

Etude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique

N. ARRICAU-BOUVERY, A. SOURIAU, A. MOUTOUSSAMY, K. LADENISE, A. RODOLAKIS
INRA, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie, 37380 Nouzilly

RESUME – *Coxiella burnetii* est responsable de la fièvre Q, zoonose provoquant l'avortement des ruminants. Afin de mieux connaître le mode d'excrétion et la durée de l'excrétion de *Coxiella* par des chèvres, une infection expérimentale caprine a été réalisée à l'unité PII de l'INRA de Tours-Nouzilly. Des chèvres, à 90 jours de gestation, ont été inoculées avec $2,5 \cdot 10^8$, $2,5 \cdot 10^6$ ou $2,5 \cdot 10^4$ *Coxiella* par injection sous-cutanée. Des prélèvements de sang ont été réalisés périodiquement et l'apparition des anticorps anti-*Coxiella* a été recherché à l'aide de la technique ELISA. Des fèces, des sécrétions vaginales, du lait, des liquides et organes de fœtus et des cotylédons de placenta ont été prélevés, et la recherche de *Coxiella* a été réalisée par PCR et immunofluorescence indirecte. Des lisiers contaminés artificiellement par *C. burnetii* ou provenant de la bergerie de l'unité PII ont été traités avec de la cyanamide calcique. L'infection par *C. burnetii* a provoqué l'avortement des chèvres et l'excrétion de la bactérie dans le placenta, dans les sécrétions vaginales pendant plusieurs jours, et dans les fèces et le lait durant plusieurs semaines. La majorité des fœtus étaient également contaminés par la bactérie. Onze chèvres sur 19 ont avorté et excrété des *Coxiella* en ayant un titre sérologique négatif en ELISA. L'utilisation de la cyanamide calcique pour décontaminer les lisiers a montré qu'une dose de 0,4% était efficace au bout d'une semaine à 20°C.

Study of *Coxiella burnetii* excretion in an experimental goat model and decontamination of dung with calcium Cyanamid

N. ARRICAU BOUVERY, A. SOURIAU, A. MOUTOUSSAMY, K. LADENISE, A. RODOLAKIS
INRA, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et d'Immunologie, 37380 Nouzilly

SUMMARY – *Coxiella burnetii* is the causative agent of Q fever, a zoonosis that occurs worldwide. A caprine experimental infection was made in the Tours-Nouzilly INRA PII unit to better know the way and the time of *Coxiella* excretion by goats. Goats were inoculated subcutaneously with $2,5 \cdot 10^8$, $2,5 \cdot 10^6$ or $2,5 \cdot 10^4$ bacteria at the 90th day of their reported pregnancy. The seroprevalence of *C. burnetii* infection was studied by using an ELISA. Detection of *C. burnetii* in feces, vaginal swabs, milk, liquids and organs of fetuses and placentas was performed by using PCR and the indirect immunofluorescence assay. Dung contaminated with *C. burnetii* was treated with calcium Cyanamid. During the experimentation the goats aborted and shed *Coxiella* in their placenta, in their vaginal swabs during several days, and in their feces and milk during several weeks. Most of the fetuses were contaminated by the bacterium. The ELISA test failed to detect 11 of the 19 goats aborting and shedding *Coxiella*. A dose of 0,4% of calcium Cyanamid during one week at 20°C was sufficient to decontaminated the dung.

INTRODUCTION

Coxiella burnetii est responsable de la fièvre Q, zoonose dont les manifestations cliniques varient selon l'hôte infecté. Chez les animaux domestiques (bovins, caprins, ovins) elle provoque des avortements, des problèmes d'infertilité ou de métrites. Les ruminants, les animaux sauvages mais aussi la tique, arthropode vecteur, servent de réservoir (Baca et Paretsky, 1983). Les animaux domestiques, et en particulier les chèvres, sont considérés comme le principal réservoir de transmission de la maladie à l'homme. La voie de contamination prépondérante est la voie aérienne (excrétion lors des avortements, des mise-bas, litières ou fumiers contaminés) mais l'ingestion de lait cru ou de fromage au lait cru pourrait être contaminant, cependant son importance reste à préciser (Fishbein et Raoult, 1992). Il existe une réglementation qui interdit la commercialisation du lait cru de troupeaux infectés par la fièvre Q. Or, l'excrétion par les ruminants n'est pas bien définie en terme de durée, de fréquence et d'intensité. Une infection expérimentale caprine a donc été réalisée afin d'étudier les voies et la durée de l'excrétion de la bactérie. L'étude de la décontamination des lisiers infectés a été réalisée avec la cyanamide calcique.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. EXPÉRIMENTATION ANIMALE

Huit, 9 ou 8 chèvres diagnostiquées gestantes, provenant d'élevages indemnes de fièvre Q (sérologies négatives), ont été inoculées à 90 jours de gestation respectivement avec $2,5 \cdot 10^8$, $2,5 \cdot 10^6$ ou $2,5 \cdot 10^4$ *Coxiella burnetii*, souche CbC1. Cette souche provient d'un placenta de chèvre, ayant avorté naturellement de fièvre Q. Elle a été isolée sur souris et cultivée sur œufs embryonnés par 3 passages consécutifs.

Des prélèvements de sang et de fèces ont été réalisés périodiquement à partir de l'inoculation. Lors des mise-bas, des cotylédons ont été récupérés sur le placenta. Les fœtus ont été autopsiés (rate, fragment des poumons, foie, de l'ombilic, liquides péritonéaux et gastriques). Des sécrétions vaginales et du lait ont été prélevés régulièrement après la mise-bas. Tous les prélèvements ont été congelés à -80°C avant d'être analysés.

1.2. TRAITEMENT DES PRÉLÈVEMENTS

Le sérum a été récupéré et analysé avec un kit ELISA commercial (CHEKIT ; Hoechst Roussel Vet). Les résultats sont exprimés en pourcentage du sérum contrôle positif. Les valeurs inférieures à 40% sont considérées comme négatives, comprises entre 40 et 50% comme douteuses, supérieures à 50% comme positives. Les sécrétions vaginales récoltées par des écouvillons ont été reprises dans 1,5 ml d'eau physiologique, bouillies pendant 10 min, puis analysées directement par PCR. L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit QIAmp Tissue kit 250 (Qiagen S.A., France) pour les autres échantillons. Trois crottes, prélevées dans le rectum, ont été lavées avec 3 ml d'eau physiologique et le liquide récolté a été analysé. Les prélèvements fœtaux ont été broyés dans de l'eau physiologique avant analyse.

Des empreintes de cotylédons placentaire, d'organes et de liquides fœtaux ont été réalisées sur lame, fixées au moins 30 min dans de l'acétone à 100% à température ambiante et testées en immunofluorescence indirecte (IFI) avec des anticorps de souris dirigés contre *Coxiella* et des anticorps anti-Ig de souris couplés à la FITC.

1.3. DÉCONTAMINATION DES LISIERS PAR LA CYANAMIDE CALCIQUE

Des lisiers provenant de la bergerie de l'unité expérimentale PII ont été, soit artificiellement contaminés avec *C. burnetii*, soit prélevés après les avortements, traités avec 0,2%, 0,4% ou 0,6% de cyanamide calcique ou du tampon carbonate et laissés 1 ou 3 semaines à température ambiante (20°C) ou à 4°C . Ces lisiers ont ensuite été inoculés à des souris OF1 âgées de 8 semaines et 9 jours plus tard leur rate a été prélevée et congelée à -80°C . Ces rates ont été broyées dans de l'eau phy-

siologique et la présence de *Coxiella* été recherchée par PCR sur l'ADN génomique extrait à l'aide du kit QIAmp Tissue kit 250 (Qiagen S.A., France).

1.4. PCR

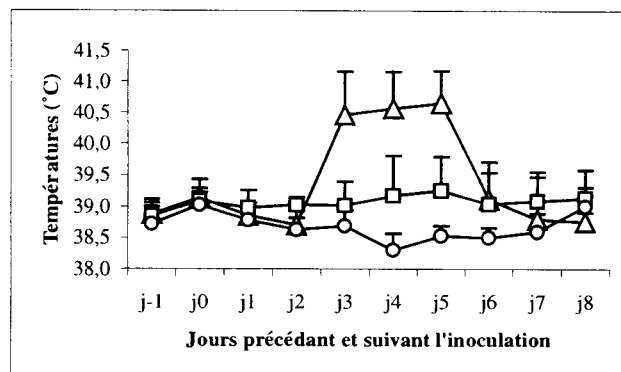
La PCR a été réalisée selon le protocole décrit précédemment (Berri *et al*, 2000) avec quelques modifications : l'amplification s'effectue, après une dénaturation à 94°C durant 5 min, en 35 cycles avec dénaturation 30 sec à 94°C , hybridation 1 min à 60°C et élongation 2 min à 72°C , suivie d'une élongation de 10 min à 72°C . Elle permet l'amplification d'un fragment de gène de 687 paires de base (pb). Ce gène code pour une transposase et est localisé sur un élément d'insertion présent une vingtaine de fois sur le génome de *Coxiella*.

2. RESULTATS

2.1. RÉPONSE CLINIQUE DES CHÈVRES APRÈS INOCULATION DE COXIELLA BURNETII

Les températures rectales observées ont montré, pour le lot 1 (chèvres inoculées avec $2,5 \cdot 10^8$ bact/ml) une forte élévation de température dès le 3^{ème} jour suivant l'inoculation, une réponse hétérogène pour le lot 2 (chèvres inoculées avec $2,5 \cdot 10^6$ bact/ml) et aucune augmentation pour le lot 3 (chèvres inoculées avec $2,5 \cdot 10^4$ bact/ml) (Figure 1). Dans le lot 2, 5 chèvres sur 9 ont eu une température durant un ou deux jours au delà de $39,5^\circ\text{C}$.

Figure 1
Courbes des températures des chèvres prises le jour précédent l'inoculation (j-1), le jour de l'inoculation (j0) et les jours suivants (j1 à j8). Les chèvres du lot 1 sont représentées par des triangles, celles du lot 2 par des carrés et celles du lot 3 par des cercles



Quelque soit la dose inoculée, toutes les chèvres ont avorté entre 12 et 48 jours après l'inoculation, soit entre 102 et 138 jours de gestation (tableau 1), en deux vagues d'avortements (centrée sur 29 et 43 jours). Cependant, 2 chèvres du lot 1, 3 chèvres du lot 2 et 1 chèvre du lot 3 n'ont pas mis-bas. L'avortement de la chèvre 132, 12 jours après inoculation, a certainement été provoqué par une forte fièvre consécutive à l'inoculation de $2,5 \cdot 10^8$ bact/ml.

2.2. RÉPONSE SÉRIQUE

L'apparition des anticorps dans le sang est assez tardive, de 39 jours à 46 jours après l'inoculation (figure 2). Toutes les chèvres qui ont avorté atteignent le seuil de positivité 2 mois après l'inoculation, soit 1 mois après les premiers avortements. Parmi celles qui n'ont pas mis-bas, une chèvre du lot 2 a un taux de 44% au bout de 46 jours après inoculation et une chèvre du lot 3 a un taux inférieur à 40% durant toute l'expérimentation.

2.3. CONTAMINATION DES PLACENTAS ET DES FŒTUS

En IFI, la détection des bactéries montre que tous les placentas sont contaminés par *C. burnetii*, excepté pour la chèvre 132. Les fœtus des prélèvements des fœtus les plus fréquemment infectés sont le cordon ombilical et le poumon. Par PCR, 18 fœtus sur 19 du lot 3 sont retrouvés positifs. Le liquide

ponctionné dans la cavité péritonéale est le plus fréquemment infecté (15/16) et le liquide gastrique (13/19) donne toujours une réponse très forte.

Tableau 1
Gestation des chèvres

N° chèvres	avortement nbre de jours après inoc.	durée de gestation	nombre de chevreaux	poids (kg) des chevreaux
lot 1				
41	29	119	2	2 - 1,5
54	48	138	1	2,5
98	29	119	3	1,1 - 1,4 - 0,2
132	12	102	1	0,3
142	31	121	2	1,7 - 1,3
160	43	133	1	1,8
lot 2				
48	29	119	2	1,7 - 1,8
61	25	115	4	1 - 1 - 1,2 - 0,7
106	48	138	2	1,8 - 1,6
136	46	136	3	1,6 - 1,6 - 1,8
144	43	133	3	1,8 - 1,4 - 1
179	48	138	1	1,8
lot 3				
50	29	119	3	1 - 1,4 - 1,6
71	40	130	2	2,6 - 2
90	27	117	5	1,4 - 1,4 - 1,3 - 1,5 - 1,6
96	41	131	2	2,6 - 2,7
131	29	119	2	2,2 - 1,9
141	44	134	3	1,4 - 2 - 1,9
158	28	118	2	2 - 1,5

Tableau 2
Excrétion de *Coxiella burnetii* dans les fèces
à partir du jour d'inoculation (j0)

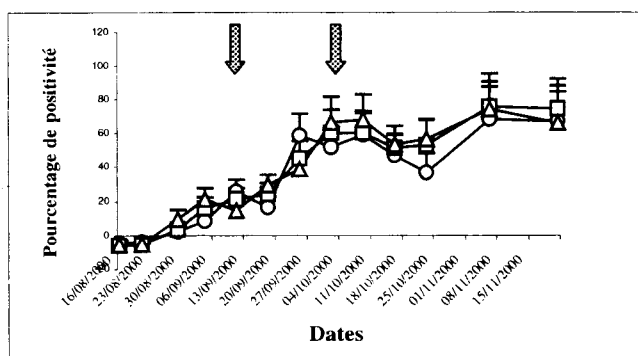
	j0	j11	j25	j33	j39	j46	j53	j60	j67	j81
lot 1										
positifs	0	0	1	3	3	5	5	2	0	0
négatifs	8	8	7	5	5	3	3	6	8	8
lot 2										
positifs	0	0	2	2	4	4	6	4	2	0
négatifs	9	9	7	7	5	5	3	5	7	9
lot 3										
positifs	0	0	4	1	5	4	8	3	1	0
négatifs	8	8	4	7	3	4	0	5	7	8

Tableau 3
Excrétion de *Coxiella burnetii* dans les sécrétions vaginales
à partir de la mise-bas (MB)

	MB	J1	J2	J3	j5-j10	j11-j15
Lot 1						
positifs	5	5	3	1	0	0
négatifs	0	0	2	3	5	2
Lot 2						
positifs	6	6	6	6	4	1
négatifs	0	0	0	0	1	3
Lot 3						
positifs	7	6	7	6	3	0
négatifs	0	1	7	0	3	5

Quelque soit le lot, tous les prélèvements de lait sont positifs le jour de la mise-bas, sauf pour la chèvre 132 qui n'excrète que tardivement (27 à 32 jours après la mise-bas). L'excrétion la plus tardive détectée est à 52 jours après la mise bas. Comme les chèvres n'ont pas été traitées, les prélèvements ne sont pas représentatifs d'un lait de lactation (mais d'une mamelle tarie).

Figure 2
Cinétique d'apparition des anticorps (ELISA).
Les chèvres du lot 1 sont représentées par des triangles,
celles du lot 2 par des carrés et celles du lot 3 par des cercles.
Les flèches verticales grises représentent le moment
des deux vagues d'avortements



2.4. EXCRÉTION DE *COXIELLA* DANS LES FÈCES, LE LAIT ET LES SÉCRÉTIONS VAGINALES

Toutes les chèvres qui ont avorté ont excrété. L'excrétion fécale de *C. burnetii* a débuté 25 jours avant la mise-bas pour 2 chèvres du lot 2 et est discontinuée pour un tiers des chèvres. Pour la majorité des chèvres, elle débute au moment des mise-bas ou quelques jours avant (tableau 2). La chèvre 132 a excrété pendant une quinzaine de jours des *Coxiella* (46 jours après l'inoculation, soit 34 jours après avortement). Parmi les chèvres n'ayant pas mis-bas, aucune excrétion n'a pu être mise en évidence pour 1 chèvre du lot 1 et 2 chèvres du lot 2, les autres ont excrété dans un ou plusieurs prélèvements.

Toutes les chèvres ont excrété dans les sécrétions vaginales, excepté la chèvre 132 qui est restée négative après l'avortement. L'excrétion apparaît dès la mise-bas et la détection des *Coxiella* devient négative entre 5 et 15 jours plus tard (tableau 3).

2.5. DÉCONTAMINATION DES LISIERS PAR LA CYANAMIDE CALCIQUE

La cyanamide calcique supprime l'infectivité des *Coxiella* pour la souris. Comme le montrent les résultats obtenus par PCR (figure 3), *C. burnetii* n'est plus détecté dans les rates de souris infectées avec les lisières contaminés et traités avec 0,6 % de cyanamide calcique ou avec 0,4 % de cyanamide calcique pendant une semaine à 20°C. Lorsque les lisières contaminés ont été traités soit avec 0,2 % de cyanamide calcique ou avec du tampon carbonate, des *Coxiella* sont détectées en PCR dans les rates de souris, ce qui montre la présence de bactéries infectieuses au sein de ces lisières.

Les lisières de l'unité expérimentale, traités avec 0,4% de cyanamide calcique pendant 3 semaines, sont non infectieux pour la souris.

3. DISCUSSION

Cette infection expérimentale caprine a montré que quelque soit la dose inoculée aux chèvres (de 10^8 à 10^4 bactéries/ml), celles-ci ont avorté et excrété dans les placentas, sécrétions vaginales, laits et fèces. Les fœtus du lot inoculé avec $2,5 \cdot 10^4$ *Coxiella* sont fortement contaminés ce qui suppose la multiplication de la bactérie. L'utilisation de la technique de PCR avec les amorces Trans1 et Trans 2, méthode sensible et spécifique (Berri *et al.*, 2000), nous a permis de détecter la présence de bactéries dans les différents prélèvements sans avoir recours à la culture des *Coxiella*, méthode longue et délicate. La réponse sérologique des chèvres, donnée par CHEKIT FQ, apparaît 5 semaines après l'inoculation. Ainsi 11 chèvres sur 19 ont avorté et excrété des *Coxiella* en ayant un titre sérologique négatif. Des résultats similaires avaient été retrouvés dans le troupeau ovin de l'unité PII de l'INRA (Berri *et al.*, 2001) où 2 brebis avaient avorté de fièvre Q suite à une infection naturelle. L'étude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* et de la sérologie chez 34 brebis a montré l'absence de corrélation entre

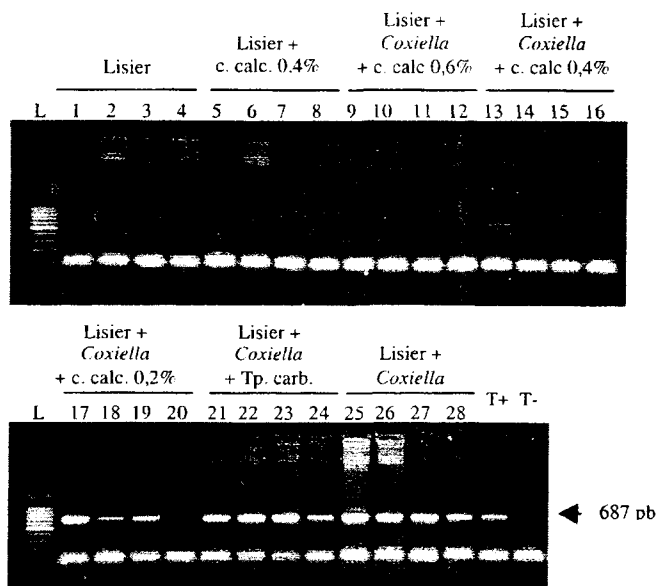
l'excrétion et la positivité sérologique. En effet, 8 brebis ont excrété des bactéries à la mise-bas tout en ayant une sérologie négative, et 2 d'entre elles excrétaient encore deux mois plus tard dans les sécrétions vaginales. Cette étude a également montré que 6 brebis n'ont pas excrété de *Coxiella* après la mise-bas mais leur sérologie était positive. Ainsi, le diagnostic des troupeaux infectés par sérologie ne serait possible que dans le cas d'infection ancienne. La recherche, par PCR, de la présence de la bactérie dans le lait pourrait être entreprise sur les troupeaux laitiers pour détecter les élevages à risque. Dans les fèces, elle peut être réalisée sur tout les animaux quelques soit leur état physiologique.

Figure 3

Détection de *C. burnetii* par PCR dans les rates de souris inoculées avec des lisiers contaminés artificiellement avec *Coxiella*. Puits L : taille des fragments (pb) ;

Puits 1, 5, 9, 13, 17, 21 et 25 : traitement 1 semaine à 4°C ;
 Puits 2, 6, 10, 14, 18, 22 et 26 : traitement 1 semaine à 20°C ;
 Puits 3, 7, 11, 15, 19, 23 et 27 : traitement 3 semaine à 4°C ;
 Puits 4, 8, 12, 16, 20, 24 et 28 : traitement 3 semaine à 20°C.

T+ et T- sont les témoins positifs et négatifs de la PCR



La contamination aérienne lors d'inhalation d'aérosols contaminés provenant des mise-bas, des fumiers ou des lisiers est la principale source de contamination chez l'homme. Or, les ruminants infectés excrètent abondamment des *Coxiella* et contaminent les litières et les lisiers. La cyanamide calcique, efficace contre les *Salmonella* et les *Listeria* (Marly *et al*,

1995), utilisé à 0,5% peut être un désinfectant efficace contre les *Coxiella* aisément utilisable dans les étables, bergeries, prairies, etc. Notons aussi que l'élévation seule du pH ne suffit pas à inactiver les *Coxiella*.

La transmission de la fièvre Q par la voie orale par le lait n'est pas à négliger pour la santé publique même si elle est moins efficace que par la voie aérienne. La dose infectieuse est de 2 bactéries chez le cobaye et la souris (Ormsbee *et al*, 1978) et inférieure à 10⁴ pour la chèvre dans notre expérience. Cette bactérie hautement infectieuse est un danger pour l'homme dont les défenses immunitaires sont déficientes (Raoult *et al*, 2000). L'excrétion dans le lait par des chèvres, des brebis (Berri *et al*, 2001) et des vaches (Lorenz *et al*, 1998) est décrite. En France, l'incidence sérologique sur la population a déjà été montrée (Fishbein et Raoult, 1992). La mise en place d'une prophylaxie passant par l'utilisation d'un vaccin supprimant l'excrétion est une voie pour réduire l'incidence de la maladie. Cependant, les vaccins commercialisés en France sont constitués de bactéries inactivées en phase II, qui diminuent les signes cliniques mais n'empêchent pas l'excrétion de bactéries virulentes, notamment dans le lait (Fishbein et Raoult, 1992). Avec ce modèle caprin nous pouvons maintenant, tester les vaccins et vérifier expérimentalement l'efficacité d'un vaccin constitué de *Coxiella* inactivées en phase I, qui donnent des résultats cliniques intéressants.

CONCLUSION

Les résultats obtenus lors de cette infection expérimentale réalisée à mi-gestation nous ont permis de montrer l'excrétion de *Coxiella burnetii* suite à une infection. La cyanamide calcique est un décontaminant efficace des *Coxiella* dans le lisier et son utilisation pour des fumiers ou litières devrait être étudiée.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'unité expérimentale de la PII et plus particulièrement toute l'équipe de la zone confinée pour sa participation active à cette étude.

Baca O. and D. Paretsky. 1983. Microbiol Rev 47: 127-149.

Berri M., Laroucau M. and A. Rodolakis. 2000. Vet Microbiol 72: 285-293.

Berri M., Souriau A., Crosby M., Crochet D., Lechopier P. and A. Rodolakis. 2001. Vet Rec 148: 502-505.

Fishbein DB, D. Raoult. 1992. Am J Trop Med Hyg 47: 35-40

Lorenz H., Jager C., Willems H. and G. Balger. 1998. Applied Env Microbiol 64: 4234-4237.

Marly J., Vallet A., P. Pardon. 1995. Renc Rech Ruminants 2:307-310.

Raoult D., Tissot-Dupont H., Foucault C., Gouvernet J., Fournier P. E., Bernit E., Stein A., Nesri J. R. and Weiller P. J. 2000. Medicine 79: 109-123.

Ormsbee R., Peacock M., Gerloff R., Tallent G. and D. Wike. 1978. Infect Immun 19(1) : 239-245.