. J., Mougeot, F., Viñuela, J., Jareño, D., Arroyo, L., Lambin, X., & Arroyo, B. (2013). Recent large-scale range expansion and outbreaks of the common vole (*Microtus Arvalis*) in NW Spain. *Basic*

and *Applied Ecology*, 14(5), 432-441.

- Martínez-Padilla, J., López-Idiáquez, D., López-Perea, J. J., Mateo, R., Paz, A., & Viñuela, J. (2017). A negative association between bromadiolone exposure and nestling body condition in common kestrels: management implications for vole outbreaks. *Pest Management Science*, 73(2), 364-370.
- Maurin, M., & Raoult, D. (1999). Q Fever. *Clin Microbiol Rev*, 12(4), 518-553.
- Meerburg, B. G., & Reusken, C. B. E. M. (2011). The role of wild rodents in spread and transmission of *Coxiella burnetii* needs further elucidation. *Wildlife Research*, 38(7), 617-625.
- Meerburg, B. G., Singleton, G. R., & Kijlstra, A. (2009). *Rodent-borne diseases and their risks for public health. Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 35).
- Mills, J. N., & Childs, J. E. (1998). Ecologic studies of rodent reservoirs: Their relevance for human health. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 529-537.
- Mougeot, F., Garcia, J. T., & Viñuela, J. (2011). Breeding biology, behaviour, diet and conservation of the red kite (*Milvus milvus*), with particular emphasis on Mediterranean populations. *Ecology and conservation of European dwelling forest raptors and owls*, 190–204.
- Naranjo, V., Gortazar, C., Vicente, J., & de la Fuente, J. (2008). Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*, 127(1-2), 1-9.
- OIE. (2017). OneHealth: OIE - World Organisation for Animal Health. Recuperado 8 de junio de 2017, a partir de <http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/>
- Ostfeld, R. S., & Holt, R. D. (2004). Are predators good for your health? Evaluating evidence for top-down regulation of zoonotic disease reservoirs. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(1), 13-20.
- Paz, A., Jareño, D., Arroyo, L., Viñuela, J., Arroyo, B., Mougeot, Luque-Larena, J.J., & Fargallo, J. A. (2013). Avian predators as a biological control system of common vole (*Microtus arvalis*) populations in north-western Spain: Experimental set-up and preliminary results. *Pest Management Science*, 69(3), 444-450.
- Piñero, A., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Barandika, J. F., Atxaerandio, R., & García-Pérez, A. L. (2014). Changes in the dynamics of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle: An approach to match field data with the epidemiological cycle of *C. burnetii* in endemic herds. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2718-2730.
- Rossow, H., Forbes, K. M., Tarkka, E., Kinnunen, P. M., Hemmilä, H., Huitu, O., ... Vapalahti, O. (2014). Experimental infection of voles with *Francisella tularensis* indicates their amplification role in tularemia outbreaks. *PLoS ONE*, 9(10).
- Ruiz-Fons, F. (2017). A Review of the Current Status of Relevant Zoonotic Pathogens in Wild Swine (*Sus scrofa*) Populations: Changes Modulating the Risk of Transmission to Humans. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(1), 68-88.
- Schmidt, S., Essbauer, S. S., Mayer-Scholl, A., Poppert, S., Schmidt-Chanasit, J., Klempa, B., Ulrich, R. G.

- (2014). Multiple infections of rodents with zoonotic pathogens in Austria. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 14(7), 467-75.
- SEO-BirdLife. (2017). SEO BirdLife. Recuperado 20 de julio de 2006, a partir de <https://www.seo.org/>
- Steen, H., Yoccoz, N. G., Anker, R., Steen, I., And Ims, N. G., Steen, H., & Ims, R. A. (1990). Predators and small rodent cycles: an analysis of a 79-year time series of small rodent population fluctuations. *Ims Source: Oikos OIKOS*, 59(59), 115-120.
- Stein, A., Saunders, N. A., Taylor, A. G., & Raoult, D. (1993). Phylogenic homogeneity of *Coxiella burnetii* strains as determined by 16S ribosomal RNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett*, 113(3), 339-344.
- Taylor, L. H., Latham, S. M., Woolhouse, M. E. J., Latham, S. M., & Bush, E. (2001). Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions: Biological Sciences.*, 356(1411), 983-989.
- Thompson, R. C. A. (2013). Parasite zoonoses and wildlife : One health , spillover and human activity. *INTERNATIONAL JOURNAL FOR PARASITOLOGY*.
- Viana, M., Mancy, R., Biek, R., Cleaveland, S., Cross, P. C., Lloyd-Smith, J. O., & Haydon, D. T. (2014). Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(5), 270-279.
- Vicente, J., Pérez-Rodríguez, L., & Gortazar, C. (2007). Sex, age, spleen size, and kidney fat of red deer relative to infection intensities of the lungworm *Elaphostrongylus cervi*. *Naturwissenschaften*, 94(7), 581-587.
- Vidal, D., Alzaga, V., Luque-Larena, J. J., Mateo, R., Arroyo, L., & Viñuela, J. (2009). Possible interaction between a rodenticide treatment and a pathogen in common vole (*Microtus arvalis*) during a population peak. *Science of the Total Environment*, 408(2), 267-271.
- Viñuela, J., Paz, A., Luque-Larena, J. J., Rodríguez-Pastor, R., Arroyo, B., Mougeot, F., ... Fargallo, J. A. (2015). Nest-box supplementation for eurasian kestrel and barn owl as a biological control tool for common vole (*Microtus arvalis*) outbreaks in croplands in NW Spain. En «10TH VERTEBRATE PEST MANAGEMENT CONFERENCE», Sevilla.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), 3-14.

Anexo I: Protocolo de necropsias de micromamíferos (versión reducida).

Preparación del material y animales para necropsia: Descongelar animales 24 horas antes temperatura de refrigeración (4°C). Relacionar orden de entrada de cada individuo con una referencia en el registro de necropsias de mamíferos (M 00000/año). Y preparar material para tejidos: 10 tubos de 3ml para congelar a 10 tubos de 3ml (para congelar a -20°C): CER/PUL/COR/BAZO/HIG/RIÑ/REPR/HECES/MUSC/GRASA; 2 bolsas zip de 5cm: CAB/DIGES; 2 Tubos de microcentrífuga: ECTOP/SANGRE; 1 Formolín de 60 mL. Identificar cada tubo, bolsa, tubo de microcentrífuga o bote para formolín con la etiqueta correspondiente.

Material de seguridad personal y disección: Doble guante, mascarilla, manguitos y pantalla de protección facial. Pinzas finas x2, bisturí, tijeras finas. Bandeja de porexpan, agujas, tabla de corte, 3 botes con agua (sucio, +lejía y limpio). Lamparita y papel secante. Cinta métrica, calibre (pie de rey), balanza de precisión 3100g Sens. 0.01g (Advenrurer® OHASUS, Greifensee, CH), placas Petri para pesar y pipeta pasteur. La gradilla (para cada animal) con los 10 tubos, las 2 bolsitas, 2 tubos de microcentrífuga y 1 bote de formol al 10%.

Metodología: 1- Rellenar ficha de necropsias con datos de referencia de campo de cada topillo (durante el proceso se anotarán en esta ficha todas las medidas que se tomen además de observaciones y muestras tomadas). Recoger ectoparásitos en un tubo de microcentrífuga (ECTOP) con etanol al 70%, tomar medidas biométricas y pesar animal en balanza de precisión. Fijar animal en hocico, y extremidades mediante agujas en la bandeja de porexpan.

2- Realizar incisión con bisturí en la piel del animal, y realizar una disección de la piel desde el hocico hasta el ano. MUSC y GRASA: tomar muestras de músculo y grasa en los tubos correspondientes. Buscar posible microchip en tejido subcutáneo a nivel de las apófisis espinosas de las vértebras cervicales y torácicas. CER: Coger linfonodos y tonsilas a ambos lados de la tráquea.

3-Cavidad torácica: Sujetar xifoides (esternón) con las pinzas, abrir una ventana con el bisturí rompiendo las costillas. Tomar muestras de sangre o exudado sanguinolento en cavidad torácica con pipeta pasteur de 1.5 mL. Tomar muestras de pulmón y corazón para formol y para congelar una vez inspeccionados (PUL y COR). Tomar muestra de diafragma para MUSC.

4-Cavidad abdominal: Pesar bazo y riñones. Coger muestra para congelar y para formol de bazo (BAZO), hígado (HIG), riñón (RIÑ). Introducir las glándulas adrenales en el bote de formol. Tomar muestra de heces en recto y último tramo del colon (HECES). Introducir el resto del aparato digestivo abdominal en bolsa DIGEST.

5-Aparato reproductor (REPR). Hembras: Ovarios, se guardan el formol. Contar y anotar cicatrices uterinas, guardar útero en tubo para congelar, junto con fetos, si hay, y vejiga (REPR). En el caso de que haya fetos se pesan y se miden. Machos: Pesar y medir testículos, guardar en tubo para congelar (REPR).

6-Cortar comisuras labiales, dislocar mandíbula y medir y anotar incisivos, primer molar y serie molar de mandíbula superior. Introducir cabeza con encéfalo en bolsa zip (CAB).

Registro de tejidos y archivo: Una vez completada la ficha de necropsias con todas las observaciones y anotaciones necesarias (referencia del animal, referencia de campo, medidas, muestras tomadas y observaciones). Almacenar todas las muestras conjuntamente (en la tuboteca) a temperatura de congelación (-20oC). Completar ficha de registro de la tuboteca con las muestras almacenadas y su correspondiente referencia.

Laboratorio de Patología: Guardar ectoparásitos en zona de ectoparásitos del laboratorio de patología. Centrifugar cada una de las sangres en la microcentrífuga (VWR™ Galaxy D Digital Microcentrifuges, Radnor, PA, EEUU) a 10.000 rpm durante 10 minutos. Extraer el suero resultante de cada muestra y congelarlo en la seroteca, registrar conjuntamente la referencia de necropsia y la referencia del suero en la hoja de registro de la seroteca.

EXAMEN MACROSCÓPICO + MUESTRAS PARA APMBIEM			
ELEMENTO A INSPECCIONAR	LESIONES MACROSCÓPICAS DETECTADAS	Formal	Completar Cop. 1 Cop. 2
Cabeza			
LN Cervicales			
Tonsilas			
Encéfalo			
Otros			
Cav. Torácica			
Linfonodos			
Pulmones			
Corazón			
Otros			
Cav. Abdominal			
Linfonodos			
Bazo			
Hígado			
Riñones			
Adrenales			
Intestino			
Testículos/útero			
Ovarios			
Glandula mamaria			
Otros			
ANALÍTICAS LABORATORIALES			
CAMPO	TIPO DE PRUEBA	RESULTADOS (O REFS.)	

Anexo III: Tabla de tamaños muestrales y covariables empleados en los distintos modelos de regresión logística binaria.

Tamaños muestrales empleados en cada covariable dentro de cada modelo de regresión logística binaria, junto con las diferentes prevalencias en cada subgrupo con un intervalo de confianza del 95%.

Modelo	Tamaño muestral	Variable	Categoría	Positivos/Total	Prevalencia (%)	IC 95%
m1	n=172	Tipo de cultivo	Alfalfa	9/71	12,68	5,96-22,70
			Cereal	11/101	10,89	5,56-18,65
		Sistema de cultivo	Secano	11/102	10,78	5,51-18,48
			Regadío	9/70	12,86	6,05-23,01
		Sexo	Machos	13/89	14,61	8,01-23,68
			Hembras	6/79	7,59	2,84-15,80
m2	n=350	Estado	Capturado vivo	29/221	13,12	8,97-18,29
			Encontrado muerto	7/25	28,00	12,07-49,39
			Cazado	38/104	36,54	27,31-46,55
		Provincia	Valladolid	23/84	27,38	18,21 -38,20
			Zamora	14/111	12,61	7,07-20,26
			Palencia	37/155	23,87	17,4-31,37
		Sexo	Machos	46/172	26,74	20,29-34,02
			Hembras	28/178	15,73	10,71-21,93
m3	n=356	Provincia	Zamora	8/129	6,20	2,72-11,85
			Palencia	34/227	14,98	10,60-20,30
		Sexo	Machos	26/179	14,53	9,71-20,55
			Hembras	16/177	9,04	5,26-14,26
		Año	2012	19/171	11,11	6,82-16,81
			2014	23/185	12,43	8,05-18,07