

UN LAIT DE GRAND MÉLANGE OU UN ÉCHANTILLONNAGE ALÉATOIRE DE SANG D'ANIMAUX ADULTES DU TROUPEAU LAITIER REPRÉSENTENT-ILS CORRECTEMENT L'ÉTAT SANITAIRE D'UN TROUPEAU EXPOSÉ ET D'UN TROUPEAU EXPOSÉ OÙ CIRCULE *COXIELLA BURNETII* ? *

Guy Czaplicki¹, Jean-Yves Houtain¹, Cédric Mullender¹, Christophe Manteca^{2†}, Fabiana Dal Pozzo³ et Claude Saegerman³

RÉSUMÉ

La fièvre Q est une infection bactérienne zoonotique causée par *Coxiella burnetii* largement répandue en Wallonie. Le diagnostic de cette maladie reste difficile et des recommandations ont été émises par l'EFSA en termes d'échantillonnage pour poser un diagnostic individuel. Ces recommandations reposent sur des avis d'experts. Dans les troupeaux laitiers, l'accès au lait de grand mélange constitue un prélèvement de choix usuel, peu onéreux et fiable pour le diagnostic à l'échelon du troupeau. En l'absence de lait de grand mélange comme dans les troupeaux allaitants, une solution alternative pourrait être le prélèvement aléatoire de 20 animaux dans le troupeau en production (animaux adultes) pour limiter à la fois les frais de prélèvement et d'analyses sans diminuer les propriétés intrinsèques de la procédure diagnostique. Cette procédure a été testée dans 226 troupeaux laitiers wallons sélectionnés de manière aléatoire, pour lesquels le lait de grand mélange était disponible en même temps qu'un échantillonnage aléatoire de 20 animaux de plus de 24 mois.

Mots-clés : bovin, fièvre Q, enquête épidémiologique, lait de grand mélange, sérologie, PCR.

SUMMARY

Q fever is a zoonotic bacterial infection caused by *Coxiella burnetii* and widespread in Wallonia. The diagnosis of this disease is difficult and recommendations were issued by EFSA in terms of sampling to assess an individual diagnosis. These recommendations are based on expert opinion. In dairy herds, the access to bulk tank milk is a collection of common choice, inexpensive and reliable for the diagnosis at herd level. In the absence of bulk tank milk as in suckling herds, an alternative option could be the random sampling of 20 animals in the productive herd (adult animals) to reduce both the costs of sampling and analysis without decreasing the intrinsic properties of the diagnostic procedure. This procedure has been tested in 226 Walloon dairy herds randomly selected, for which the bulk tank milk was available together with a random serological sample of 20 animals over 24 months.

Keywords: Cattle, Q fever, Epidemiological survey, Bulk tank milk, Serology, PCR.



* Texte de la communication orale présentée au cours des Journées scientifiques AEEMA, 31 mai 2013.

¹ Département santé animale, Association régionale de santé et d'identification animales, Avenue A. Deponthière 40, 4431 Loncin, Belgique

² CEVA Santé animale, La Ballastière, BP126- F33501 Libourne, France

³ Unité de recherche en épidémiologie et analyse de risques appliquées aux sciences vétérinaires (UREAR-ULg), Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster 20, B42, 4000 Liège, Belgique

† Cette communication est dédiée à la mémoire du Dr. Christophe Manteca

I - INTRODUCTION

Coxiella burnetii, agent étiologique de la fièvre Q, est une bactérie gram négatif intracellulaire obligée et très résistante dans le milieu extérieur, même dans des conditions sévères [Biberstein *et al.*, 1974]. L'inhalation de particules infectieuses est considérée comme la principale voie d'infection [Aaricau-Bouvery et Rodolakis, 2005]. Par contre, l'ingestion de lait contaminé par *Coxiella burnetii* ne semble pas constituer une voie très efficace de transmission de la maladie [Rodolakis *et al.*, 2007].

Les infections par *Coxiella burnetii* concernent une grande variété d'hôtes, allant des arthropodes aux mammifères [Angelakis et Raoult, 2010]. Cependant, les ruminants domestiques sont considérés comme le principal réservoir naturel de l'infection [Fontaine *et al.*, 1975]. Si les avortements ou la naissance de produits mort-nés ou peu viables constituent les signes cliniques majeurs de l'infection chez les moutons et les chèvres, les métrites et l'infertilité, et plus rarement les avortements sont caractéristiques de la maladie chez les bovins [Aaricau-Bouvery et Rodolakis, 2005].

Des recommandations, fondées sur des avis d'experts, ont été formulées en termes

d'échantillonnage pour le diagnostic individuel de l'infection par *Coxiella burnetii* [EFSA, 2009].

Les bovins peuvent excréter la bactérie dans les sécrétions génitales, dans le lait ou dans les matières fécales de manière continue ou intermittente [Guatteo *et al.*, 2007]. Le lait est, cependant, la voie d'excrétion la plus fréquente chez les animaux asymptomatiques [Rodolakis *et al.*, 2007]. Pour cette raison, le lait de grand mélange (LGM) constitue un prélèvement de choix, peu onéreux et très utile, pour mener des enquêtes épidémiologiques [Paiba *et al.*, 1999; Guatteo *et al.*, 2007a] et pour poser un diagnostic à l'échelle du troupeau [Czaplicki *et al.*, 2009]. Les objectifs du présent travail étaient de comparer les résultats fournis par le lait de grand mélange et par des sérologies individuelles d'un échantillonnage aléatoire au sein du troupeau en production (animaux de plus de 24 mois) afin de pouvoir définir des clés d'interprétation diagnostique à l'échelle du troupeau pour chaque type d'échantillonnage et enfin de proposer, le cas échéant, une stratégie d'échantillonnage économique et fiable en l'absence de lait de grand mélange.

II - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. PRÉLÈVEMENTS

1.1. SÉRUMS

Deux cent vingt-six troupeaux laitiers ont été sélectionnés de manière aléatoire parmi les 3449 troupeaux laitiers actifs en Wallonie. Dans ces troupeaux, du sang a été prélevé entre le 01/12/2010 et le 31/01/2011 à un échantillon aléatoire composé de 20 animaux de plus de 24 mois (n=4 429), de 10 animaux de 12-24 mois (n=2 144) et de 10 animaux de 6-12 mois (n=1 915). Soient au total 8 488 échantillons de sang soumis à un test sérologique Elisa pour la recherche d'anticorps dirigés contre *Coxiella burnetii* (Phase I et Phase II).

1.2. LAITS DE GRAND MÉLANGE

Un échantillon de lait de grand mélange pour chacun de ces 226 troupeaux a été prélevé en janvier 2011 de manière indépendante dans le

cadre de la surveillance de la brucellose. Ces 226 échantillons de lait, aliquotés au départ des tubes mères le jour de leur réception, ont été conservés à -20°C jusqu'au moment de la réalisation de l'analyse sérologique et de la PCR pour éviter le risque de résultats faux négatifs [Guatteo *et al.*, 2007b].

2. MÉTHODES

2.1. SÉROLOGIE

Les échantillons de sérum et de lait de grand mélange (LGM) ont été analysés avec un test Elisa indirect (LSIVet® Ruminant Q Fever-Sérum/Milk®, Laboratoire Service International, Lissieu, France), conformément aux recommandations du fournisseur. Ce test utilise l'antigène (Phase I et Phase II) provenant d'une souche de *Coxiella burnetii* européenne de terrain. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un titre (T), calculé selon la formule :

(DO Echantillon / DO Témoin positif de référence)
* 100 où la DO est la densité optique.

Pour les sérums, l'interprétation semi-quantitative est la suivante : le résultat du test est négatif si $T \leq 40$, positif + si $40 < T \leq 100$, positif ++ si $100 < T \leq 200$, positif +++ si $200 < T \leq 300$ et positif ++++ si $T > 300$.

Pour les laits de grand mélange, l'interprétation semi-quantitative est la suivante : le résultat du test est négatif si $T \leq 30$, positif + si $30 < T \leq 100$, positif ++ si $100 < T \leq 200$ et positif +++ si $T > 200$.

2.2. PCR

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'une trousse commerciale TAQVET *Coxiella burnetii* LSI PCR TaqMan® Quantitative (Laboratoire Service International, Lissieu, France) ciblant la région

« *transposon-like répétitive* » de *Coxiella burnetii*, selon les instructions du fournisseur. L'échantillon négatif de référence était constitué d'eau vierge de Dnase et Rnase. Le témoin positif de contrôle était constitué d'une suspension contenant 10^5 *Coxiella burnetii* / mL, fourni avec la trousse. L'ADN de 200 µl de chaque échantillon de lait a été extrait avec le kit QIAmp DNA mini kit® (Qiagen S. A., Belgium), selon les recommandations du fabricant. Les tests PCR ont été réalisés sur ABIPRISM® Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystems, Belgium). Les échantillons présentant une courbe typique d'amplification ont été considérés positifs pour un Ct inférieur à 40. Ces résultats ont été complétés par une estimation quantitative en utilisant le logiciel « Quantisoft® » sous Excel, fourni par le fabricant. Les résultats sont finalement exprimés sous la forme du nombre de bactéries par ml de lait (tableau 1).

Tableau 1

Clé d'interprétation des résultats d'analyse PCR pour la fièvre Q selon le producteur de la trousse
(Laboratoire Service International, Lissieu, France)

Titre <i>Coxiella</i> /ml	Résultat interprété	Interprétation diagnostique
$> 10^4$	Positif +++	Excrétion élevée : troupeau fortement excréteur
Entre 10^2 et 10^4	Positif ++	Excrétion modérée : troupeau excréteur
Entre 10^0 et 10^2	Positif +	Charge bactérienne inférieure à la limite de quantification : charge bactérienne non significative
0	Négatif	Négative

3. ANALYSES STATISTIQUES

L'intervalle de confiance à 95 % (IC 95 %) des prévalences apparentes a été déterminé à l'aide d'une distribution binomiale exacte. La relation entre variables qualitatives a été testée à l'aide d'un test de Chi2. L'odds ratio a été utilisé pour calculer la chance d'excrétion de *C. burnetii* en fonction de la proportion d'animaux séropositifs chez les animaux producteurs de plus de 24 mois.

La relation entre variables quantitatives a été testée à l'aide du coefficient de corrélation de Pearson. L'indice de concordance entre les différents tests de diagnostic a été calculé à l'aide du coefficient Kappa. La courbe ROC (*receiver operating characteristic curve*) a été utilisée pour tester la capacité diagnostique de différentes stratégies de testage [Toma *et al.*, 1991].

III - RÉSULTATS

1. PRÉVALENCES APPARENTES TROUPEAUX 1.1.

SÉROLOGIE

Pour l'évaluation de la prévalence apparente 'troupeaux', un troupeau est considéré positif lorsque au moins un animal de l'échantillon a présenté un résultat sérologique positif ou lorsque l'échantillon de lait de grand mélange a présenté un résultat sérologique positif.

La prévalence apparente troupeaux estimée à

partir des sérologies individuelles est de 80,5 % (IC 95 % : 76,4 % - 84,6 %) alors que celle estimée à partir des LGM est de 75,2 % (IC 95 % : 70,4 % - 80,1 %), que l'on peut décomposer comme suit : 24,8 % (IC 95 % : 19,9 % - 29,6 %) sont positifs +, 40,7 % (IC 95 % : 34,4 % - 47,0 %) sont positifs ++ et 12,4 % (IC 95 % : 9,6 % - 15,2 %) sont positifs +++ (cf. tableau 2). Il n'y a pas de différence significative entre les deux prévalences estimées ($\chi^2_{(1\text{degré de liberté})} = 1,85 ; P = 0,17$).

Tableau 2

Prévalence apparente troupeaux de la fièvre Q établie sur base des résultats des examens sérologiques individuels et sur laits de grand mélange

Pa T= prévalence apparente troupeaux

Sérologie	Sérologies individuelles	Sérologie LGM
PaT globale	80,5 % (IC 95 % : 76,4 % - 84,6 %)	75,2 % (IC 95 % : 70,4 % - 80,1 %)
Dont pos +		22,1 % (IC 95 % : 13,1 % - 31,1 %)
pos ++		40,7 % (IC 95 % : 30,8 % - 50,6 %)
pos +++		12,4 % (IC 95 % : 4,4 % - 20,6 %)

1.2. PCR

La prévalence apparente globale d'excrétion de *Coxiella burnetii* des 226 échantillons de LGM est de 46,0 % (IC 95 % : 39,5 % - 52,5 %), avec une estimation d'un titre faible de bactéries ($1 \text{ à } 10^2$

bactéries/ml de lait) dans 36 échantillons ou moyen ($10^2 \text{ à } 10^4$ bactéries par ml de lait) dans 68 échantillons. Aucun LGM fortement positif ($>10^4$ bactéries/ml de lait) n'a été identifié (tableau 3).

Tableau 3

Prévalence apparente troupeaux de la fièvre Q établie sur base des résultats des examens PCR sur laits de grand mélange

Pa T= prévalence apparente troupeaux

PCR (N = 226)	Titre	Enquête épidémiologique transversale 2011
Pa T globale	($10^0 < T$)	46,0 % (IC 95 % : 39,5 - 52,5)
Dont pos +	($10^0 < T < 10^2$)	15,9 % (IC 95 % : 12,4 - 19,4)
pos ++	($10^2 < T < 10^4$)	30,1 % (IC 95 % : 24,6 - 35,6)
pos +++	($10^4 < T$)	0,0 % (IC 95 % : -)

2. PRÉVALENCES APPARENTES « ANIMAUX »

SÉROLOGIE

La prévalence apparente « animaux » (prévalence apparente individuelle) estimée à partir des sérologies individuelles est globalement de 13,4 % (IC 95 % : 12,4 % - 14,4 %) alors que celle estimée dans les troupeaux reconnus infectés est de 16,6 %

(IC 95 % : 15,3 % - 17,9 %), (tableau 4). Il n'y a pas de différence significative entre les deux prévalences estimées (Chi2 $_{(\alpha=0,05; 1\text{degré de liberté})} = 1,25 ; P = 0,26$).

Tableau 4

Prévalence apparente individuelle de la fièvre Q établie sur base des résultats des examens sérologiques individuels

Pa I= prévalence apparente individuelle

Sérologie	Sérologies individuelles globales	Sérologies individuelles dans les troupeaux positifs
Pa I globale	13,4 % (IC 95 % : 12,4 %- 14,4 %)	16,6 % (IC 95 % : 15,3 % - 17,9 %)
Dont pos +	5,4 % (IC 95 % : 5,1 %- 5,7 %)	6,6 % (IC 95 % : 6,2 % - 7,0 %)
pos ++	6,1 % (IC 95 % : 5,8 %- 6,3 %)	7,6 % (IC 95 % : 7,1 % - 8,0 %)
pos +++	1,9 % (IC 95 % : 1,8 %- 2,0 %)	2,3 % (IC 95 % : 2,2 % - 2,5 %)
pos ++++	0,0 % (IC 95 % : --)	0,0 % (IC 95 % : --)

3. RELATION GLOBALE SÉROLOGIE LAIT DE GRAND MÉLANGE ET SÉROLOGIES INDIVIDUELLES

La comparaison du statut infecté d'un troupeau fondé sur la positivité du LGM au statut du même troupeau défini par la sérologie sur l'échantillon

sanguin des animaux de plus de 24 mois démontre un pourcentage brut d'accord de 80,5 %, avec un coefficient Kappa égal à 0,44 (IC 95 % : 0,31-0,57) qualifié de concordance moyenne ($Z = 6,65 ; P < 0,05$) (tableau 5).

Tableau 5

Relation globale entre la sérologie appliquée au lait de grand mélange et la sérologie appliquée au troupeau. Concordance des prévalences troupeaux.

		Troupeaux testés en sérologie individuelle		
		Positif	Négatif	Total
LGM	Positif	154	16	170
	Négatif	28	28	56
	Total	182	44	226

4. RELATION GLOBALE ENTRE LA SÉROLOGIE DE LAIT DE GRAND MÉLANGE ET LES SÉROLOGIES INDIVIDUELLES CHEZ LES ANIMAUX DE PLUS DE 24 MOIS

Le tableau 6 présente le niveau de prévalence apparente individuelle des animaux de plus de 24

mois pour chaque niveau de séropositivité du lait de grand mélange. Ce dernier donne un résultat positif pour une prévalence apparente moyenne de 9,2 % dans le troupeau des animaux de plus de 24 mois. Une régression linéaire permet de confirmer un lien fort entre le niveau de séropositivité du lait de grand mélange et la prévalence apparente

individuelle moyenne dans le troupeau des animaux de plus de 24 mois (figure 1).

Tableau 6

Relation globale entre la sérologie appliquée au lait de grand mélange et le niveau de prévalence apparente individuelle chez les animaux de plus de 24 mois.

Pa I= prévalence apparente individuelle ; N = nombre

LGM	N troupeaux	N animaux >24 mois	Prévalence apparente chez les animaux de plus de 24 mois
Négatif	56	1 091	3,6 % (IC 95 % : 3,2 % - 4,0 %)
Positif +	50	985	9,2 % (IC 95 % : 9,2 % - 10,2 %)
Positif ++	92	1 816	17,2 % (IC 95 % : 15,9 % - 18,5 %)
Positif +++	28	537	28,1 % (IC 95 % : 24,7 % - 31,5 %)
Positif	170	3 338	16,6 % (IC 95 % : 15,3 % - 17,9 %)
Total	226	4 429	13,4 % (IC 95 % : 12,4 % - 14,4 %)

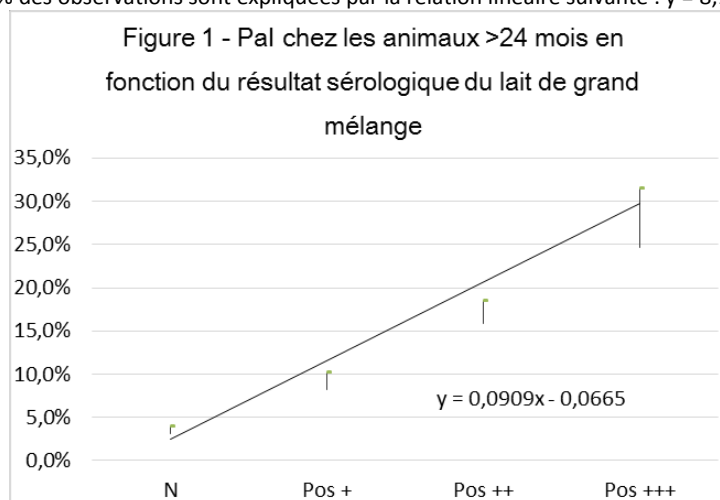
Figure 1

Relation globale entre le résultat de la sérologie appliquée au lait de grand mélange (axe des X) et le niveau de prévalence apparente individuelle chez les animaux de plus de 24 mois exprimée en pour cent (axe des Y)

Le coefficient de corrélation de Pearson est de 0,98 avec une valeur de $P = 0,014$.

Si on transforme le résultat du lait de tank (N=0 ; Pos ++=2 et Pos +++ = 3).

Au total, 98 % des observations sont expliquées par la relation linéaire suivante : $y = 8,1575x - 0,8656$



5. CONCORDANCE ENTRE LES RÉSULTATS DU LAIT DE GRAND MÉLANGE ET LES SÉROLOGIES INDIVIDUELLES

L'usage d'une courbe ROC faisant varier le nombre d'animaux séropositifs dans l'échantillonnage du troupeau en relation avec le résultat positif ou négatif du LGM a permis de déterminer un nombre optimal d'animaux séropositifs dans le troupeau qui permettrait de qualifier le statut du troupeau. Il

est de deux (sensibilité de 93,8 % ; spécificité de 49,5 % ; valeur prédictive d'un résultat positif = 71,2 % et valeur prédictive d'un résultat négatif = 85,7 %). Cependant avec ce seuil, la spécificité est faible. Le choix et l'usage d'un seuil de 3 animaux positifs permet d'augmenter la spécificité à 96,4 % au détriment de la sensibilité à 52,9 %.

6. RELATION ENTRE LA PCR ET LA SÉROLOGIE LAIT DE GRAND MÉLANGE

Lorsque le lait de grand mélange fournit une réponse négative, la prévalence apparente d'excrétion dans le lait est 10,7 % (IC 95 % : 5,7 %-15,7 %) alors que celle estimée dans les laits de grand mélange positifs est de 57,6 % (IC 95 % : 50,3 % - 64,9 %). Un tel lait de grand mélange a donc 5,4 fois plus de risque d'être positif en PCR (OR = 5,38 (IC 95 % : 2,19- 13,23)) et $\text{Chi}^2_{(alpha=0,05 ; 1 \text{ degré de liberté})} = 37,5 ; P < 0,01$

7. RELATION ENTRE LA PCR ET LES SÉROLOGIES INDIVIDUELLES

De la même manière, lorsque l'échantillon des 20 animaux de plus de 24 mois comprend moins de 2 animaux séropositifs, la prévalence apparente d'excrétion dans le lait est de 14,3 % (IC 95 % : 7,9 % - 20,7 %) alors que dans les échantillons

comprenant au moins 2 animaux séropositifs, cette prévalence apparente d'excrétion s'élève à 71,2 % (IC 95 % : 65,0 % - 77,4 %). Il s'en suit qu'un tel échantillonnage présente environ 5 fois plus de risque d'être positif en PCR (OR = 4,98 (IC 95 % : 2,20- 11,30) et $\text{Chi}^2_{(alpha=0,05 ; 1 \text{ degré de liberté})} = 55,65 ; P < 0,01$.

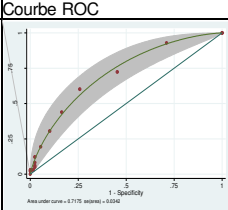
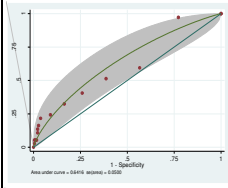
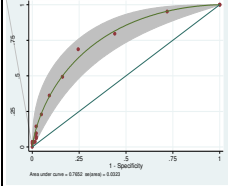
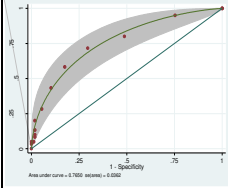
8. QUALITÉ DIAGNOSTIQUE EN FONCTION DES SEUILS

Le pouvoir de diagnostic d'un test ou d'une stratégie peut être évalué grâce au calcul de l'aire sous la courbe ROC (tableau 7). Ce pouvoir est le plus important en prenant en compte une sérologie positive obtenue sur lait de grand mélange accompagnée d'un test PCR positif avec excrétion de plus de 100 bactéries. Une PCR positive sans une expression semi-quantitative est cependant également utilisable en tant que stratégie de dépistage.

Tableau 7

Efficacité diagnostique des différents scénarios testés en fonction des seuils de positivité retenus en sérologie et en PCR sur le lait de grand mélange

CO, cut-off (nombre d'animaux positifs au test sur 20 animaux testés) ; LGM, lait de grand mélange ; Se, sensibilité ; Sp, spécificité ; VPP, valeur prédictive d'un résultat positif ; VPN, valeur prédictive d'un résultat négatif.

SEUIL LGM	Courbe ROC	Aire sous ROC	CO Animaux	Se	Sp	VPP	VPN
Scénario A Séro : + PCR : >0		0.711	3+ ou plus/20	60.2%	74.2%	64.1%	70.9%
Scénario B Séro : + PCR : >10 ²		0.616	3+ ou plus/20	51.4%	61.4%	20.7%	86.6%
Scénario C Séro : ++ PCR : >0		0.760	3+ ou plus/20	68.7%	75.5%	62.0%	80.6%
Scénario D Séro : ++ PCR : >10 ²		0.761	3+ ou plus/20	71.7%	70.5%	46.7%	87.3%

IV - DISCUSSION

Le niveau de prévalence apparente troupeaux enregistrés (tableau 2) via le LGM est de 75,2 % et via les sérologies individuelles de 80,5 %. Ces niveaux ne sont pas statistiquement différents et confirment donc l'utilité du LGM pour dépister les troupeaux bovins laitiers exposés à *Coxiella burnetii*. Ils sont par ailleurs assez semblables à ceux rapportés par différentes études antérieures et confirment le caractère enzootique de l'infection dans les troupeaux bovins laitiers en Belgique. Ainsi, en 2009, Ribbens *et al.* en Flandres et Van Geel *et al.* en Belgique observent respectivement une prévalence apparente 74,3 % de 76,7 % dans les troupeaux bovins laitiers, nettement supérieure à celle observée en 2006 en Wallonie par Czaplicki *et al.* [2009]. La distribution des troupeaux en fonction du niveau de séropositivité du LGM permet de constater que la proportion de troupeaux fortement séropositifs, et donc très suspects d'être le siège d'une infection active par *Coxiella burnetii* ainsi que démontré par Czaplicki *et al.* en 2009, reste faible, de l'ordre de 10 %. Comme précédemment, l'identification des troupeaux laitiers infectés sur base de la PCR (tableau 3) rapporte une importante prévalence apparente d'excrétion de 46,0 %. Toutefois, l'excrétion est très faible (moins de 100 germes par ml de lait, et donc peu ou non significative) dans un tiers des troupeaux reconnus infectés tandis qu'aucun troupeau analysé n'excrète plus de 10000 germes/ml de lait. Parmi les deux tiers de troupeaux nettement excréteurs, le nombre moyen de germes était de 796/ml de lait (valeurs minimale et maximale : respectivement 127 et 4 343 germes par ml de lait).

La séroprévalence apparente intra-troupeau observée est faible (tableau 4) tant globalement (13,4 %) que dans les seuls troupeaux reconnus séropositifs (16,6 %). Il n'y a pas de différence significative entre ces prévalences apparentes intra-troupeaux. La distribution de ces résultats en fonction du niveau de séropositivité montre encore une fois que la majorité des animaux exposés sont faiblement séropositifs.

Si l'on considère positif tout troupeau dans lequel on a identifié au moins un animal séropositif quelle que soit sa classe d'âge, la concordance entre l'analyse des laits de grand mélange et celle des échantillons de sang prélevés de manière aléatoire est moyenne malgré un taux de concordance globale de 80 %. En effet, le coefficient kappa est

de 0,44. Ainsi, 28 échantillons de LGM séronégatifs correspondent à des troupeaux avec au moins un animal séropositif : il peut s'agir de troupeaux où la prévalence dans le groupe des animaux de plus de 24 mois est inférieure au seuil de 10 % ou d'un défaut de sensibilité de la trousse évaluée à 87 % par le fabricant [Van Geel *et al.*, 2012]. Par ailleurs, 16 LGM ont donné un résultat séropositif en l'absence d'animaux séropositifs : il peut s'agir de réactions faussement positives alors que la spécificité du test, annoncée par le fabricant, est de 100 % ou encore d'un défaut de sensibilité du test appliqué aux sérums comme déjà évoqué.

Quoi qu'il en soit, les niveaux de séropositivité du LGM semblent étroitement liés à la séroprévalence apparente enregistrée dans le groupe des animaux de plus de 24 mois sélectionnés de manière aléatoire dans chaque troupeau (tableau 6). En effet, le test se positive pour une séroprévalence apparente moyenne de 9,2 % ainsi que suggéré par le fabricant de la trousse [Meunier, 2008], et toute augmentation de son niveau de positivité correspond logiquement à une augmentation de la prévalence dans l'échantillonnage des animaux de plus de 24 mois. Une régression linéaire simple confirme cette observation (figure 1). Il est toutefois remarquable que la prévalence enregistrée dans le groupe des animaux en production reste en moyenne assez faible : ceci est étonnant si l'on considère le caractère contagieux de l'infection par *Coxiella burnetii*. Le phénomène pourrait par contre être expliqué par l'absence de circulation active de la bactérie au sein du troupeau, la présence d'anticorps ne constituant alors que la signature du passage du germe et de l'exposition passée des animaux.

L'utilisation des courbes ROC a permis de montrer que par rapport au LGM, l'échantillonnage aléatoire de 20 animaux âgés de plus de 24 mois constituait une alternative intéressante : un seuil de minimum deux ou trois animaux séropositifs a même pu être déterminé pour permettre de qualifier le statut infecté du troupeau avec des caractéristiques intéressantes. En d'autres termes, une forme d'équivalence entre la signification diagnostique d'un LGM séropositif et un échantillonnage aléatoire de 20 animaux de plus de 24 mois comprenant au moins deux à trois animaux séropositifs a pu être démontrée. Ceci permettrait donc, le cas échéant, de remplacer l'utilisation du LGM s'il n'est pas disponible par

l'analyse de cet échantillonnage aléatoire : cette solution pourrait concerner par exemple les très nombreux troupeaux bovins allaitants présents sur notre territoire. Même si la prévalence apparente troupeaux semble inférieure dans les troupeaux allaitants [Vangeel *et al.*, 2012], nos estimations préliminaires de la prévalence apparente intra-troupeau dans les deux spéculations ne semblent pas montrer de différence significative (données non publiées). Le nombre de données étant restreint, la plus élémentaire prudence s'impose avant de conclure et nécessite des investigations complémentaires.

Ainsi que précédemment démontré [Czaplicki *et al.*, 2009] la séropositivité du LGM et son intensité sont étroitement associées à la fréquence d'identification du germe dans le LGM. Ainsi, un LGM séropositif a-t-il 5,4 fois plus de risque d'être identifié positif par PCR qu'un LGM séronégatif. De manière intéressante, la même constatation s'impose pour un échantillonnage de 20 animaux prélevé de manière aléatoire dans le troupeau des animaux en production (animaux de plus de 24 mois) dans lequel on a identifié plus de deux animaux séropositifs : dans ce cas, le risque d'observer un résultat PCR positif sur le LGM correspondant est également 5 fois plus élevé. De manière empirique, il semble donc possible d'établir un parallélisme entre ces deux types de prélèvements. Pour vérifier cela, différents scénarios de procédure diagnostique ont été testés à l'aide de courbes ROC en fonction des seuils de positivité retenus tant pour le LGM en matière de

sérologie et de PCR que pour l'échantillonnage de sérologies individuelles.

Quel que soit le seuil appliqué au test PCR (>0 ou >10² bactéries) et au test sérologique (positif + ou positif ++) sur lait de grand mélange, l'observation de 3 animaux ou plus de 3 animaux séropositifs dans l'échantillon de 20 animaux de plus de 24 mois prélevés au hasard dans le troupeau permet d'objectiver, avec une exactitude et une précision satisfaisantes, la présence et donc la circulation du pathogène au sein du troupeau laitier dans plus de 83 % des cas. Ce type d'échantillonnage a donc, selon nous, une valeur diagnostique sensiblement équivalente à celle du lait de grand mélange et pourrait être proposé comme alternative à ce dernier lorsqu'il n'est pas disponible. Considérant que la distribution des sérologies positives au sein d'un troupeau allaitant n'est statistiquement pas différente de celle observée en troupeau laitier (données non montrées), il semble possible d'envisager le même plan d'échantillonnage pour les cheptels allaitants, mais une validation spécifique s'avère nécessaire.

S'il devait s'avérer que la dynamique d'infection par *Coxiella burnetii* est la même dans les troupeaux laitiers et dans les troupeaux allaitants, l'utilisation d'un échantillonnage aléatoire de 20 animaux de plus de 24 mois au sein du troupeau pourrait constituer un moyen diagnostique de la fièvre Q à l'échelon du troupeau au même titre que le lait de grand mélange pour les troupeaux laitiers. Toutefois, des investigations complémentaires sont indispensables avant de pouvoir conclure.

BIBLIOGRAPHIE

Angelakis E., Raoult D. – Q Fever. *Vet Microbiol.*, 2010, **140**, 297-309.

Aaricau-Bouvery N., Rodolakis A. - Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis ? *Vet. Res.*, 2005, **36**, 327-349.

Biberstein E.L., Behymer D.E., Bushmell R., Crenshaw G., Riemann H.P. and Franti C.E. - A survey of Q fever (*Coxiella burnetii*) in California dairy cows: results of field trials. *Am. J. Vet. Res.*, 1974, **53**, 1577-1582.

Czaplicki G., Houtain J.Y., Mullender C., Manteca C., Saegerman C. - Le lait de tank, outil fiable pour le diagnostic de la fièvre Q dans un troupeau

bovin laitier ? *Épidémiol. et santé anim.*, 2009, **56**, 117-127.

EFSA (European Food Safety Authority), 2009. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. Report EFSA, Parma, Italy, 48 pp.

Fontaine M., Giauffret A., Russot P. and Durand M. - Importance des troupeaux ovins dans l'épidémiologie de la fièvre Q. *Méd. Mal., Infect.*, 1975, **8**, 445-449. Guatteo R., Beaudou F., Joly A., Seegers H. - Performances of an ELISA applied to serum and milk for the detection of antibodies to *Coxiella burnetii* in dairy cattle.

- Rev. Méd. Vét.*, 2007a, **158**(5), 250-252.
- Guatteo R., Beaudeau F., Ledoux D., Le Dréan E., Seegers H. - Risk of false negative results when delaying PCR from sampling for *Coxiella burnetii* detection in dairy cows. *Rev. Méd. Vét.*, 2007b, **158**(12), 641-644.
- Guatteo R., Beaudeau F., Joly A., Seegers H. - Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a Real Time PCR applied to bulk tank milk. *Zoonoses Public Health*, 2007c, **54**, 191-194.
- Guatteo R., Beaudeau F., Joly A., Seegers H. - *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Research*, 2007d, **38**, 849-860.
- Meunier J. - Dossier technique : Ruminant Milk Q Fever LSI Kit, 2008, 13 p.
- Paiba G.A., Green L.E., Lloyd G., Patel D. and Morgan K.L. - Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.*, 1999, **144**, 519-522.
- Ribbens S., De Bleecker K., Van Crombrugge J.M., De Meulemeester L., Mijten E., Stoop S., De Kruif A., Dewulf J. - Serosurvey of four 'emerging' cattle diseases (Q-fever, Neosporosis, Leptospirosis and Salmonellosis) in Northern-Belgian dairy herds using bulk-milk samples. 2009 Proceedings of VEE studiedag.Tervuren, Belgium, October 23, 2009. P. 51-54.
- Rodolakis A., Berri M., Héchard C., Caudron C., Souriau A., Bodier C.C., Blanchard B., Camuset P., Devillechaise P., Natorp J.C., Vadet J.P., Arricau-Bouvery N. - Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds. *J. Dairy Sci.*, 2007, **90**, 5352-5360.
- Toma B., Bénet J.J., Dufour B., Eloit M., Moutou F., Sanaa M. - Glossaire d'épidémiologie animale. Editions du Point Vétérinaire, Paris, France, 1991, pp. 365.
- Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénet J.J., Shaw A., Moutou F., Louza A. - Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures, 2ème Ed., AEEMA, Maison Alfort France, 2001, 696 p.
- Vangeel I., Méroc E., Roelandt S., Welby S., Van Driessche E., Czaplicki G., Van Schoubroeck L., Quinet C., Riocreux F., Hooyberghs J., Houdart P., Van der Stede Y. - Seroprevalence of *Neospora caninum*, paratuberculosis and Q fever in cattle in Belgium in 2009-2010. *Vet. Rec.*, 2012, **171**(19), 477.



Remerciements

Les auteurs remercient les membres de l'ARSIA et l'UREAR-ULq atant pris part à l'étude. Cette étude a été partiellement financée par l'ARCIA, l'UREAR-ULq et par le SPF Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement (convention N° RT 11/6 COXIELLA).