



PCR Detection and Molecular Characterization of *Coxiella burnetii* from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks Collected from Dogs

Ali Bilgin Yılmaz^{1,a,*}, Adnan Ayan^{2,b}, Ezgi Sababoğlu^{3,c}, Yaşar Göz^{1,d}, Burçak Aslan Çelik^{4,e}, Özgür Çelik^{4,f}, Özge Oktay Ayan^{5,g}

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Van, Türkiye

²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, Türkiye

³Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Burdur, Türkiye

⁴Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, Türkiye

⁵Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Van, Türkiye

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Research Article</p> <p>Received : 28.11.2023 Accepted : 25.04.2024</p> <p>Keywords: Transposase gene Coxiella burnetii Rhipicephalus sanguineus Van Türkiye</p>	<p><i>Coxiella burnetii</i>, the obligate intracellular bacterium, is the causative agent of Q fever, a zoonotic disease of vertebrates including humans. Common ways of infection are breathing in contaminated barn dust and contact with waste from infected animals. The material of this study consists of 200 ticks which were collected from 70 stray dogs in Van province in east of Turkey between June to September of 2019. The collected ticks were transferred to the parasitology laboratory by taking them into tubes containing 70% alcohol and on which labels were affixed. Ticks were placed in tubes and crushed by freezing with liquid nitrogen. DNA was isolated according to the protocol of the kit manufacturer. To detect the DNA of <i>Coxiella burnetii</i>, a Trans 1, Trans 2 primer pair specific for the IS1111 repetitive transposase gene region was used. Bidirectional sequence analysis of the purified amplicons was performed with the DNA Sequencer. As a result of PCR targeting the IS1111 transposase gene, a positive result for <i>Coxiella burnetii</i> was obtained in 2 (1%) of 200 ticks. Potential risk factors and the importance of ticks in the epidemiology of Q fever in free-roaming dogs in Van province were emphasized by identifying the parasitic tick species and the prevalence of <i>C. burnetii</i> positive ticks in dogs.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 12(7): 1174-1177, 2024

Köpeklerden Toplanan *Rhipicephalus sanguineus* Türü Kenelerden *Coxiella brunetii*'nin PCR ile Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 28.11.2023 Kabul : 25.04.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Transpozaz geni Coxiella Burnetii Rhipicephalus sanguineus Van Türkiye</p>	<p>Zorunlu hücre içi bakteri olan <i>Coxiella burnetii</i>, insanlar da dahil olmak üzere omurgalıların zoonotik bir hastalığı olan Q ateşinin etkenidir. Yaygın enfeksiyon yolları kontamine ahır tozunu solumak ve enfekte hayvanların atıklarıyla temastır. Bu çalışmanın materyalini Haziran-Eylül 2019 tarihleri arasında Türkiye'nin doğusundaki Van ilinde bulunan 70 sokak köpeğinden toplanan 200 adet kene oluşturmuştur. Toplanan keneler %70'lik alkol içeren tüplere alınarak parazitoloji laboratuvarına nakledilmiştir. hangi etiketlerin yapıştırıldığı. Keneler tüplere yerleştirildi ve sıvı nitrojen ile dondurularak ezildi. DNA, kit üreticisinin protokolüne göre izole edildi. <i>Coxiella burnetii</i>'nin DNA'sını tespit etmek için IS1111 tekrarlayan transpozaz gen bölgesine özel bir Trans 1, Trans 2 primer çifti kullanıldı. Safaştırılmış ampliconların çift yönlü dizi analizi, DNA dizileyici ile gerçekleştirildi. IS1111 transpozaz genini hedef alan PCR sonucunda 200 kenenin 2'sinde (%1) <i>Coxiella burnetii</i> pozitif sonuç elde edildi. Van ilinde serbest dolaşan köpeklerde Q ateşi epidemiyolojisinde potansiyel risk faktörleri ve kenelerin önemi, parazit kene türleri ve köpeklerde <i>C. burnetii</i> pozitif kenelerin prevalansı belirlenerek vurgulanmıştır.</p>

^a alibilginilyilmaz@yyu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0003-0749-2418>

^b adnanayan@yyu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0002-6564-3416>

^c ezgisababoglu@mehmetakif.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0003-3566-5443>

^d yasargoz@yyu.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0002-1040-9964>

^e eburcakaslan@siirt.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0002-0130-970X>

^f oyc@siirt.edu.tr

^{id} <https://orcid.org/0000-0001-6365-2688>

^g ozgeokty09@gmail.com

^{id} <https://orcid.org/0000-0003-2577-3774>



Giriş

Q humması (query (Q) fever), kahverengi köpek kenesi (brown dog tick), *Rhipicephalus sanguineus* da dahil olmak üzere Dünya çapında çok sayıda kene türünde tespit edilen ve küresel bir dağılıma sahip hücre içi bir bakteri olan *Coxiella burnetii*'nin neden olduğu zoonoz bir hastalıktır (Duron ve ark., 2015). Q ateşinin Yeni Zelanda dışında Dünya çapında endemik olarak seyreden bir hastalık olduğu bildirilmektedir (OIE, 2018).

İnsanlarda Q ateşi vakaları, çoğunlukla *C. burnetii* ile kontamine olmuş havanın solunması, insanlar ve evcil ruminantlar arasındaki yakın etkileşimlerle ilişkilendirilmiştir (Duron ve ark., 2015; OIE, 2018). Ayrıca çalışmalar (Buhariwalla ve ark.,1996; Komiyu ve ark., 2003), Q ateşinin epidemiyolojisinde evcil hayvanların rolünün giderek arttığını göstermiştir. Ancak *C. burnetii*'nin insanlara bulaşmasında kenelerin oynayabileceği rol büyük ölçüde araştırılmamıştır (Duron ve ark., 2015) Keneler (Acari: Ixodidae) haematophagous ektoparazitlerdir ve *C. burnetii* enfeksiyonunun doğal döngüsünü sürdürürebilmek için gerekli bir vektör olarak kabul edilir. Bugüne kadar 40'tan fazla kene türü *C. burnetii* ve diğer *Coxiella* türleri ile ilişkilendirilmiştir (Duron ve ark., 2015).

R. sanguineus kenesinin konakçısı evcil köpek (*Canis lupus familiaris*) olsa da, oportunistik olarak birçok memeli konakçıdan da beslenebilmektedir. Bu özellik muhtemelen *R. sanguineus*'un zoonotik bulaşmadaki rolünü arttırmaktadır. *R. sanguineus*, sırasıyla Avrupa ve ABD'de Akdeniz Benekli Ateşi ve Kayalık Dağ Benekli Ateşi (Mediterranean Spotted Fever and Rocky Mountain Spotted Fever) epidemiyolojisinde rol oynamaktadır ve anaplazmoz, babesiosis ve ehrlichiosis'in çeşitli kanidlere bulaşmasından sorumludur (Dantas-Torres, 2008). Ek olarak, *R. sanguineus*'un *Coxiella* da dahil olmak üzere çeşitli endosimiyonlara (endosymbionts) konakçılık (host) yaptığı bilinmektedir (Ahantarig ve ark., 2013; Duron ve ark., 2015; Watanabe ve ark., 2015)

Türkiye'de yürütülen bir çalışmada (Altay Çapın ve ark., 2013) *C. burnetii* bazı kene türlerinde tespit edilmiştir, ancak *R. sanguineus*'ta *C. burnetii* ve diğer *Coxiella* türlerinin varlığının tanımlandığına dair bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, sokak köpeklerinden toplanan kenelerde *C. burnetii* varlığını ve yaygınlığını araştırmak ve Van ilinde köpeklerde parazitlik yapan kene türlerinin dağılımını incelemektir.

Materyal ve Metod

Kenelerin Toplanması

Bu çalışma materyal olarak kullanılan keneler Haziran–Eylül 2019 tarihleri arasında Türkiye'nin doğusunda bulunan Van ilindeki 70 sokak köpeğinden 200 adet kene toplandı. Her köpekten toplanan keneler ayrı ayrı içinde %70 alkol bulunan ve üzerine etiket yapıştırılmış tüplere alınarak parazitoloji laboratuvarına transfer edildi. Keneler steromikroskop ile ilgili kaynaklar (Walker ve ark., 2003; Estrada-Peña ve ark.,2017) kullanılarak teşhis edildi.

DNA Ekstaraksiyonu

Köpeklerden toplanan kenelerden tek tek DNA izolasyonu yapıldı. Her bir kene %70 etil alkol ile

yıkandıktan sonra distile su ile yıkandıktan sonra steril kağıt üzerinde kurutuldu. Keneler ayrı ayrı tüplere alındı ve sıvı azot ile dondurularak ezildi. DNA'lar Invitrogen PureLink™ Genomik DNA Mini Kiti (ABD, K182002) üreticinin protokolüne göre izole edildi, DNA içeriği NanoDrop 2000c ile ölçüldü, ardından PCR analizine kadar -20°C'de saklandı.

IS1111a Transposase Geninin Ampifikasyonu

Kenelerde *C. burnetii* DNA'sının saptanması için IS1111 tekrarlayan transposase gen bölgesine spesifik olan Trans 1 (5' TATGTATCCACCGTAGCCAGTC 3') ve Trans 2 (5'CCCAACAACACCTCCTTATTC 3') (Hoover ve ark.,1992) içeren primer çifti kullanıldı. Son reaksiyon karışımı için, her bir primerden 6 pmol, 200uM dNTP (her bir deoksiniüksit trifosfattan 20 mM), 1,5 mM MgCl₂, 0,1U Taq DNA polimeraz ve nükleaz içermeyen su kullanılarak mastermix hazırlandı. Hazırlanan mastermixe her örnek için 3 µl gDNA eklenerek toplam reaksiyon hacmi moleküler kullanıma uygun su ile 25 µl ye tamamlandı ve Thermal cycler'e (Bio Rad T 100) yerleştirildi. PCR amplifikasyonu için, 95°C'de 5 dakika süreyle başlangıç denatürasyonunu takiben 40 döngü olmak üzere 95°C'de 30 saniye denaturasyon, 60° C'de 30 saniye annealing ve 72°C'de 1 dakika süreyle extansiyon ve 72°C'de 7 dakika final extansiyon protokolü uygulandı. PCR sonucunda elde edilen ürünlerden 5µl, 0,5µg/ml ethidyum bromid içeren %1'lik agaroz jelde 80 Volt'da 60 dakika yatay elektroforezde yürütüldü. PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ampliconların büyüklüğünü tespit edebilmek için 100bp DNA Ladder (Fermentas) kullanıldı. Elde edilen ampliconlar UV transillimünatör kullanılarak görüntüldü ve fotoğrafları çekildi.

Sekans ve Filogenetik Analiz

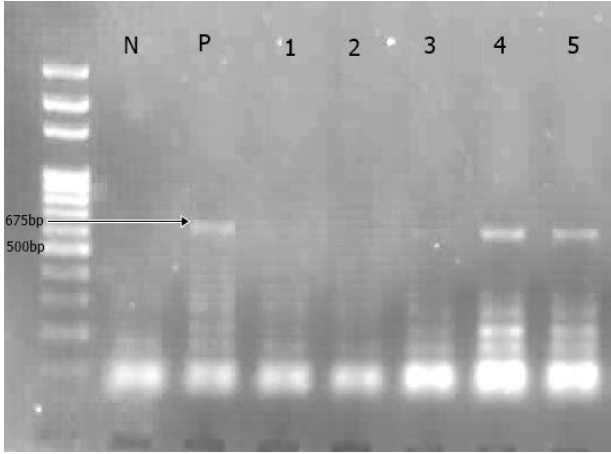
PCR ürünlerinden 30 µl PCR tüplerine yerleştirildi ve her numune için 3 µl primer (10 pmol) kullanıldı, saflaştırılan ampliconlar, Applied Biosystems 377 DNA Sıralayıcı cihazı ile çift yönlü dizi analizi yapıldı. Tüm izolatlar için IS1111 tekrarlayan transposase gen sekansları MW584232.1, MW584233.1 erişim numaraları ile GenBank'a kayıt edildi. GenBank'tan alınan MN094854.1, DQ379976.1, MK416227.1, MK028341.1, EF413062.1 kayıt numaralı diziler Clustal W algoritması ile MEGA 7 programında sıralandı. Filogenetik ağaç, Negihbor Joining modeli ve Bootstrap testi (100 tekrar) ile oluşturuldu ve elde edilen *C. brunetii* izolatlarının dizileri arasındaki evrimsel yakınlık, MEGA 7 programı ve Negihbor - Joining modeli kullanılarak belirlendi (Şekil 2).

Sonuç

Van ilindeki 70 sokak köpeğinden toplanan 200 adet kenenin *Rhipicephalus sanguineus* türü kene olduğu teşhis edildi. Kenelerin 114 tanesinin dişi 86 tanesinin erkek olduğu görüldü. IS1111 transposaz genini hedefleyen PCR sonucu 200 kenenin 2'sinde (%1) *C. burnetii* açısından pozitif sonuç elde edildi (Figure 1).

C. burnetii'in amplifiye edilmiş IS1111 transposaz gen bölgesinin sekanslarının MN094854.1, MK416227.1, MH394636.1, DQ379976.1, MK028341.1, KT345175.1,

KT345176.1, KT345179.1, KT345183.1, EF413062.1 ile karşılaştırılarak elde edilen filogenetik ağaç Şekil 2'de gösterildi. Çalışmada *Rhipicephalus sanguineus* türü kenelerden izole edilen *C.brunetii* ile *Hyalomma excavatum*, *Argas persicus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ornithodoros maritimus*, *Ornithodoros amblus*, *Haemaphysalis punctata* türü kenelerden izole edilen *C. brunetii* sekansları ile arasındaki evrimsel yakınlık filogenetik ağaç ile gösterildi. Dış grup olarak *Coxiella cheraxi* kullanıldı (EF413062.1).

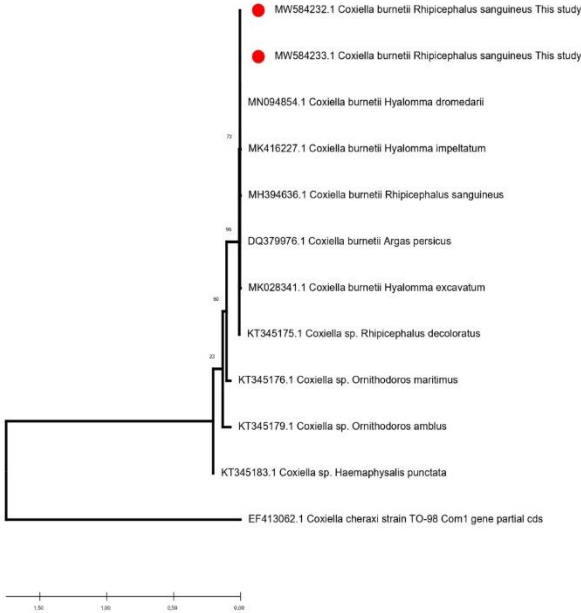


Şekil 1. *C. brunetii* PCR sonuçları

(M: Marker, N: Negatif kontrol, P: Pozitif kontrol, 1,2,3 negatif kene örneği, 4,5 pozitif kene örneği)

Figure 1. *C. brunetii* PCR results

(M: Marker, N: Negative control, P: Positive control, 1,2,3 negative tick samples, 4,5 positive tick samples)



Şekil 2. Mevcut çalışmada elde edilen izolatların GenBank'tan elde edilen dizilerle filogenetik ilişkisi. Ağaç, genetik mesafesi 0.50 olan Neighbor - Joining analizi (NJ) ile yapılmıştır.

Figure 2. Phylogenetic relationship of the isolates obtained in the present study with sequences obtained from GenBank. The tree was constructed by Neighbor - Joining analysis (NJ) with a genetic distance of 0.50.

Tartışma

Zorunlu hücre içi bakteri olan *Coxiella burnetii*, insanlar dahil omurgalıların zoonotik bir hastalığı olan Q hummasının nedensel ajanıdır (Madariaga ve ark. 2003; Raoult, Marrie ve Mege 2005; van Schaik ve ark. 2013; Vanderburg ve ark. 2014). Yaygın enfeksiyon yolları, kontamine ahır tozunun solunması ve enfekte hayvanların atıkları ile temastır.

Andoh ve ark., (2013) kentsel ortamlarda evcil köpeklerden toplanan kenelerde *C. burnetii* tespit etmediklerini rapor etmiştir. Benzer şekilde Avustralya'da köpeklerden toplanan *Rhipicephalus sanguineus* kenelerinde *C. burnetii* varlığının araştırıldığı bir çalışmada da kenelerde *C. burnetii*'nin tespit edilmediği bildirilmiştir (Oskam ve ark., 2017). Diğer taraftan Machado-Ferreira ve ark., (2016) tarafından Brezilya, Kolombiya, Kenya ve Çin de dahil olmak üzere dünya çapında örneklenmiş 15 farklı türden 293 kene örneğinde 16S ribozomal DNA (rDNA) gen analizleri ile *Coxiella* enfeksiyonu taraması yapılmış ve *Rhipicephalus sanguineus*'un yaklaşık%61'i ve *Rhipicephalus microplus* DNA örneklerinin %37'si *Coxiella* yönünden pozitif bulunduğu rapor edilmiştir.

İran'ın güneydoğusunda Kerman'daki köpeklerden toplanan kenelerde *C. burnetii* varlığının araştırıldığı bir çalışmada köpeklerden toplanan toplam 375 kene örneğinin tümünün *Rhipicephalus sanguineus* olarak tanımlandığı, 8 kene havuzu örneğinden birinde (%12,5) *Coxiella burnetii* saptandığı rapor edilmiştir (Khalili ve ark., 2018). Belgrad'ta 51 sokak köpeğinden 316 kene toplanmış ve türlerinin *Rhipicephalus sanguineus* (%72,15), *Ixodes ricinus* (%27,53) ve *Dermacentor reticulatus* (%0,32) olduğu tespit edilmiş, *C. burnetii* DNA'sının ise incelenen kene türlerinden sadece *R. sanguineus*'ta tespit edildiği ve prevalansının %10,53 (24/228) olduğu bildirilmiştir (Bogunović ve ark., 2018). Malezya'dan 23 köpekten toplanan toplam 44 *Rhipicephalus sanguineus* kenesi *Rickettsia*, *Anaplasmataceae* ve *Coxiella burnetii* açısından tarandığı bir çalışmada kenelerin %59'unda (26/44) *Coxiella burnetii* saptandığı, ancak hiçbirinde *Rickettsia* ve *Anaplasmataceae* saptanmadı bildirilmiştir (Watanabe ve ark., 2015). Saha çalışmalarında gözlenen *C. burnetii* pozitif kenelerin yüzdesinin tipik olarak düşük olduğu (<%5), ancak %5'ten hatta %10'dan fazla prevalans seviyeleri de rapor edildiği açıklanmıştır (Duron ve ark., 2015). Türkiye'nin Çorum ilinde yerel hastanelere kene ısırtığı şikayeti ile başvuran hastalardan toplanan kenelerde en yaygın *Rickettsia spp.* *R. aeschlimannii* (%19,5), *R. slovacica* (%4,5), *R. raoultii* (%2,2), *R. hoogstraalii* (%1,9), *R. sibirica subsp mongolitimon* (%1,2), *R. monasensis* (%0,31) ve *Rickettsia spp* (%1,2)'nin tespit edildiği bildirilmiştir. Ek olarak, aşağıdaki patojenler tanımlanmıştır: *Borrelia afzelii* (%0,31), *Anaplazma spp* (%0,31), *Ehrlichia spp* (%0,93), *Babesia microti* (%0,93), *Babesia ovis* (%0,31), *Babesia occultans* (%3,4), *Theileria spp.* (%1,6), *Hepatozoon felis* (%0,31), *Hepatozoon canis* (%0,31) ve *Hemolivia mauritanica* (%2,1). Ancak tüm numunelerin *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella* türleri, *Toxoplasma gondii* ve *Leishmania* türleri yönünden negatif bulunduğu rapor edilmiştir (Karasartova ve ark., 2018).

Sonuç olarak köpeklerde parazitlik yapan kene türlerini ve *C burnetii* pozitif kenelerin yaygınlığını belirleyerek, Van'daki sokak köpeklerinde Q ateşinin epidemiyolojisindeki potansiyel risk faktörlerini ve kenelerin önemi bu çalışma ile vurgulanmıştır. Enfekte köpekler üzerinde bulunan kenelerin *C. burnetii* tarafından enfekte olabileceğini ve bu durumun halk sağlığı açısından zoonotik önemini göstermektedir. Ayrıca kenelerde *C. burnetii*'nin varlığı veya yokluğunun Van ilinde *C. burnetii*'nin surveillansı ile keneler aracılığı ile bu hastalığın bulaşma potansiyeline ilişkin bilgiler sağlayabilir.

Kaynaklar

- Ahantariğ, A., Trinchartvanit, W., Baimai, V., Grubhoffer, L., 2013. Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol.* (Praha). 58, 419–428. doi:10.1007/s12223-013-0222-1
- Altay Çapın, G., Emre, Z., Canpolat, S., Vatanserver, Y., Düzgün, A., 2013. Detection of *Coxiella burnetii* from ticks by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 60, 263–268. doi:10.1501/vetfak_0000002590
- Andoh, M., Andoh, R., Teramoto, K., Komiya, T., Kaneshima, T., Takano, A., Hayashidani, H., Ando, S., 2013. Survey of coxiella burnetii in ticks collected from dogs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 1115–1117. doi:10.1292/jvms.12-0570
- Bogunović, D., Stević, N., Sidi-Boumedine, K., Mišić, D., Tomanović, S., Kulišić, Z., Magaš, V., Radojičić, S., 2018. Molecular evidence of q fever agent coxiella burnetii in ixodid ticks collected from stray dogs in belgrade (Serbia). *Acta Vet. Brno.* 68, 257–268. doi:10.2478/acve-2018-0023
- Buhariwalla F, Cann B, Marrie TJ (1996). A dog-related outbreak of Q fever. *Clin Infect Dis* 23:753–5.
- Dantas-Torres, F., 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* 152, 173–185. doi:10.1016/j.vetpar.2007.12.030
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., Jourdain, E., 2015. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends Parasitol.* 31, 536–552. doi:10.1016/j.pt.2015.06.014
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., Petney, T.N. (2017). Ticks of Europe and North Africa: A guide to species identification. Springer, Cham, Switzerland, 404 pp
- Hoover T., Vodkin M.H., William J.C. (1992). A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J. Bacteriol.* 174:5540-5548.
- Karasartova, D., Gureser, A.S., Gokce, T., Celebi, B., Yapar, D., Keskin, A., Celik, S., Ece, Y., Erenler, A.K., Usluca, S., Mumcuoglu, K.Y., Taylan-Ozkan, A., 2018. Bacterial and protozoal pathogens found in ticks collected from humans in Corum province of Turkey. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, 1–19. doi:10.1371/journal.pntd.0006395
- Khalili, M., Rezaei, M., Akhtardanesh, B., Abiri, Z., Shahheidaripour, S., 2018. Detection of *Coxiella burnetii* (Gammaproteobacteria: Coxiellaceae) in ticks collected from infested dogs in Kerman, Southeast of Iran. *Persian J. Acarol.* 7, 93–100. doi:10.22073/pja.v1i1.30699
- Komiya, T., Sadamasu, K., Toriniwa, H., Kato, K., Arashima, Y., Fukushi, H., Hirai, K., Arakawa, Y., 2003. Epidemiological survey on the route of *Coxiella burnetii* infection in an animal hospital. *J. Infect. Chemother.* 9, 151–155. doi:10.1007/s10156-003-0237-7
- Machado-Ferreira, E., Vizzoni, V.F., Balsemão-Pires, E., Moerbeck, L., Gazeta, G.S., Piesman, J., Voloch, C.M., Soares, C.A.G., 2016. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitol. Res.* 115, 4691–4699. doi:10.1007/s00436-016-5230-z
- Madariaga M.G., Rezai K., Trenholme G.M., Weinstein R.A. (2003). Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis* 3: 709-721
- Oskam, C.L., Gofton, A.W., Greay, T.L., Yang, R., Doggett, S., Ryan, U.M., Irwin, P.J., 2017. Molecular investigation into the presence of a *Coxiella* sp. in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Australia. *Vet. Microbiol.* 201, 141–145. doi:10.1016/j.vetmic.2017.01.021.
- Raoult D., Marrie T., Mege J. (2005). Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis.* 5: 219-226.
- Vanderburg S., Rubach M.P., Halliday J.E.B., Cleaveland S., Reddy E.A., Crump J.A. (2014). Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a OneHealth systematic review. *PLoS Neglect Trop D.* 8- e2787.
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Pena, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G. and Preston, P.M. 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. *Bioscience Reports*, Edinburgh Scotland, UK, 221 pp.
- Watanabe, M., Nakao, R., Amin-Babjee, S.M., Maizatun, A.M., Youn, J.H., Qiu, Y., Sugimoto, C., Watanabe, M., 2015. Molecular screening for *Rickettsia*, *Anaplasmataceae* and *Coxiella burnetii* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Malaysia. *Trop. Biomed.* 32, 390–398.
- World Organisation for Animal Health (OIE). *Terrestrial Manual*, Chapter 2.1.16. Q fever. Paris, 2018.