

Evolution de l'infection et de l'excrétion dans le lait de *Coxiella burnetii* au sein d'un élevage caprin atteint de fièvre Q abortive

M. BERRI (1), E. ROUSSET (2), J.L. CHAMPION (3), A. RODOLAKIS (1)

(1) INRA de Tours-Nouzilly. Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly-France

(2) AFSSA, Pathologie des Petits Ruminants. Les Templiers, 105 route des Chappes BP 111, 06902 Sophia Antipolis Cedex, France.

(3) Vétérinaire Conseil du GDS, 33 rue Urtis, 84240 La Tour d'Aigues, France.

RESUME - Au printemps 2002, 16 avortements en fin de gestation et des naissances avec mortalité se sont produits dans une ferme dans le sud de la France, dans un troupeau caprin laitier nouvellement constitué de 56 chèvres primipares. Une analyse sérologique par ELISA, d'une dizaine de sérums, a permis de suspecter fortement la fièvre Q comme cause d'avortement. Une recherche par PCR, effectuée sur du mucus vaginal prélevé à partir d'une chèvre qui a avorté, a montré la présence de *C. burnetii* et confirmé ainsi le diagnostic. A la fin de cette première mise bas, un nouvel examen sérologique effectué sur du sérum prélevé à partir de 20 chèvres a montré la présence des anticorps contre *C. burnetii* chez 80 % des chèvres testées. Onze mois après cet épisode abortif, la séroprévalence est encore de 60 % au sein de ce troupeau. L'analyse en PCR, des prélèvements de lait effectués au cours de la lactation suivant les avortements, a permis de détecter 5 chèvres positives et a montré que l'excrétion pouvait persister plus de trois mois après l'épisode abortif. La gestation suivante a été caractérisée par un seul avortement et trois mises bas de produits chétifs. L'analyse sérologique a montré que 48 % des bêtes étaient positives en ELISA. Cependant, l'analyse en PCR des écouillons vaginaux et du lait prélevé 2 à 4 semaines après la seconde mise n'a pas permis de mettre en évidence la présence de coxiella.

Natural Q fever progression and *Coxiella burnetii* shedding in milk during two kidding seasons after an outbreak of enzootic abortion in goat herd

M. BERRI (1), E. ROUSSET (2), J.L. CHAMPION (3), A. RODOLAKIS

(1) INRA de Tours-Nouzilly. Pathologie Infectieuse et Immunologie, 37380 Nouzilly-France

SUMMARY - In the spring of 2002, an outbreak of reproductive failures characterised by abortion, stillbirth and weak newborn kids occurred in 16 of 48 (33%) goats at their first parturition. These females belonged to a dairy caprine farm newly established and located in the south of France. The screening of abortion-related infectious diseases using ELISA and PCR tests showed evidence of Q fever aetiology. Then, PCR analysis performed on vaginal mucus taken from a goat that aborted showed the presence of *C. burnetii* and confirmed the diagnosis of Q fever. At the end of this kidding season, an ELISA test performed on serum samples taken from 20 goats showed 80% of seropositive animals. Eleven months later, *C. burnetii* antibodies were still present within the flock as 60% of the animals were tested ELISA positive. Meanwhile, the milk samples were also investigated and PCR analysis showed that 5 goats excreted the bacteria and the shedding persisted for 3 months. The second parturition was characterised by only one abortion and three kiddings with weak newborns. ELISA testing performed at the end of the second parturition showed 48% of seropositive animals but PCR analysis performed 2 to 4 weeks after the second parturition did not show any evidence of *C. burnetii* in the female's vaginal tract and milk samples.

INTRODUCTION

La fièvre Q est une zoonose qui existe dans le monde entier due à une bactérie intracellulaire, *Coxiella burnetii*. L'infection a été constatée dans toutes les espèces domestiques et de nombreuses espèces sauvages, y compris les oiseaux (Lang, 1990). En règle générale, chez les animaux domestiques, l'infection est asymptomatique. Par contre, chez les ruminants, elle peut entraîner des avortements en fin de gestation sans signe clinique précurseur ou des mises bas prématurées ou à terme de produits chétifs qui meurent rapidement ou s'élèvent difficilement. La fièvre Q se traduit chez l'homme par une infection aiguë (pneumonie, hépatite) et plus fréquemment par des infections bénignes, qui dans un petit nombre de cas évolueront vers une infection chronique de type endocardite (Raoult et Marrie, 1995 ; Marrie et Raoult, 1997). Les ruminants (ovins, bovins et caprins) sont considérés comme le principal réservoir des infections humaines (Fishbein et Raoult, 1992). Les animaux infectés excrètent les germes dans l'urine, les fèces, le lait et surtout dans les produits de la mise bas ou de l'avortement (Berri *et al.*, 2001). La contamination humaine par les animaux domestiques se fait essentiellement par voie respiratoire et éventuellement par les produits laitiers contaminés et non traités thermiquement. Son contrôle nécessite une meilleure connaissance des voies d'excrétion, de

la durée d'excrétion ainsi que l'identification des animaux porteurs et excréteurs du germe. Il n'existe pas de données précises concernant l'évolution de la fièvre Q et l'excrétion de *C. burnetii* chez les animaux domestiques notamment les ovins et les caprins. Le diagnostic de la maladie chez l'animal reposait jusqu'à maintenant sur l'examen bactériologique avec la coloration de Stamp et l'analyse sérologique par la technique de la fixation du complément. Ces deux techniques sont, cependant, peu sensibles et très peu spécifiques contrairement à l'ELISA et la PCR. Au laboratoire INRA PII, une technique de PCR a été mise au point (Berri *et al.* 2000) pour permettre de mettre en évidence la présence ou l'absence de *C. burnetii*. Cette technique a été utilisée pour suivre l'excrétion de la bactérie ainsi que sa durée dans le mucus vaginal, dans le lait et dans les fèces dans le troupeau ovin de l'unité expérimentale de l'INRA où des avortements ont eu lieu (Berri *et al.* 2001, 2002, 2004).

Au printemps 2002, un épisode de fièvre Q s'est produit dans une ferme dans le sud de la France, dans un troupeau caprin laitier nouvellement constitué de chèvres primipares. L'objectif de ce travail était donc d'étudier l'évolution de l'infection dans ce troupeau et de suivre l'excrétion de la bactérie par la technique PCR pendant toute la période de la lactation et au cours de la gestation suivante.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ANIMAUX

L'élevage caprin étudié a été établi en février 2002. Il est constitué de 56 chèvres primipares et de 4 boucs. Ces animaux proviennent d'un troupeau caprin spécialisé et présumé indemne de fièvre Q sur la base de l'absence de clinique évocatrice de la maladie. Ils ont été transportés dans un camion non désinfecté ayant servi au transport d'ovins. Le troupeau est géré d'une manière traditionnelle et les animaux ne sont ni traités aux antibiotiques, ni vaccinés contre aucune des maladies abortives connues. La première mise bas s'est étendue d'avril à juin 2002 et les chèvres ont eu une longue période de lactation. Ensuite, elles ont été mises en reproduction en avril 2003 et la seconde mise bas a eu lieu du 1 au 10 septembre 2003.

1.2. PRELEVEMENTS ET ANALYSES

1.2.1. Sang

Des prélèvements de sang ont été effectués le 10 juin 2002 sur 20 chèvres sélectionnées (4 gestantes, 8 mises bas normales, 6 avortement ou mise bas de chevreaux non viables, 2 vides). Ensuite, l'ensemble du troupeau a été prélevé onze mois plus tard (1/04/2003) et une semaine après la seconde mise bas du troupeau (23/9/2003). La sérologie a été déterminée par la technique ELISA en utilisant le kit CHEKIT (Hoechst Roussel Vet, France) selon les recommandations du fabricant.

1.2.2. Lait

Des échantillons de lait ont été collectés à la fin de la première mise bas le 10 juin 2002 et groupés en 5 pools (P1-P5). P1 et P2 contiennent des laits de chèvres ayant eu des problèmes d'avortement alors que P3, P4 et P5 sont constitués de laits prélevés à partir de chèvres ayant mis bas normalement. Ensuite, des laits individuels ont été prélevés deux semaines après la mise bas (24 juin 2002) puis 5 collectes ont été réalisées entre le 15 juillet 2002 et 16 juin 2003. Après la seconde mise bas, toutes les chèvres ont été prélevées.

1.2.3. Ecouvillons vaginaux

Pour confirmer le diagnostic sérologique de la fièvre Q, un écouvillon vaginal a été prélevé à partir d'une chèvre qui a avorté. Ensuite, des écouvillons ont été prélevés à partir de toutes les chèvres après la seconde mise bas.

1.2.4. Purification d'ADN et analyse PCR

Le traitement des échantillons de lait et des écouvillons vaginaux a été réalisé dans un laboratoire de type P3, afin d'inactiver les germes et mettre à nu le matériel génétique de la bactérie. Le protocole est spécifique à chaque type d'échantillon (Berri *et al.*, 2003a). Le lait et les fèces comme d'autres échantillons naturels contiennent une grande quantité d'éléments et notamment des inhibiteurs de la PCR. Afin de se débarrasser de ces éléments, une purification d'ADN paraît donc nécessaire. Elle est réalisée dans les mêmes conditions déjà décrites par Berri *et al.*, (2003a). L'ADN ainsi obtenu a été testé directement en PCR pour mettre en évidence la présence ou l'absence de *C. burnetii* selon la technique décrite par Berri *et al.*, (2003a).

2. RESULTATS

2.1. DIAGNOSTIC DE L'EPISODE ABORTIF ET EVOLUTION DE LA CLINIQUE A LA GESTATION SUIVANTE

Cinq semaines après l'arrivée à la bergerie le 3 avril 2002, une chèvre a avorté marquant ainsi le début de l'épisode abortif. Le mois suivant, 9 autres chèvres ont mis bas de chevreaux mort-nés et 6 autres ont mis bas des chevreaux très faibles. 32 mises bas se sont déroulées normalement (tableau 1). Sur les 56 chèvres primipares présumées pleines par l'éleveur vendeur, 48 ont mis bas alors que 8 chèvres étaient vides. Un sondage sérologique a été effectué par le laboratoire vétérinaire départemental sur 10 animaux pour rechercher la cause d'avortement (Chlamydie, Salmonellose, Toxoplasmose et fièvre Q). Les résultats ont montré que tous les animaux étaient négatifs vis à vis de la chlamydie et la salmonellose alors qu'un animal était positif en toxoplasmose et la totalité des 10 chèvres présentait des anticorps contre la fièvre Q. Parmi elles, 7 étaient fortement positives. Le diagnostic de la fièvre Q a été confirmé par PCR qui a permis de mettre en évidence la présence de *C. burnetii* dans du mucus vaginal prélevé à partir d'une chèvre ayant avorté. La seconde gestation a été caractérisée par 51 mises bas normales, 3 mises bas de chevreaux faibles et seulement un avortement (tableau 1).

Tableau 1 : évaluation des deux gestations du troupeau caprin étudié après une infection à *coxiella burnetii*

	Première gestation	Seconde gestation
Avortements	1 (2 %)	1 (2 %)
Mortinatalités	9 (19 %)	0 (7 %)
Mises bas de chevreaux faibles	6 (13 %)	3 (5 %)
Chèvres vides	8 (17 %)	3 (5 %)
Mises bas normales	32 (67 %)	51 (93 %)

2.2 REPONSE SEROLOGIQUE DES CHEVRES

L'analyse de la réponse en anticorps vis à vis de la fièvre Q réalisée sur 20 chèvres à la fin de la première mise bas, par la technique d'ELISA, a révélé 16 animaux positifs (80 %) confirmant l'importance de l'implication de la fièvre Q dans ce troupeau caprin (tableau 2). Un an après le début de l'épisode abortif, 33 (60 %) chèvres ont été encore testées positives. Parmi les 8 animaux qui étaient vides à la première mise bas, 5 présentaient un titre en anticorps élevé en ELISA. Quinze mois plus tard, à la fin de la seconde mise bas, 27 (48 %) animaux étaient encore testés positifs en ELISA (tableau 2).

Tableau 2 : réponse en anticorps vis à vis de la fièvre Q du troupeau caprin à différentes dates après l'épisode abortif.

Dates de prélèvement	10/06/2002	1/04/2003	23/09/2003
Chèvres testées	20	55	56
ELISA (+)	16 (80 %)	33 (60 %)	27 (48 %)
ELISA (-)	4 (20 %)	22 (40 %)	29 (55 %)

2.3 RESULTATS DES PCR SUR ECOUVILLONS VAGINAUX

C. burnetii n'a pas été détectée par PCR dans le mucus vaginal prélevé à partir de toutes les chèvres après la seconde mise bas.

2.4 EXCRETION DE *C. BURNETII* DANS DU LAIT

L'analyse en PCR des laits prélevés à partir des chèvres qui ont mis bas avant le 10/6/02 a montré la présence de *C. burnetii* dans les pools P1 et P2 et pas dans les pools P3, P4 et P5. Une autre analyse PCR a été effectuée deux semaines plus tard sur 22 laits individuels et a montré la présence de la bactérie dans 5 (23 %) échantillons. Ces prélèvements positifs ont été effectués sur 4 chèvres ayant mis bas des chevreaux mort-nés et un prélèvement est issu d'une chèvre qui a mis bas des chevreaux très faibles. L'excrétion des *coxiella* a persisté plus de 3 mois au cours de la lactation. En revanche, aucune excrétion dans du lait n'a été détectée par PCR quelques semaines après la mise bas suivante, en septembre 2003.

Tableau 3 : excrétion de *C. burnetii* dans du lait de chèvres prélevé à différentes dates après la mise bas.

Dates de prélèvements	Laits testés	PCR Positif	PCR Négatif
Mise bas (1-15/4/02)			
10/06/02	5 pools P1-5	2 pools P1-2	3 pools P3-4-5
24/06/02	22	5 (23 %)	17 (77 %)
15/7/02	13	2 (15 %)	11 (85 %)
2/09/02	15	0 (0 %)	15 (100 %)
13/11/02	15	0 (0 %)	15 (100 %)
14/5/03	15	0 (0 %)	15 (100 %)
Mise bas 2 (1-10/9/03)			
23/09/03	56	0 (0 %)	56 (100 %)

3. DISCUSSION

Au cours du printemps de 2002, un épisode abortif dû à la fièvre Q a été identifié dans un troupeau de chèvres primipares nouvellement établi. Il a été très difficile d'identifier avec précision la source de contamination de ces chèvres. Plusieurs hypothèses ont été émises. Comme le troupeau d'origine d'où proviennent les chèvres a été présumé indemne de fièvre Q, la source initiale de l'infection pourrait être l'inhalation de poussières contaminées ou à partir de la litière présente dans le camion de transport. En effet, la contamination humaine par l'utilisation du fumier horticole acheminé à partir de ferme abritant des ovins infectés a été décrite dans la littérature (Salmon *et al.*, 1982 ; Berri *et al.* 2003b). Par ailleurs, des cas humains de fièvre Q contaminés par voie respiratoire ont été rapportés parmi des résidents le long des routes empruntées par des camions transportant des ovins (Babudieri, 1959). La bergerie était vide d'animaux depuis une dizaine d'années. En revanche, les prairies avoisinantes ont été pâturées jusqu'à la fin de l'automne 2002 par des troupeaux ovins où des cas de fièvre Q ont été suspectés. Les chèvres sont sorties au pâturage à partir du 15 mars, trois semaines avant le début de l'épisode abortif. La contamination du troupeau d'origine ne peut être exclue et quelques chèvres pourraient être infectées d'une façon latente. L'état physiologique de la gestation associé au stress du transport et l'entassement dans le camion pourrait réactiver l'infection. Les 56 chèvres achetées étaient présumées gestantes par l'éleveur vendeur, mais aucune échographie n'a été pratiquée sur ces animaux. Huit chèvres se sont avérées non gestantes au moment de la première mise bas. Parmi elles, 5 étaient fortement positives en ELISA. Ainsi, l'infection à *C. burnetii* pourrait être responsable de l'interruption précoce de la gestation.

Même si la seconde mise bas a été caractérisée par une meilleure performance de reproduction, un avortement et trois mises bas de produits chétifs ont eu lieu. L'analyse en PCR du mucus vaginal prélevé à partir de toutes les chèvres après la seconde mise bas était négative. Ce résultat suggère que, comme les ovins (Berri *et al.*, 2002), les caprins se rétablissent rapidement après un avortement du à la fièvre Q et que les problèmes de reproduction surviendraient essentiellement à la première mise bas suivant l'infection. Cependant, des données récentes ont montré que les chèvres pourraient être infectées d'une manière chronique et que l'excrétion vaginale serait limitée à deux mises bas successives (Hachette *et al.*, 2001). Au cours d'une étude très récente (manuscrit en préparation) d'un épisode abortif de fièvre Q, nous avons montré dans un autre troupeau caprin que des chèvres pouvaient avorter et excréter *C. burnetii* pendant deux mises bas successives. En effet, les prélèvements du mucus vaginal et du lait ont été réalisés le jour de la mise bas contrairement à l'étude présenté ici où les prélèvements ont été effectués longtemps après (deux à quatre semaines). Ce délai pourrait diminuer les chances de détecter la bactérie et *C. burnetii* ne pourrait être identifiée comme l'agent infectieux.

Au cours de cette investigation, il est apparu que la fièvre Q chez les caprins, comme chez les ovins, est caractérisée par une persistance de plusieurs mois des anticorps dans le sérum des animaux infectés (Berri *et al.*, 2001, 2002). Les chèvres sérologiquement positives ont eu soit des problèmes de reproduction, soit des mises normales. Même si le test ELISA est une technique sensible et spécifique, le diagnostic sérologique de la fièvre Q chez les petits ruminants reste très compliqué et n'est pas, à lui seul, approprié. En effet, des animaux peuvent réaliser une seroconversion sans pour autant avorter ou peuvent aussi rester longtemps sérologiquement positifs alors que l'infection aiguë s'est dissipée (Paiba *et al.*, 1999 ; Berri *et al.*, 2002). De plus, des animaux peuvent être sérologiquement négatifs tout en excréant la bactérie au niveau vaginal (Berri *et al.*, 2002, 2004). Il est donc important d'améliorer le test ELISA et de développer des outils sérologiques nouveaux qui permettent de distinguer entre les différentes réponses.

La ferme caprine étudiée au cours de ce travail commercialise du lait cru et des produits dérivés. Il est donc important d'évaluer l'excrétion de *C. burnetii* dans du lait afin d'éviter la contamination humaine. L'analyse en PCR a montré la présence de la bactérie dans du lait prélevé à partir de plusieurs chèvres qui ont avorté ou qui ont mis bas des chevreaux mort-nés. L'excrétion peut persister longtemps au cours de la lactation. Curieusement les chèvres n'excrètent plus de *coxiella* à la mise bas suivante même si les animaux sont encore sérologiquement positifs. Au début de la lactation, 21 chevrettes ont été régulièrement nourries avec du lait de tank composé essentiellement des pools P1 et P2 testés positifs en PCR. Cependant, seulement 3 chevrettes ont présenté une séroconversion en ELISA. Ainsi la question de la contamination digestive par l'intermédiaire de l'ingestion du lait cru ou ses produits dérivés reste encore ouverte.

CONCLUSION

Après une période de 15 mois d'investigation, cette étude a conduit à la conclusion que la dissémination de *C. burnetii* dans un troupeau de chèvres primipares, naïves et indemne de fièvre Q pourrait provoquer des avortements associés à une excrétion importante de la bactérie à la première mise bas. Les animaux ayant avorté présenteraient une gestation normale par la suite, même si la bactérie persiste.

La réponse en anticorps vis à vis de *C. burnetii* est élevée et persiste pendant plusieurs mois. Ceci pourrait être potentiellement associé à une protection potentielle contre la fièvre Q.

L'analyse moléculaire en PCR a montré que dans ce cheptel les chèvres ont excrété des coxiella dans du lait pendant plusieurs mois après la mise bas. Cette excrétion pourrait être limitée à la première mise bas.

- Babudieri B., 1959.** Adv. Vet. Sci., 5, 81-182
- Berri M., Laroukau K., Souria A., Rodolakis A. 2000.** Vet., Microbiol., 72, 285-293
- Berri M., Souriau A., Crosby M., Crochet D., Lechopier P., Rodolakis A., 2001.** Vet. Rec., 148, 502-505
- Berri M., Souriau A., Crosby M., Rodolakis A., 2002.** Vet. Microbiol., 85, 55-60
- Berri M., Arricau-Bouvery N., Rodolakis A., 2003a.** Methods. of Mol. Biol., 216, 153-61
- Berri M., Rousset E., Champion J., Arricau-Bouvery N., Russo P., Pepin M., Rodolakis A. 2003b.** Vet. Rec., 153, 269-270
- Berri M., Crochet D., Santiago S., Rodolakis A. 2004.** Vet. Rec. (In presss)
- Fishbein D.B., Raoult D. 1992** Am. J. of Trop. Med. 47, 35-40
- Hachette T., Hudson R., Schezch W.F., 2001.** Emerg. Infect. Dis., 7, 413-419
- Lang G. H., 1990.** Q fever: The disease. Vol 1. Ed T.J. Marrie. Boca Raton, CRC Press, pp 24-42
- Marrie T., Raoult D., 1997.** International J. of Antimicrobial Agents 8, 145-161
- Paiba G., Green L., Lloyd G., Patel D., Morgan K. 1999.** Vet. Rec., 144, 519-522
- Raoult D., Marrie T., 1995.** Clin. Infect. Dis., 20, 489-496
- Salmon M., Howells B., Blencross E., Evans A., Palmer S. 1982.** Lancet i, 1002-1004