

VOIES D'EXCRETION DE *COXIELLA BURNETII* PAR LA VACHE LAITIERE : IMPLICATION POUR LE DEPISTAGE ET LA MAITRISE DE L'INFECTION EN ELEVAGE *

François Beaudou¹, Raphaël Guatteo² et Henri Seegers¹

RESUME : La détection des bovins infectés excréteurs est un point critique pour l'évaluation des risques de transmission de l'infection par *Coxiella burnetii* entre bovins et des bovins à l'Homme. *Coxiella burnetii* est excrétée chez les ruminants dans les produits de la parturition, mais aussi dans les fèces, le sperme, l'urine, le mucus vaginal et le lait. Cependant, la valeur informative de ces différents types d'échantillon biologique pour le dépistage des vaches laitières excrétrices en conditions réelles d'élevage n'a jamais été évaluée. L'objectif de cette étude était de décrire les réponses obtenues en appliquant une technique PCR dite en temps réel à des échantillons de lait, mucus vaginal et matières fécales collectés chez 280 vaches laitières issues de cinq élevages commerciaux connus pour être naturellement infectés par *Coxiella burnetii*, ainsi que d'évaluer les associations possibles entre voies d'excrétion. La plupart des bovins n'ont été détectés excréteurs que par une seule voie (85% des excréteurs détectés). Les animaux détectés excréteurs simultanément dans les trois voies étaient rares (moins de 2%). Ainsi, qualifier une vache laitière vis-à-vis de l'excrétion de *Coxiella burnetii* à partir du résultat d'un test PCR appliqué à un seul type d'échantillon biologique peut conduire à de nombreux faux-négatifs, et donc à une sous-estimation du risque de propagation de l'infection entre animaux et de transmission des animaux à l'homme.

Mots-clés : Vache laitière ; *Coxiella burnetii* ; voies d'excrétion ; PCR temps réel

SUMMARY: Reliable detection of *Coxiella burnetii* shedders is a critical point for the control of the spread of the bacterium between animals and from animals to humans. *Coxiella burnetii* is shed by ruminants mainly by birth products, but may be shed also by vaginal mucus, milk, and faeces, urine and semen. However, the informative value of these types of samples to identify shedders under field conditions is unknown. Our aim was then to describe the responses obtained using a real-time PCR technique applied to milk, vaginal mucus and faeces samples taken from 280 dairy cows in five commercial dairy herds known to be naturally infected with *Coxiella burnetii*, and to assess their putative associations. Cows with only one type of sample found positive accounted for more than 85% of apparent shedders. By contrast, cows with positive results for all three samples were scarce (less than 2%). Testing a cow based on only one type of biological sample may lead to misclassify her towards *Coxiella burnetii* shedding and then to underestimate the risk of bacterial spread within a herd and of transmission from animals to humans.

Keywords: Dairy cow; *Coxiella burnetii*; Shedding routes; Real-time PCR



* Texte de la communication orale présentée à la Journée AESA-AEEMA, 19 mai 2006

¹ UMR-ENVN-INRA, Gestion de la Santé animale, BP 40706, 44307 Nantes cedex 03, France

I - INTRODUCTION

La fièvre Q est une maladie de répartition mondiale, due à *Coxiella burnetii*, une bactérie strictement intracellulaire, qui peut infecter de nombreuses espèces animales (ruminants, chat, oiseaux, arthropodes) mais aussi l'Homme ; c'est une zoonose, les Ruminants domestiques étant considérés comme le principal réservoir pour l'infection humaine [Heinzen *et al.*, 1999]. La détection des bovins infectés excréteurs est un point critique pour l'évaluation des risques de transmission de l'infection par *Coxiella burnetii* entre bovins et des bovins à l'Homme. Les techniques sérologiques (immunofluorescence indirecte, fixation du complément, ELISA) sont utilisées pour mettre en évidence une exposition passée ou récente à l'agent pathogène, et non l'existence d'animaux excréteurs. Elles présentent, de plus, des défauts importants de sensibilité (existence d'excréteurs séronégatifs). Seules les méthodes de mise en évidence directe de *Coxiella burnetii* sont *a priori* informatives pour évaluer les risques de transmission de l'agent. L'examen bactérioscopique par coloration de Stamp-Machiavello classiquement utilisé dans le diagnostic de routine pour la détection de *Coxiella burnetii* dans le placenta de vaches avortées présente de faibles valeurs de sensibilité et spécificité (possibilité de confusion avec *Chlamydia*). L'isolement bactérien ne peut être envisagé dans le cadre du dépistage à grande échelle. Depuis quelques années, la technique PCR est

devenue une méthode de choix pour la détection de l'ADN de *Coxiella burnetii* dans différents types d'échantillon biologique. La mise au point récente de technique PCR dite en temps réel permet désormais de disposer d'une estimation de la charge bactérienne dans l'échantillon, information cruciale pour l'évaluation du risque zoonotique. Chez les ruminants, *Coxiella burnetii* peut être excrétée dans les produits de la parturition [Berri *et al.*, 2002], les fèces [Berri *et al.*, 2000], le sperme, l'urine [Heinzen *et al.*, 1999] et le lait [Willems *et al.*, 1994]. Cependant, à notre connaissance, la valeur informative de ces différents types d'échantillon biologique pour le dépistage des vaches laitières excrétrices en conditions réelles d'élevage n'a jamais été évaluée. En particulier il n'existe pas dans la littérature de données sur le caractère simultané ou non de l'excrétion bactérienne par plusieurs voies, alors que cette information est très importante pour identifier les sources d'infection et quantifier les risques de diffusion de l'agent pathogène au sein du troupeau.

Ainsi, l'objectif de cette étude est de décrire, en utilisant une technique PCR temps réel appliquée au lait, au mucus vaginal et aux fèces, la distribution des voies d'excrétion de *Coxiella burnetii* chez des vaches laitières issues de troupeaux naturellement infectés, ainsi que les associations possibles entre voies.

II – MATERIELS ET METHODES

L'étude présentée ici s'inscrit dans un projet global visant (i) au niveau animal, à décrire les modalités (cinétique, durée, charge bactérienne excrétée) de l'excrétion bactérienne chez la vache laitière, et (ii) au niveau du troupeau, à quantifier la force d'infection au sein du troupeau (estimation de l'incidence apparente des animaux nouvellement excréteurs).

Ainsi, l'ensemble des vaches laitières issues de cinq troupeaux commerciaux (280 animaux au total) a été soumis à prélèvements concomitants de lait individuel, de mucus vaginal et de fèces, à (au plus) neuf temps différents répartis sur une période de six mois.

A chaque temps, le lait des quatre quartiers a été prélevé aseptiquement selon les recommandations du National Mastitis Council, les matières fécales collectées à l'aide un gant de fouille stérile et déposées dans un pot stérile, et un écouvillon vaginal réalisé après nettoyage de la zone périnéale. Une technique PCR dite en temps réel (LSI Taqvet *Coxiella burnetii* ® ; Laboratoire Service International, Lissieu, France) a été utilisée, en suivant les instructions du fabricant, pour détecter la présence éventuelle d'ADN de l'agent dans chaque échantillon prélevé. Pour les échantillons positifs (présentant une courbe typique d'amplification avec un Ct inférieur à 40), les résultats sont tout d'abord exprimés en

valeur de Ct (Cycle threshold). Pour chaque échantillon positif de lait et de mucus vaginal, le titre en bactéries est ensuite estimé à partir de la valeur de Ct obtenue, en comparaison à un standard INRA de concentration connue, et après une étape de normalisation par

l'expression d'un gène de référence (GAPDH, gène spécifique des ruminants).

Une vache a été définie comme excrétrice à un temps donné si elle présentait au moins un des trois échantillons prélevés à ce temps, positif.

III – RESULTATS ET DISCUSSION

Pour chaque type de prélèvement, un total de 1550 échantillons était disponible. L'ADN de *Coxiella burnetii* a été mis en évidence dans respectivement 9,5, 19,2 et 2,7% des échantillons de mucus vaginal, lait et fèces. La distribution du titre estimé en bactéries est décrite pour chaque type d'échantillon au tableau 1. Les échantillons de lait présentent les charges bactériennes les plus élevées.

La proportion de vaches détectées excrétrices à un temps donné était de 23,3% (423 parmi

1 550). Les animaux détectés excréteurs par une seule voie (parmi les trois voies possibles) représentaient plus de 85% des animaux détectés excréteurs à un temps donné. Les animaux détectés excréteurs simultanément dans les trois voies représentaient moins de 2% du total. Lorsqu'un même bovin excrétaït concomitamment via deux voies, il s'agissait préférentiellement de la combinaison mucus vaginal-lait (tableau 2).

Tableau 1

**Distribution des titres estimés
(log du nombre de bactéries/ml) en *Coxiella burnetii*.**

Pour les fèces, les résultats sont exprimés en valeur de Ct.

Type d'échantillon	Percentile 10	Médiane	Percentile 90
Lait	0,6	2,6	4,2
Mucus vaginal	0,1	2,1	2,7
Fèces (en Ct)	35,0	37,6	39,1

Tableau 2

**Voies d'excrétion de *Coxiella burnetii* (n=423)
dans cinq troupeaux naturellement infectés**

Type de prélèvement			Pourcentage parmi les vaches détectées excrétrices à un temps donné
Lait	Mucus vaginal	Fèces	
+	+	+	1,4
+	+	-	8,0
-	+	+	3,1
+	-	+	0,9
+	-	-	59,9
-	+	-	22,2
-	-	+	4,5

Ainsi, qualifier une vache laitière vis-à-vis de l'excrétion de *Coxiella burnetii* à partir du résultat d'un test PCR appliqué à un seul type d'échantillon biologique peut conduire à de nombreux faux-négatifs, et donc à une sous-estimation du risque de propagation de l'infection entre animaux et de transmission

des animaux à l'homme. Par ailleurs, il s'agit de la première détection de *Coxiella burnetii* dans les fèces de bovins laitiers en conditions d'élevage. Cette information est capitale du point de vue de la maîtrise des risques de transmission via l'inhalation d'aérosols contaminés provenant de la litière souillée.

BIBLIOGRAPHIE

Berri M, Laroucau K, Rodolakis A - The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, 2000, **72**, 285-293.

Berri M, Souriau A, Crosby M, Rodolakis A - Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Vet.*

Microbiol., 2002, **85**, 55-60.

Heinzen RA, Hackstadt T, Samuel JE - Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.*, 1999, **7**, 149-154.

Willems H, Thiele D, Frölich-Ritter R, Krauss H - Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *J. Vet. Med. B.*, 1994, **60**, 859-861.

