

ECOLE DOCTORALE : BIOLOGIE SANTE NANTES ANGERS

THESE

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur d'Oniris
Sous le label de l'Université de Nantes Angers Le Mans
Discipline Biologie, médecine, santé
Spécialité Recherche Clinique, innovation technologique, santé publique

Soutenue le 15 mai 2012

Anne-Frieda TAUREL

EVALUATION DE L'EFFICACITE DE MESURES MEDICALES POUR LA MAITRISE DE L'INFECTION PAR *COXIELLA BURNETII* EN TROUPEAUX BOVINS LAITIERS

Directeur de thèse : **M. François BEAUDEAU, Professeur, Oniris-INRA, Nantes**
Co Encadrant : **M. Raphaël GUATTEO, Maître de conférences, Oniris-INRA, Nantes**

Rapporteurs :

Mme Sylvie CHASTANT, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse
M. Nicolas ROSE, Ingénieur de recherche, Anses, Ploufragan

Membres du jury :

M. Mustapha BERRI, Ingénieur de recherche, INRA, Nouzilly
M. Yves MILLEMANN, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire, Maisons Alfort

Préambule

Le travail présenté dans cette thèse est issu d'une collaboration entre les Groupements de Défense Sanitaire du Grand Ouest et l'UMR Oniris-INRA 1300 « Biologie Epidémiologie et Analyse Risque en santé animale» (BioEpAR). Les travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'UMR BioEpAR sous la direction de M. François Beaudeau, professeur à Oniris. Le co-encadrement a été réalisé par M. Raphaël Guatteo, maître de conférences à Oniris.

Les travaux ont été financés par

- le Ministère de l'Enseignement et de la Recherche et les Groupements de Défense Sanitaire du Grand Ouest dans le cadre d'un dispositif bourse CIFRE,
- l'UMR Oniris-INRA BioEpAR,
- la Direction Générale de l'Alimentation du MAAPRAT,
- le laboratoire CEVA Santé Animale,
- le GD (Animal Health Services) (Deventer, Pays-Bas).

Ils ont pu être réalisés grâce à la collaboration des éleveurs et des vétérinaires impliqués dans cette étude, de l'IDAC 44 (Loire-Atlantique), et de l'IDHESA Bretagne Océane (Finistère) pour les analyses biologiques.

Merci aux différents partenaires qui ont permis la réalisation des travaux présentés dans cette thèse.

Remerciements

Ce travail de thèse est le produit d'un travail collectif. Je tiens à remercier tous ceux qui y ont participé et tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidée à le mener jusqu'au bout dans les meilleures conditions.

Je remercie François Beaudeau mon directeur de thèse, pour ses nombreux conseils et sa disponibilité. Merci pour le temps qu'il m'a consacré au travers de nos nombreuses réunions et discussions, pour ses relectures, ses corrections, son écoute, ses encouragements et les connaissances qu'il m'a transmises pendant ces 3 ans.

Je remercie Raphaël Guatteo, mon co-encadrant. Merci pour ce joli cadeau de Noël 2008, une proposition de thèse! Je tiens à le remercier particulièrement pour sa générosité intellectuelle et humaine et pour cette énergie toujours positive qu'il sait si bien transmettre. Je le remercie d'avoir partagé ses connaissances avec autant de simplicité et de bienveillance.

Mille mercis à Alain Joly, vétérinaire au GDS56 et membre de l'UMT. Je le remercie d'avoir partagé ses connaissances avec moi, pour sa disponibilité et son humour. Merci pour toute l'aide et les conseils qu'il m'a apporté durant ces années de thèse.

Mes remerciements vont également aux membres du jury : Yves Millemann pour m'avoir fait l'honneur d'assurer la présidence du jury, Sylvie Chastant et Nicolas Rose pour avoir accepté de rapporter mes travaux et pour m'avoir proposé des retours sur la base d'une discussion scientifique constructive et Mustapha Berri pour son expertise dans les domaines traités.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Annie Rodolakis, Elodie Rousset, Elsa Jourdain et Yves Millemann. Merci pour leurs précieux conseils, leurs questions et les orientations qu'ils m'ont fait initier. Et merci pour leurs encouragements et leur bienveillance.

Je remercie tous ceux qui ont pris part à la réalisation de ces travaux. Merci aux éleveurs impliqués dans le protocole fièvre Q et aux personnels des GDS Grand Ouest pour tout le travail réalisé, sans eux, rien n'aurait été possible. Je remercie Jean-Yves Audiart, technicien à l'UMR BioEpAR, pour sa rigueur, sa constance et pour son aide qui a été indispensable. Je remercie Anne Lehebel, ingénieure de recherche à l'UMR BioEpAR pour sa disponibilité lors de nos réflexions enrichissantes menées dans la bonne humeur et il en a fallu face à mes données et aux nombreuses lignes de script associées. Merci pour ces échanges productifs et son aide (notamment sur les macros de SAS®). Je remercie Gaël Besseau, stagiaire vétérinaire, dont l'aide a été précieuse lors de ma première année de thèse.

Je tiens à remercier Henri Seegers pour sa bienveillance, ses conseils et pour la pertinence et la justesse de ses remarques. Merci pour cette attention portée à mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Nadine, Charlotte, Maud Co., Charlène, Nawel, Aurélien et Pierre. Merci pour tous ces bons moments que nous avons partagés au labo, à Nantes, en France et à l'étranger. Les années de thèses partagées avec eux sont passées extrêmement vite. Nous avons beau avoir refait le monde des milliers de fois, je ne m'en lasse pas et il y a encore matière à faire ! Je remercie tous les doctorants de l'UMR pour les bons

moments partagés au labo, dans le parc de la Chantrerie, en ville, chez les uns et chez les autres. J'ai une pensée particulière pour Maud Ch. et Charlène qui sont les suivantes sur la liste.

Je veux remercier les membres de l'équipe EPID mais également tous les membres de l'UMR BioEpAR que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant 3 ans et demi. Merci à Evelyne pour sa bonne humeur et son aide efficace et merci également à Sylvie et à Juliette ; merci à Lekan pour avoir mis fin aux supplices infligés par mon ancien ordinateur, Merci à Michel si efficace pour trouver des articles introuvables. Merci à ceux, très nombreux, avec qui j'ai partagé des conversations parfois sérieuses, souvent drôles, et toujours enrichissantes. Merci à vous tous d'avoir fait des ces 3 années de thèses des années aussi agréables et qui me laissent riche de connaissances et de bons souvenirs avec chacun de vous.

Je tiens à remercier l'ensemble de mes amis, de Lomé, Paris, Montpellier, Nantes et ailleurs, qui m'ont soutenue pendant ces 3 ans et demi. Merci pour vos encouragements, votre enthousiasme, vos conseils rassurants et votre écoute. Merci d'être de véritables bouffées d'air frais. Merci d'être des amis depuis tant d'années et de le rester malgré les kilomètres qui nous séparent si souvent. Je remercie en particulier Benji, Tatiana, Tanya, Sounia, Lina, Nana, Maguy, Sandra, le P5L3G1, le temps passe et vous êtes toujours aussi présents. Je remercie Roland, David, Kara et Jade, vous êtes la crème des affreux. Merci à Nathalie et à Muriel, pour tous ces bons moments partagés! Merci aux salseros de la casa canne, mon petit plaisir du mercredi soir qui a fait passer le temps plus vite.

Tous mes remerciements à ma famille, à ma grande famille, qui m'a permis d'arriver où j'en suis aujourd'hui. Merci à mes grands-parents, mes parents, mes tantes, mes oncles, mon frère, mes soeurs et mes cousins qui sont toujours présents dans les moments de joies comme dans les moments de doutes. Merci à ma mère pour sa sérénité, sa confiance et son soutien indéfectible.

Enfin, je remercie tout particulièrement Raphaël, mon précieux... Merci d'avoir été présent comme tu l'as été. Merci pour ton écoute et tes paroles qui sont souvent très justes. Merci de me soutenir et de croire en moi comme tu le fais.

Merci à toutes les personnes que j'ai croisées à Nantes où ailleurs, toutes ces belles rencontres, qui m'ont rendu fier de ce travail.

J'ai, pour finir, une pensée très particulière pour mon père et ma grand-mère qui ont toujours été moteur de mon envie de réussite. J'ai puisé mes forces du souvenir de votre regard et c'est avec toute ma gratitude que je vous dédie cette thèse.

Sommaire

Sommaire	1
Liste des figures.....	4
Liste des tableaux	5
Glossaire.....	7
CHAPITRE 1. Introduction générale	9
1. Contexte et enjeux.....	11
2. Bases pour la maîtrise de la fièvre Q.....	17
2.1. Caractéristiques d'intérêt de <i>Coxiella burnetii</i>	17
2.2. Sources et voies de transmission	18
2.3. Facteurs de risque d'infection par <i>Coxiella burnetii</i> en troupeaux de ruminants.....	20
3. Mesures de maîtrise en troupeau infecté	20
3.1. Mesures de maîtrise non médicale	20
3.1.1. Mesures à l'échelle individuelle.....	23
3.1.2. Mesures à l'échelle du troupeau et de l'environnement	23
3.1.3. Prévention de la réintroduction de <i>Coxiella burnetii</i>	24
3.2. Mesures de maîtrise médicale en troupeau infecté.....	26
3.2.1. Antibiothérapie.....	26
3.2.2. Vaccination.....	29
4. Objectifs généraux de la thèse.....	32
Références	34
CHAPITRE 2. Séroprévalences intra-troupeau et facteurs de variation	41
1. Résumé de l'article 'Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds'	43
2. Article 'Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds'	45
2.1. Abstract	45
2.2. Introduction	46
2.3. Materials and Methods	47
2.3.1. Herds	47
2.3.2. Data collection.....	48
2.3.3. Strategy of analysis	51
2.4. Results	52
2.4.1. Seroprevalences.....	52
2.4.2. Influence of management practices and herd characteristics	53
2.5. Discussion	55
2.6. Conclusion.....	58
Acknowledgements	59

References	60
3. Résumé de l'article 'Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of <i>Coxiella burnetii</i> in cows'	62
4. Short report 'Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of <i>Coxiella burnetii</i> in cows'	64
4.1. Abstract	64
4.2. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of <i>Coxiella burnetii</i> in cows	65
CHAPITRE 3. Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle.....	71
1. Résumé de l'article 'Effectiveness of vaccination and antibiotics to control <i>Coxiella burnetii</i> shedding around calving in dairy cows'	73
2. Article 'Effectiveness of vaccination and antibiotics to control <i>Coxiella burnetii</i> shedding around calving in dairy cows'	76
2.1. Abstract	76
2.2. Introduction	77
2.3. Material and methods	78
2.3.1. Herds and animals	78
2.3.2. Experimental design	78
2.3.2.1. Nature and allocation of treatments.....	78
2.3.2.2. Sample and laboratory analysis	79
2.3.3. Strategy of analysis	80
2.4. Results	81
2.5. Discussion	84
Acknowledgments.....	87
References	88
CHAPITRE 4. Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau.....	91
1. Introduction	93
2. Matériel et méthodes	96
2.1. Troupeaux et animaux	96
2.2. Protocole expérimental.....	96
2.2.1. Nature et allocation des traitements	96
2.2.2. Echantillons biologiques et analyse au laboratoire.....	97
2.2.3. Nature et rythme des prélèvements	97
2.3. Stratégie d'analyse	100
3. Résultats	104

3.1. Description des effectifs de troupeaux	104
3.2. Description de la charge mesurée dans les 4 types de prélèvements.....	105
3.3. Effet des stratégies médicales sur l'évolution de la charge bactérienne.....	109
3.3.1. Charge bactérienne mesurée dans le lait de tank.....	109
3.3.2. Charge bactérienne mesurée dans le lait de mélange de primipares	111
4. Discussion	112
Références	117
CHAPITRE 5. Discussion générale	121
1. Occurrence de l'infection par <i>Coxiella burnetii</i>	124
2. Facteurs de risque et mesures de maîtrise non médicale de l'infection par <i>Coxiella burnetii</i>	128
3. Efficacité des mesures de maîtrise médicale de l'infection par <i>Coxiella burnetii</i>	130
Conclusion générale	139
Annexes.....	141
Annexe 1 : 'Prevalence of <i>Coxiella burnetii</i> infection in domestic ruminants: a critical review'	143
Annexe 2 : 'Q fever within-herd seroprevalence in infected dairy herds : assessment using an ELISA applied to bulk tank milk' Poster SVEPM, Mars 2010, Nantes	159
Annexe 3 : 'Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds and implications for within-herd control' Poster One Health, Février 2011, Melbourne	160
Annexe 4 : 'Effectiveness of medical strategies combining antibiotics and vaccination to prevent <i>Coxiella burnetii</i> Shedding in infected dairy cows' Oral Communication, Mars 2012, Glasgow.....	161
RESUMÉ et MOTS CLÉS	178

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1- 1 : Sérums testés dans le cadre de suspicions de fièvre Q en France de 1985 à 2009 au Centre National de Référence de la fièvre Q et exemples de cas groupés humains répertoriés (flèches noires) (d'après (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005; Frankel et al., 2011)) 11

Figure 1- 2 : Nombre de cas de fièvre Q humains déclarés aux Pays-Bas entre 2007 et 2010 avec un début d'infection estimé par rapport à la semaine de début des symptômes (2007 n=168 ; 2008 n=1000 ; 2009 n=2355 ; 2010 n=208) (d'après (Roest et al., 2011)) 12

Figure 1- 3 : Evolutions naturelles possibles de la fièvre Q en absence de traitement chez l'Homme (d'après (Angelakis et Raoult, 2010))..... 14

CHAPITRE 2

Figure 2- 1 : Relationship between the apparent within-herd seroprevalence in cows and nulliparous females in 100 naturally infected dairy cattle herds..... 53

Figure 2- 2: Relationship between the ELISA S/P ratio of bulk tank milk and the within-herd seroprevalence seropositive milking cows in 55 naturally infected dairy herds..... 67

CHAPITRE 3

CHAPITRE 4

Figure 4- 1 : Procédure de prélèvement des poussières cumulées en bâtiments d'élevage à l'aide de Chiffonnette® 99

Figure 4- 2 : procédure de prélèvement des poussières renouvelées sur l'aire de vie des animaux dans l'élevage à l'aide de Stérisox®..... 99

Figure 4- 3 : Trajectoires correspondant aux évolutions favorables des résultats de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans les prélèvements d'un troupeau (0 : pas de bactérie ; 1 :1 à 100 bactéries par mL de lait ; 2 : plus de 100 bactéries par mL de lait) 101

Figure 4- 4 : Trajectoires correspondant aux évolutions défavorables des résultats de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans les prélèvements d'un troupeau (0 : pas de bactérie ; 1 :1 à 100 bactéries par mL de lait ; 2 : plus de 100 bactéries par mL de lait) 101

Figure 4- 5 : Diagramme de flux des effectifs de troupeaux pour l'analyse de la détection de *Coxiella burnetii* dans 4 types de prélèvements au niveau du troupeau 105

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau 1- 1 : Durée d'excrétion de <i>Coxiella burnetii</i> les plus longues rapportées dans le mucus vaginal, le lait et les fèces de ruminants durant le suivi de troupeaux naturellement ou expérimentalement infectés (d'après (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Guatteo et al., 2007b; Rodolakis et al., 2007))	19
Tableau 1- 2 : Facteurs à l'échelle de l'animal, du troupeau et de l'environnement associés à la prévalence de l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> dans des exploitations de ruminants domestiques.....	21
Tableau 1- 3 : Etudes d'évaluation de l'antibiothérapie pour la maîtrise de l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> chez les ruminants	28
Tableau 1- 4 : Efficacité de la vaccination pour maîtriser l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> chez les ruminants (plan d'étude et résultats).....	31

CHAPITRE 2

Table 2- 1 : Definition, mean and distribution of explanatory variables in herds.....	49
Table 2- 2 : Distribution of <i>Coxiella burnetii</i> within-herd seroprevalence, calculated for each herd, in the population of cows, of nulliparous females, and in the whole herd (100 naturally infected dairy herds).....	52
Table 2- 3: Results of analysis of variance for variables significantly ($P < 0.10$) associated with <i>Coxiella burnetii</i> within-herd seroprevalence in cows (PC)	54
Table 2- 4: Result of logistic regression for variables significantly ($P < 0.10$) associated with the <i>Coxiella burnetii</i> herd-status among nulliparous females (herds with no seropositive nulliparous females vs. herds at least one seropositive nulliparous females)	54
Table 2- 5: Variables significantly ($P < 0.05$) associated with within-herd seroprevalence of <i>C. burnetii</i> infection in milking cows of 55 naturally infected dairy herds	68

CHAPITRE 3

Table 3- 1 : Individual serological status and medical strategy received by cows according to their shedding level	82
Table 3- 2 : Risk of being detected shedder at calving time associated with cow characteristics and their medical strategy (883 dairy cows located in 22 herds clinically affected by <i>Coxiella burnetii</i> , mixed logistic regression).....	83
Table 3- 3 : Risk of being detected a level 21 and level 32 shedder cow, compared to level 13, associated with cow characteristics and modalities of vaccination (162 dairy cows located in 22 herds clinically affected by <i>Coxiella burnetii</i> , mixed logistic regression	84

CHAPITRE 4

- Tableau 4- 1 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de lait de tank en fonction du trimestre dans les troupeaux en stratégie A (vaccination) et B (vaccination et antibiothérapie) 107
- Tableau 4- 2 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de lait de tank en fonction du trimestre dans les troupeaux en stratégie C (antibiothérapie) et D (pas de traitement) 107
- Tableau 4- 3 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de lait de mélange de primipares en fonction du trimestre dans les troupeaux en stratégie A (vaccination) et B (vaccination et antibiothérapie) 108
- Tableau 4- 4 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de lait de mélange de primipares en fonction du trimestre dans les troupeaux en stratégie C (antibiothérapie) et D (pas de traitement)..... 108
- Tableau 4- 5 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de poussières cumulées dans les bâtiments (Chiffonnette®) et dans le prélèvement de poussières renouvelées sur l’aire de travail des animaux (Chiffonnette®) en fonction du trimestre et de la stratégie médicale appliquée dans le troupeau 109
- Tableau 4- 6 : Comparaison de la distribution de la charge (en classe) de *Coxiella burnetii* mesurée dans les prélèvements au trimestre 4 en fonction de la charge (en classe) mesurée au trimestre 1 110
- Tableau 4- 7 : Probabilité d’évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de tank de 74 troupeaux en fonction des stratégies médicales appliquées (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®). Seules les variables significativement associées au risque ou forcées sont présentées..... 110
- Tableau 4- 8 : Probabilité d’évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de tank de 74 troupeaux en fonction de la classe de la charge mesurée au trimestre 1, de la proportion d’animaux initialement séropositifs contribuant au tank à la date du prélèvement et du trimestre (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®)..... 111
- Tableau 4- 9 : Probabilité d’évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de mélange de primipares de 77 troupeaux en fonction des stratégies médicales appliquées (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®)..... 112
- Tableau 4- 10 : Probabilité d’évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de mélange de primipares de 77 troupeaux en fonction de la charge mesurée au trimestre 1, de la proportion d’animaux initialement séropositifs contribuant au lait de mélange de primipares à la date du prélèvement et du trimestre (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®) 112

Glossaire

AMM : Autorisation de mise sur le marché d'un médicament

ATU : Autorisation temporaire d'utilisation, autorisation permettant aux malades d'avoir un accès précoce aux médicaments avant ou hors AMM

BVD : Diarrhée bovine virale

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay, technique diagnostique qui permet de doser les anticorps dirigés contre une bactérie ou un virus

FC : test de fixation du complément

IA : Insémination artificielle

IFI : test d'immunofluorescence indirecte

IgG : immunoglobuline G

rt PCR : real time Polymerase Chain Reaction, réaction en chaîne par polymérisation suivie en temps réel

CHAPITRE 1

Introduction générale

1. Contexte et enjeux

En 1935, les travailleurs d'un abattoir à Brisbane en Australie sont atteints d'une fièvre de cause inconnue. À cette occasion, elle sera décrite pour la première fois par Edward Holbrook Derrick, et sera désignée en 1937 « Q Fever », Q de l'anglais « query » (Derrick, 1937). Franck MacFarlane Burnet sera le premier à observer l'organisme responsable de cette fièvre (Burnet and Freeman, 1937) et Herald Rea Cox à le caractériser et à l'isoler en 1938 (Cox, 1938; Davis and Cox, 1938). L'agent responsable de la fièvre Q sera nommé *Coxiella burnetii* en hommage à leurs travaux (Marrie and Raoult, 1997). *Coxiella burnetii* s'avèrera être un agent pathogène responsable d'une zoonose pouvant infecter de nombreux hôtes parmi les mammifères, les oiseaux et les arthropodes.

Quelques 70 ans plus tard, la fièvre Q a une répartition mondiale (Maurin and Raoult, 1999). La principale voie de contamination de l'Homme est l'inhalation d'aérosols contaminés (Maurin and Raoult, 1999) produits par les ruminants infectés (Tissot-Dupont et al., 2004; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005).

Jusqu'en 2006, les épisodes de fièvre Q observés chez l'homme sont principalement des cas groupés qui se produisent de façon sporadique, comme ceux observés par exemple en France (Figure 1- 1).

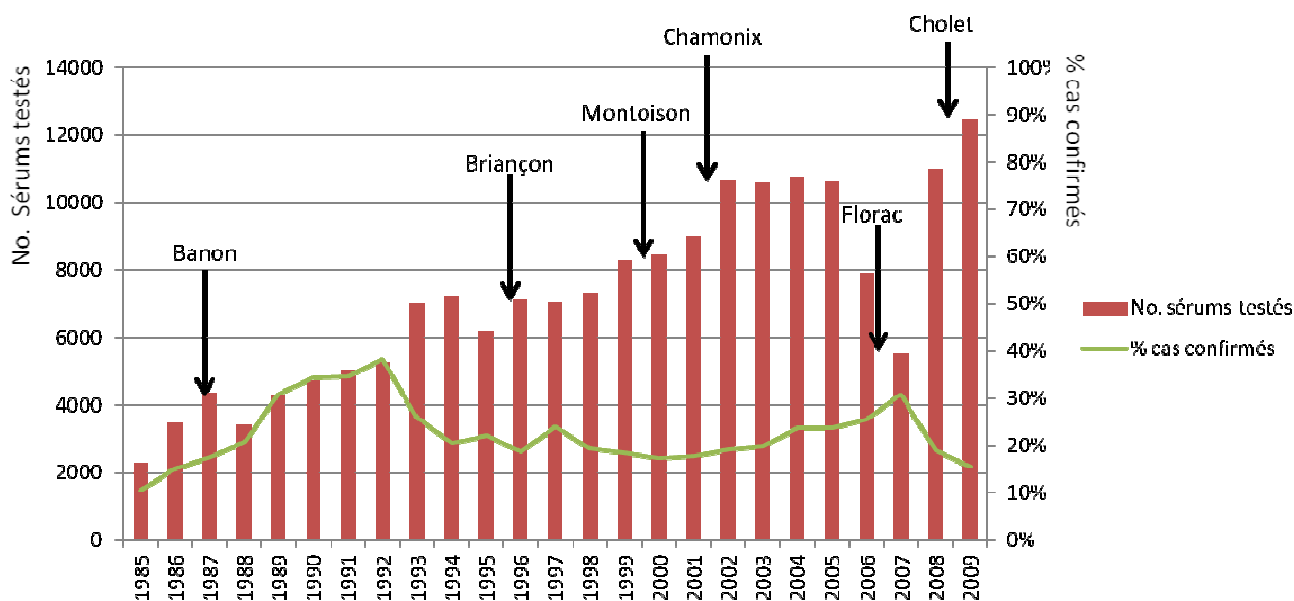


Figure 1- 1 : Sérums testés dans le cadre de suspicions de fièvre Q en France de 1985 à 2009 au Centre National de Référence de la fièvre Q et exemples de cas groupés humains répertoriés (flèches noires) (d'après (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005; Frankel et al., 2011))

En France, La fièvre Q est reconnue comme une maladie professionnelle dans le régime général et dans le régime agricole (AFSSA, 2004). Mais, comme dans la majorité des pays (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010), elle n'est pas soumise à déclaration obligatoire. Quelques cas humains sporadiques ont été rapportés et une étude du centre national de référence des rickettsioses (CNR, Marseille) menée entre 1985 et 2009 sur 179794 sérums envoyés dans le cadre de suspicion de fièvre Q, a montré qu'il y avait une augmentation du nombre de suspicions et du nombre de cas confirmés dans la population générale sur le territoire français (Frankel et al., 2011) (Figure 1- 1).

En 2007, pour la première fois des foyers humains sous forme d'épidémie apparaissent aux Pays-Bas (Figure 1- 2).

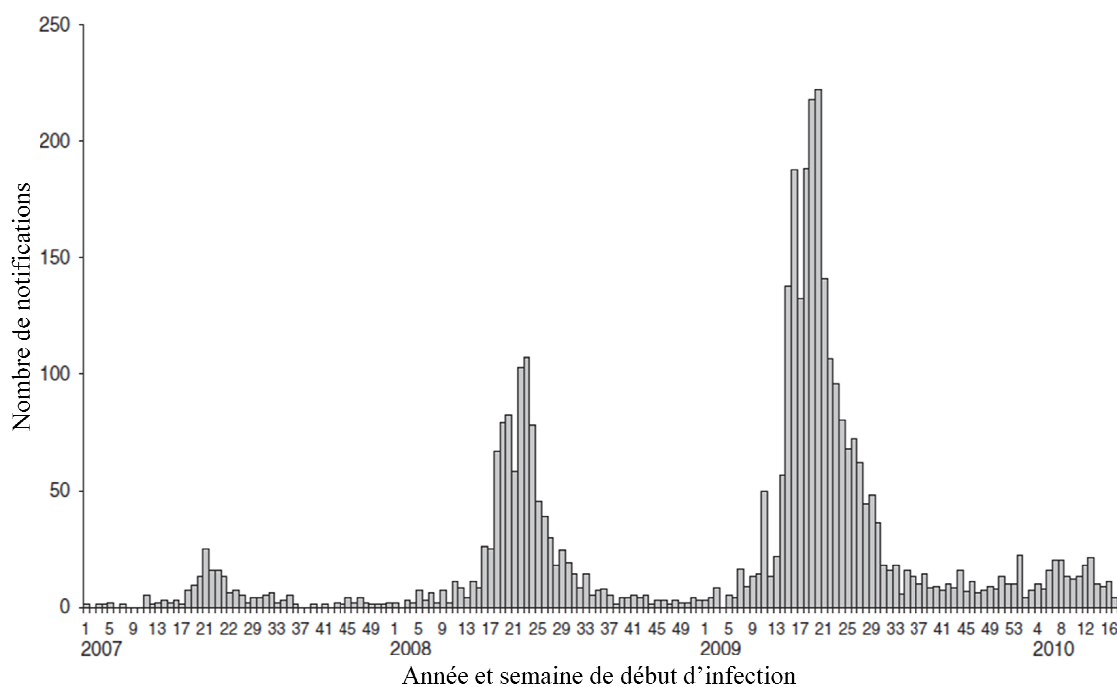


Figure 1- 2 : Nombre de cas de fièvre Q humains déclarés aux Pays-Bas entre 2007 et 2010 avec un début d'infection estimé par rapport à la semaine de début des symptômes (2007 n=168 ; 2008 n=1000 ; 2009 n=2355 ; 2010 n=208) (d'après (Roest et al., 2011))

Cet épisode épidémique illustre bien les enjeux liés à la fièvre Q (van der Hoek W et al., 2010) et ce cas mérite d'être plus amplement détaillé. Aux Pays-Bas, la fièvre Q est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1975. Jusqu'en 2007 jamais plus de 32 cas humains par an n'avaient été observés (Schimmer et al., 2009; Roest et al., 2011). À partir de 2007, une augmentation importante du nombre de cas humains a été constatée, allant de 168 cas en 2007 à 2355 cas en 2009 au pic de l'épidémie (Figure 1- 2) (Roest et al., 2011). La première

réponse face à cette recrudescence de cas humains a été la vaccination des troupeaux caprins, identifiés comme principale source d'infection, sur la base du volontariat en 2008, puis rendue obligatoire à partir de 2009 (Roest et al., 2011). Le stock de vaccins disponible étant insuffisant pour la totalité des troupeaux néerlandais, ces actions ont concerné les troupeaux caprins et ovins de plus de 50 animaux et les fermes publiques dans la province de Noord-Brabant, où les cas humains avaient été observés en 2007 (Roest et al., 2011). En 2009, la campagne de vaccination a été étendue aux troupeaux des provinces adjacentes (Roest et al., 2011). La décision a été prise d'euthanasier les femelles gestantes, considérées comme les animaux les plus à risque de transmission pour l'Homme, dans les élevages caprins et ovins détectés infectés. De plus, la mise à la reproduction des chèvres et brebis non gestantes a été interdite, les mouvements d'animaux et l'utilisation des effluents provenant de ces mêmes élevages ont été limités (Delsing et al., 2010). L'année qui a suivi ces décisions, en 2010, l'incidence de cas de fièvre Q humains a fortement diminué avec 208 cas enregistrés au 1er semestre (Roest et al., 2011). Au final, cette épidémie aura concerné plus de 3500 cas humains (dont 24 morts) et conduit à la réforme de plus de 50000 ovins et caprins aux Pays Bas entre 2007 et 2010. Elle est associée à un coût estimé entre 161 et 336 millions d'euros lié aux mesures de contrôle (médicale et non médicale), aux dédommagements versés aux éleveurs, et à l'investissement dans la recherche entre autres (Delsing et al., 2010; Anonymous, 2011; Guatteo, 2011; Anonymous, 2012a).

L'absence de déclaration obligatoire de la fièvre Q, en plus de ses signes cliniques non spécifiques, rendent difficile la mesure de sa prévalence ou de son incidence réelle en population humaine. Cependant, en France le CNR estime à 20 cas par million d'individus par an le nombre de cas d'infection de fièvre Q aiguë en l'absence d'épidémie (Frankel et al., 2011).

En effet, l'infection par *Coxiella burnetii* est caractérisée par son polymorphisme clinique. Chez l'Homme, si l'infection est asymptomatique dans 60% des cas, elle peut évoluer en infection aiguë ou chronique (**Figure 1- 3**). En France, en cas d'infection aiguë, les signes les plus souvent observés sont de la fièvre associée à des maux de tête, des myalgies, des arthralgies et de la toux (Angelakis and Raoult, 2010). D'autres symptômes sont également observés, tels que des signes pulmonaires (pneumonies atypiques) des hépatites, des troubles cardiaques, des lésions de la peau et des signes neurologiques (Angelakis and Raoult, 2010). Lors de l'épidémie aux Pays-Bas, le signe clinique le plus observé et à l'origine du plus grand nombre d'hospitalisations a été la pneumonie (Dijkstra et al., 2011). Les formes chroniques de

l'infection apparaissent principalement chez des personnes à risque, telles que les personnes immunodéprimées, les personnes ayant des lésions des valvules cardiaques, des anomalies vasculaires et les femmes enceintes. En cas d'infection chronique, les principaux symptômes observés en France sont des endocardites, des infections vasculaires et chez les femmes infectées pendant leur grossesse des avortements (100% en cas d'infection au 1^{er} trimestre), des naissances prématurées et des enfants chétifs à la naissance (Angelakis and Raoult, 2010). Lors de l'épisode épidémique néerlandais les signes cités précédemment n'ont pas été observés chez les femmes enceintes (van der Hoek et al., 2011).

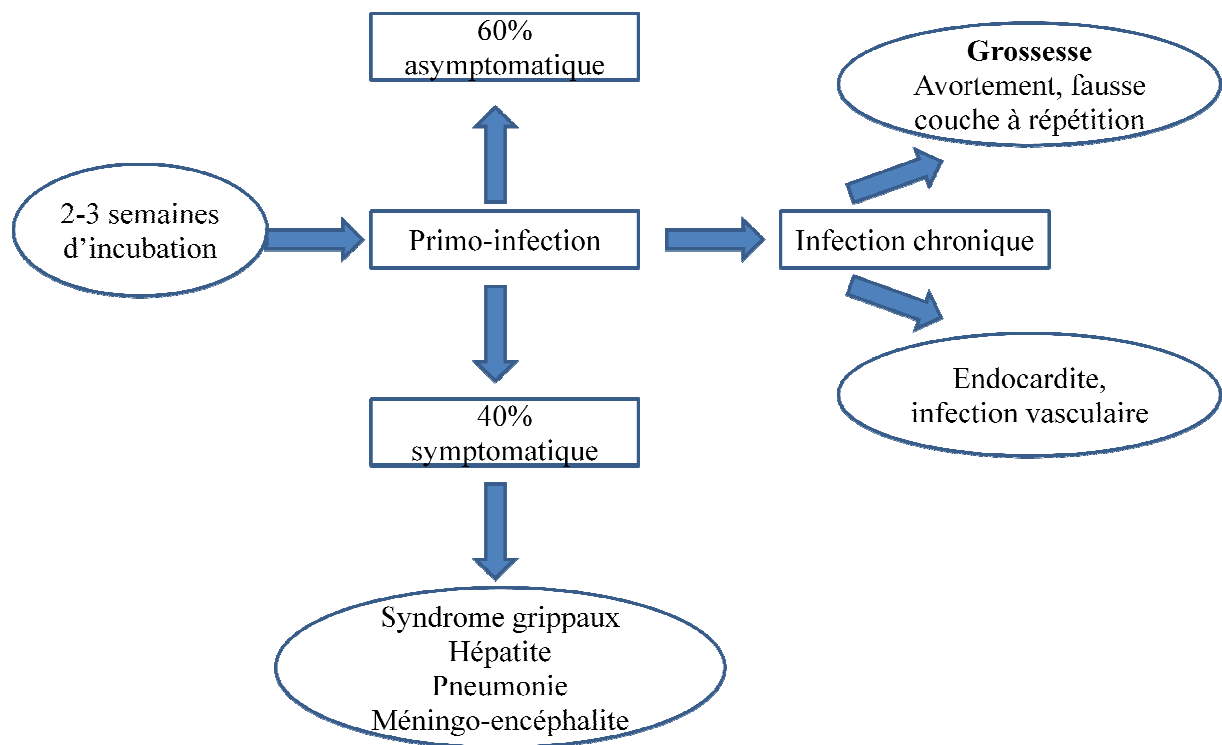


Figure 1- 3 : Evolutions naturelles possibles de la fièvre Q en absence de traitement chez l'Homme (d'après (Angelakis et Raoult, 2010))

Les facteurs de risque associés à l'infection par *Coxiella burnetii* sont dépendants de l'hôte, de l'environnement et des réservoirs. Le genre (masculin), l'âge (40-60 ans) et le statut fumeur ont été identifiés comme facteurs de risque dans les cas de fièvre Q aiguë chez l'Homme (Maurin and Raoult, 1999; Dijkstra et al., 2011). Les cas de fièvre Q sont observés de façon saisonnière (Frankel et al., 2011) en lien avec les vents forts, le temps sec et la proximité des ruminants (Maurin and Raoult, 1999; Tissot-Dupont et al., 1999; Tissot-Dupont et al., 2004; Taurel et al., 2012b). La voie de transmission principale étant la voie aérienne, le principal facteur de risque associé à l'infection chez l'Homme est la proximité avec des

ruminants, à travers l'activité professionnelle (métiers en contact avec les animaux tels que vétérinaires, éleveurs, personnels d'abattoirs,...), la proximité du lieu de résidence (Maurin and Raoult, 1999; Angelakis and Raoult, 2010), comme en atteste l'épidémie aux Pays-Bas (Schimmer et al., 2010) ou la répartition géographique des cas sous les vents (Tissot-Dupont et al., 1999; Tissot-Dupont et al., 2004).

En termes de santé animale, la fièvre Q est une maladie enzootique chez les ruminants. Mais aucune estimation fiable de la prévalence des animaux infectés n'est disponible. Sur la base des données disponibles dans la littérature la prévalence de troupeaux infectés dans le monde est estimée *a minima* à 38% et 25% chez les bovins et les petits ruminants respectivement, et la prévalence d'animaux infectés est estimée à 20% et 15% dans ces mêmes catégories d'animaux (Annexe 1 : Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review). Ces prévalences troupeaux et animales sont importantes mais sont associées à une forte variation liée à la conception des protocoles d'étude. L'infection étant asymptomatique dans la majorité des cas, la démarche diagnostique de fièvre Q n'est déclenchée qu'en cas de signes cliniques tels que les avortements. Ainsi, ces estimations proviennent pour la plupart d'études basées sur des échantillons de troupeaux avec avortements. Ce biais de sélection peut avoir pour conséquence des estimations de prévalence animale plus élevées que celles qui pourraient être observées dans la population générale, mais conduire à une sous-estimation du nombre de troupeaux infectés (sans signes cliniques). Les prévalences de troupeaux infectés sont souvent basées sur une définition de troupeaux ayant au moins 1 animal infecté (porteur d'anticorps et/ou excréteur) sur la base de prélèvements exhaustifs ou d'échantillons de taille variable. Cependant, les techniques diagnostiques n'ayant pas une spécificité parfaite (Field et al., 2000; Horigan et al., 2011), le seuil de 1 animal infecté expose, en cas de faux positif, à considérer un troupeau non infecté comme infecté et ainsi à surestimer la prévalence des troupeaux infectés. La mesure de la prévalence sur un échantillon non exhaustif, associée au manque de sensibilité de certains tests diagnostiques (Field et al., 2000; Horigan et al., 2011), peut aussi entraîner une sous-estimation de la prévalence des troupeaux infectés. Enfin, l'utilisation non couplée de méthodes de diagnostic direct ou indirect, peut entraîner une sous estimation des prévalences

d'animaux ou de troupeaux infectés du fait de l'existence d'animaux séronégatifs excréteurs ou séropositifs non excréteurs (Guatteo et al., 2006a).

Les principaux signes cliniques observés chez les ruminants sont des avortements (Cabassi et al., 2006), des veaux chétifs à la naissance et de l'infertilité (Angelakis and Raoult, 2010). Des vagues d'avortements pouvant atteindre plus de 70% du troupeau sont observées notamment chez les petits ruminants (Sanford et al., 1994; Rousset et al., 2009b). Chez les bovins l'avortement est un évènement plus rare et isolé qui est observé généralement en fin de gestation. Chez ces derniers, des métrites en lien avec cette infection seraient également possibles (Tainturier, 1987).

Les ruminants infectés excrètent la bactérie par différentes voies, dont le lait. Le rapport de l'AFSSA en 2004 a conclu que le risque associé à l'ingestion de lait cru contaminé était nul à négligeable (AFSSA, 2004). Cela est illustré par le récent Arrêté du 27 décembre 2011, modifiant les normes d'hygiène et de salubrité auxquelles doit répondre le lait cru livré en l'état et destiné à la consommation humaine, levant l'interdiction de la livraison à la laiterie de lait cru en l'état pendant au moins un an après l'apparition d'un cas clinique dans un élevage (Ministère de l'Agriculture, 2011). Ainsi, les mesures qui restent applicables lors de cas cliniques confirmés sont l'interdiction de la vente en l'état de lait cru à la ferme pendant un an après l'apparition du cas clinique et le retrait du lait de la vache ayant avorté de la production. Cependant, du fait de la présence de *Coxiella burnetii* dans le lait, le risque médiatique et ses conséquences sur l'image des produits laitiers demeurent.

La fièvre Q est donc une infection commune à l'Homme et à l'animal, qui peut parfois avoir de graves conséquences comme en atteste l'exemple des Pays-Bas et la difficulté à maîtriser l'épidémie. De plus, cette infection peut potentiellement avoir un impact sur l'image de la filière laitière. Il est donc nécessaire de maîtriser l'infection chez les ruminants, pour des raisons de santé publique et de santé animale. De récents rapports français et européens sur les risques et mesure de contrôles associés à la fièvre Q concluent d'ailleurs au besoin de données sur l'efficacité de mesures de maîtrise (AFSSA, 2004; ACERSA, 2007; EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010; DGAL, 2011).

2. Bases pour la maîtrise de la fièvre Q

2.1. Caractéristiques d'intérêt de *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii est une bactérie très infectieuse. En conditions expérimentales, l'inoculation de quelques bactéries peut provoquer une infection chez l'Homme (Tigertt et al., 1961; Ormsbee et al., 1964).

C'est une petite bactérie (0.2-0.4 µm de large, 0.4-1.00 µm de long) pléomorphe Gram négatif strictement intracellulaire (Angelakis et Raoult, 2010). Les cellules cibles dans l'organisme sont les macrophages situés dans les tissus et les monocytes circulant dans le sang (Baca et al., 1985). *Coxiella burnetii* existe sous 3 formes qui diffèrent dans leurs caractéristiques morphologiques, antigéniques et métaboliques, et également en termes de résistance physique et chimique. Ces 3 formes sont appelées : LCV (« large cell variant »), SCV (« Small Cell Variant ») et SDC (« Small Dense Cell»). Les SCV et SDC sont considérées comme étant les formes de résistance dans l'hôte et dans l'environnement respectivement.

La bactérie est caractérisée par des variations de phase de ses lipopolysacharides de surface (LPS), et existe sous 2 formes antigéniques (Rodolakis, 2006; Porter et al., 2011). La phase 1, présentant des LPS complets, est la phase virulente, fortement immunogène et naturelle retrouvée chez l'homme et l'animal infecté. La phase 2, présentant des LPS tronqués, est moins virulente et est obtenue après plusieurs passages de la bactérie dans des hôtes immunologiquement incompétents tels que les cellules en culture ou les œufs embryonnés (Rodolakis, 2006; Porter et al., 2011).

C'est sous la forme SCV que se fait la dissémination de *Coxiella burnetii*. La bactérie peut survivre jusqu'à 150 jours dans les sols (Welsh et al., 1959) et être transportée par le vent sur une distance d'une dizaine de km (Hawker et al., 1998; Tissot-Dupont et al., 2004; Schimmer et al., 2010). Sous cette forme, la bactérie est également très résistante aux rayons UV, à la chaleur, à la dessiccation, à la sonication, à la pression, au stress osmotique et oxydatif (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). De plus, elle est très résistante aux désinfectants chimiques classiquement utilisés en laboratoire. Les bactéries présentes dans une suspension liquide, contenant 10^8 *Coxiella burnetii*, soumises pendant 24h à 0,5% d'hypochlorite de sodium ou à 5% de formol restent infectieuses. Cette même étude montre que la même quantité de bactéries est inactivée après 30 min dans 70% d'alcool éthylique ou 5% de chloroforme (Scott and Williams, 1990).

Ses caractéristiques de résistance dans l'environnement et de dissémination, ainsi que son fort pouvoir infectieux, la classent parmi les agents de bioterrorisme de catégorie B (Madariaga et al., 2003; CDC, 2011)

2.2. Sources et voies de transmission

Chez l'Homme et l'animal, la voie de transmission principale est la voie respiratoire, par inhalation d'aérosols infectieux. La transmission peut se faire de façon directe, par contact proche, ou indirecte, sur de longues distances (Hawker et al., 1998; Tissot-Dupont et al., 2004; Schimmer et al., 2010). Les ruminants, principales sources de contaminations, excrètent la bactérie par plusieurs voies : le lait, les fèces (Arricau-Bouvery et al., 2001; Guatteo et al., 2007b), l'urine, le sperme (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanowska, 1997), le mucus vaginal et les produits de la parturition (Berri et al., 2001). D'autres animaux domestiques sont également rapportés comme source de transmission de *Coxiella burnetii*, mais de façon moins fréquente (Willeberg et al., 1980). Ainsi, des contacts avec des chats (Marrie et al., 1988; Pinsky et al., 1991) ou des chiens (Buhariwalla et al., 1996) ayant mis bas ou ayant avorté sont rapportés comme source de contamination pour l'Homme. Les animaux sauvages peuvent également être une source d'infection (Marrie et al., 1986) et participeraient en tant que réservoir au maintien de *Coxiella burnetii* (Astobiza et al., 2010c). Les tiques sont aussi citées comme contribuant au maintien du cycle de *Coxiella burnetii* en milieu naturel (Sting et al., 2004).

Les bactéries excrétées par les ruminants dans les fèces, l'urine, le mucus vaginal et les produits de la parturition, alimentent l'environnement en aérosols contaminés (Berri et al., 2000; Astobiza et al., 2011a). *Coxiella burnetii* peut persister dans l'environnement, qui devient alors un réservoir et une source indirecte de transmission (DeLay et al., 1950; Hawker et al., 1998). Les caractéristiques de l'excrétion sont très variables. La parturition est considérée comme une période à risque élevé, en termes d'occurrence de l'excrétion et de quantité de bactéries excrétées (Berri et al., 2001; Arricau-Bouvery et al., 2003). Les caprins et les bovins excrètent principalement dans le mucus vaginal et le lait (Arricau-Bouvery et al., 2003; Guatteo et al., 2007b), tandis que les ovins excrètent majoritairement dans les fèces. En fonction des espèces et des voies considérées la durée d'excrétion est variable et peut aller jusqu'à 13 mois (**Tableau 1- 1**) (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005).

Tableau 1- 1 : Durée d'excrétion de *Coxiella burnetii* les plus longues rapportées dans le mucus vaginal, le lait et les fèces de ruminants durant le suivi de troupeaux naturellement ou expérimentalement infectés (d'après (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Guatteo et al., 2007b; Rodolakis et al., 2007))

Espèces	Durée de l'excrétion de <i>Coxiella burnetii</i>		
	Mucus vaginal	Fèces	Lait
Vache	28 jours	14 jours	13 mois
Chèvre	14 jours	20 jours	16 semaines
Brebis	71 jours	8 semaines	12 semaines

La voie orale, notamment par consommation de lait cru ou de fromage provenant d'animaux infectés, présente un risque de transmission considéré comme nul à négligeable (AFSSA, 2004). Le lait est pourtant considéré comme la voie d'excrétion la plus courante et la plus persistante (Arricau-Bouvery et al., 2001) notamment parmi les animaux forts excréteurs (Guatteo et al., 2007b). Si la consommation de lait cru infecté a pu entraîner des séroconversions (Benson et al., 1963), la littérature ne rapporte pas de cas avec des signes cliniques attribuables à une infection dont la voie orale serait la seule voie de transmission identifiée. Dans le cas des carnivores domestiques, la consommation de placenta ou de produits d'avortements (*i.e.*, pouvant contenir des charges très élevées de bactéries) est parfois évoquée (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005) ; dans ces exemples l'exposition à des aérosols infectieux lors de la consommation ne peut être exclue.

Du fait de la présence de *Coxiella burnetii* dans le sperme (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanska, 1997; Milazzo et al., 2001), la voie vénérienne est également citée, mais semble assez marginale, avec des infections observées en conditions expérimentales chez la souris et de rares cas humains de transmission par voie vénérienne (Kruszewska et al., 1996; Milazzo et al., 2001).

La transmission d'Homme à Homme est peu évoquée et serait possible à travers le contact avec des femmes enceintes et la transmission par voie vénérienne (Kruszewska et al., 1996; Milazzo et al., 2001).

Des infections par voie transcutanée, par piqûre de tique, sont rapportées chez les mammifères (Sting et al., 2004; Castillo et al., 2010) mais pas chez l'Homme (Angelakis and Raoult, 2010).

Au final, l'inhalation d'aérosols infectieux reste la principale source de contamination et la voie aérienne la principale voie de transmission.

2.3. Facteurs de risque d'infection par *Coxiella burnetii* en troupeaux de ruminants

L'âge est souvent rapporté comme facteur de risque d'être infecté par *Coxiella burnetii*. En effet, dans les troupeaux infectés les animaux nullipares apparaissent souvent comme séronégatifs, contrairement aux animaux du troupeau adulte (Guatteo et al., 2008; Kennerman et al., 2010). Le mode de contamination principal étant l'inhalation d'aérosols infectieux, il est probable que l'effet de l'âge soit lié à l'augmentation du risque pour les animaux d'être exposés à une pression infectieuse importante en rejoignant le troupeau adulte. Cela a été montré chez les ovins, où la séroprévalence parmi de jeunes agneaux suivis pendant 2 ans augmentait avec les saisons d'agnelage du fait d'une contamination due à l'exposition aux placentas infectés des adultes (Enright et al., 1971). Au niveau animal, la race et le type de production sont également rapportés comme facteurs de risque de l'infection (**Tableau 1- 2**).

Les facteurs de risque de l'infection des ruminants par *Coxiella burnetii* sont divers. Ils concernent à la fois les caractéristiques intrinsèques des animaux, mais également des caractéristiques de conduite du troupeau ainsi que l'environnement du troupeau et son voisinage (**Tableau 1- 2**). Ainsi, pour prévenir la propagation de l'infection en troupeaux ruminants, plusieurs types de mesures de maîtrise sont à considérer.

3. Mesures de maîtrise en troupeau infecté

3.1. Mesures de maîtrise non médicale

Les mesures de maîtrise non médicale ont pour objectif de prévenir ou diminuer l'exposition des individus sensibles aux aérosols contaminés. En élevage infecté, cette exposition peut se faire au contact d'animaux infectés et excréteurs ou de l'environnement contaminé par ces mêmes animaux. Plusieurs méthodes sont disponibles : prévenir / limiter l'exposition aux animaux excréteurs, contrôler l'exposition à un environnement contaminé, ou prévenir la réintroduction de *Coxiella burnetii*. Pour ce faire, des mesures d'hygiène rationnelles, non spécifiques de fièvre Q, sont recommandées notamment par les organismes techniques ou scientifiques en lien avec l'élevage (AFSSA, 2004; ACERSA, 2007; DGAL, 2007; EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

Tableau 1- 2 : Facteurs à l'échelle de l'animal, du troupeau et de l'environnement associés à la prévalence de l'infection par *Coxiella burnetii* dans des exploitations de ruminants domestiques

Animal	Modalité à risque	Modalité de référence	Mesure du risque	Test diagnostic et prélèvement	Référence
Age	>2 ans	[0-2] ans	Séroprévalence individuelle	ELISA (sang)	(McCaughey et al., 2010)
	55.5 mois	49.5 mois	Séroprévalence individuelle	ELISA (sang)	(Muskens et al., 2011)
	57.7 mois	49.8 mois	Prévalence d'excréteurs	PCR (lait individuel)	(Muskens et al., 2011)
Race	Frisonne	Autres races	Séroprévalence individuelle	ELISA (sang)	(McCaughey et al., 2010)
Production	Laitière	Viande	Séroprévalence individuelle	ELISA (sang)	(McCaughey et al., 2010) (Ryan et al., 2010)
Troupeau	Modalité à risque	Modalité de référence	Mesure du risque	Test diagnostic et prélèvement	Référence
Taille	>100 animaux	<50 animaux	Séroprévalence individuelle	ELISA (sang)	(McCaughey et al., 2010)
	>200 animaux	<140 animaux	Séroprévalence troupeaux	ELISA (lait de tank)	(Ryan et al., 2010)
	>800 animaux	<800 animaux	Séroprévalence troupeaux	ELISA (sang)	(Schimmer et al., 2011)
Stabulation	Hivernale	Permanente / jamais	Séroprévalence individuelle	^a IFAT	(Capuano et al., 2001)
Saison	Hiver	Autres saisons	Séroprévalence individuelle	IFAT	(Yanase et al., 1997)
Densité bovine	≥100/ km ²	<100 / km ²	Séroprévalence troupeaux	ELISA (sang)	(Schimmer et al., 2011)

Tableau 1-2 (suite) : Facteurs associés à la prévalence individuelle ou troupeaux de l'infection par *Coxiella burnetii* dans des exploitations de ruminants domestiques

Environnement	Modalité à risque	Modalité de référence	Mesure du risque	Test diagnostic et prélèvement	Référence
Voisinage	Trp ^b caprin avec PCR tank positive à <8km	≥8 km	Séroprévalence troupeaux	ELISA (sang)	(Schimmer et al., 2011)
Carnivores domestiques	Chien / chat dans l'étable	Absent ou inconnu	Séroprévalence troupeaux	ELISA (sang)	(Schimmer et al., 2011)
Paille / litière	Provenance extérieure ou inconnue	Pas de paille ou origine domestique	Séroprévalence troupeaux	ELISA (sang)	(Schimmer et al., 2011)
	Pas de connaissance sur la présence de vermines	Présence connue (oui vs. non)	Séroprévalence troupeaux	ELISA (sang)	(Schimmer et al., 2011)
Lutte contre nuisible volant	Bâche de protection	Autres	Séroprévalence troupeaux	ELISA (sang)	(Schimmer et al., 2011)

^aIFAT : test d'immunofluorescence pour la détection des anticorps ; Trp^b : troupeau ;

3.1.1. Mesures à l'échelle individuelle

L'identification et la réforme des animaux à risque d'être excréteurs pourraient permettre de limiter le nombre d'excréteurs. Ainsi, dans le cas de l'épidémie aux Pays-Bas, toutes les femelles gestantes dans les troupeaux infectés avaient été réformées, du fait de leur risque élevé d'excréter de grandes quantités de bactéries à la mise bas (Roest et al., 2011). De la même façon les schémas de type « test and cull » sont un moyen potentiel d'éliminer les animaux excréteurs. Le principe est de tester les animaux et de réformer les animaux détectés excréteurs (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

Cependant du fait de la variabilité des voies, du caractère intermittent ou sporadique de l'excrétion chez certains animaux (Berri et al., 2001; Guatteo et al., 2007b; Rousset et al., 2009a) et du manque de sensibilité des tests diagnostiques disponibles (Peter et al., 1987a; Kovacova et al., 1998; Kittelberger et al., 2009; Horigan et al., 2011; Emery et al., 2012), ces méthodes ne permettent pas d'identifier et d'éliminer la totalité des excréteurs d'un troupeau. De plus, elles peuvent avoir des conséquences économiques lourdes pour les éleveurs du fait du coût propre de la réforme et du renouvellement, mais également en raison du coût des tests diagnostiques (ACERSA, 2007).

3.1.2. Mesures à l'échelle du troupeau et de l'environnement

La parturition étant une période à risque élevé, différentes mesures de contrôle y sont associées. L'interdiction temporaire de mise à la reproduction des femelles non gestantes pourrait permettre de limiter l'excrétion bactérienne en évitant les mises-bas (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). L'élimination de produits de la parturition pourrait empêcher la contamination de l'environnement ou la dissémination par des carnivores domestiques ou sauvages des aérosols infectieux qui seraient présents en grandes quantités dans ces produits.

L'utilisation du box de vêlage pourrait éviter l'exposition aux bactéries contenues dans les produits de la parturition. Cependant, son nettoyage, en fonction de la méthode utilisée (nettoyage à haute pression par exemple), pourrait favoriser l'aérosolisation et la transmission de bactéries infectieuses. De plus, les conditions optimales d'utilisation des désinfectants en élevage pour tuer *Coxiella burnetii* sont inconnues.

Dans le cadre d'une contamination expérimentale, il a été montré que le lisier de chèvre traité à la cyanamide calcique à 0,4% pendant 1 semaine à 20°C ou pendant 3 semaines à 4°C devenait non infectieux pour des souris (Arricau-Bouvery et al., 2001). Ce résultat obtenu en conditions expérimentales et sur du lisier de chèvre est difficilement transposable aux fumiers, du fait des difficultés d'homogénéisation que l'on peut rencontrer sur cette matière. Il est également difficilement transposable à ce qui pourrait être observé en conditions d'élevage, du fait de nombreux facteurs de variabilité non pris en compte (notamment des caractéristiques des troupeaux et des bâtiments, de la conduite d'élevage et des conditions météorologiques). De plus, les conditions d'efficacité sont associées à la contrainte d'avoir une fosse à lisier qui puisse être dédiée à cette désinfection pendant une semaine, ce qui n'est pas le cas dans tous les élevages (ACERSA, 2007).

Le compostage est également une autre technique pour détruire les bactéries par la chaleur, la température au cœur du compost pouvant atteindre jusqu'à 70° C pendant 4 à 6 semaines (ACERSA, 2007; EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). Cependant, la température n'est pas homogène entre le cœur et les contours du compost, le temps nécessaire à la destruction de *Coxiella burnetii* dans le compost est inconnu, et les étapes nécessaires de retournement du fumier peuvent provoquer l'aérosolisation des bactéries (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). Il est conseillé de recouvrir le fumier pour éviter l'aérosolisation des bactéries contenues (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). L'absence d'épandage des fumiers et lisiers est recommandée dans les élevages infectés (AFSSA, 2004), bien que dans le cas de l'épidémie aux Pays-Bas l'épandage de fumier provenant d'élevages de chèvre n'était pas associé à une augmentation du nombre de cas humains de fièvre Q dans le voisinage (Vellema et al., 2010).

3.1.3. Prévention de la réintroduction de *Coxiella burnetii*

Les règles classiques de biosécurité concernant la circulation des personnes et les procédures d'hygiène associées pourraient limiter la réintroduction de *Coxiella burnetii* dans des troupeaux infectés (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

Le contrôle des mouvements d'animaux entre fermes ayant des statuts sanitaires différents vis-à-vis de la fièvre Q, pourrait prévenir l'introduction d'animaux infectés dans des troupeaux sains ou la réintroduction d'animaux infectés dans des troupeaux déjà infectés (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). Cependant, comme pour le

« test and cull », au vu du caractère intermittent de l'excrétion, du portage d'anticorps (Guatteo et al., 2007b; Rousset et al., 2009a) et du manque de sensibilité des tests diagnostiques (Peter et al., 1987a; Kovacova et al., 1998; Kittelberger et al., 2009; Horigan et al., 2011; Emery et al., 2012), le statut sain ou infecté d'un animal ou d'un troupeau est difficile à définir avec certitude.

Les changements de caractéristiques du troupeau telles que la taille et la localisation pourraient également être des méthodes de prévention ou de contrôle de l'infection (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). La réduction de la taille des troupeaux réduirait le risque d'introduction du pathogène en réduisant les contacts avec l'extérieur (intrants alimentaire, mouvement d'animaux,...). La proximité d'une ferme pouvant être facteur de risque d'infection (présence de chèvres, proximité de troupeaux infectés), en augmentant la distance entre fermes le risque d'infection pourrait diminuer. Cependant la distance optimum nécessaire entre fermes pour éviter la transmission de la bactérie est inconnue. Ce sont des caractéristiques difficilement modifiables et donc des solutions non réalisables.

Le contrôle des animaux réservoirs de la fièvre Q, autres que ruminants, peut être une façon de contrôler l'infection. Cependant leur rôle dans le cycle de *Coxiella burnetii* n'est pas bien compris (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010), à l'exception de celui de la tique, puisqu'elle est considérée comme un réservoir de la fièvre Q (Loftis et al., 2006). Cependant l'impact des traitements acaricides sur le portage par les bovins de *Coxiella burnetii* est inconnu.

La plupart de ces mesures ont un impact inconnu sur la réduction de la propagation de *Coxiella burnetii* en élevage. De plus, elles sont associées à une mise en œuvre très lourde voire impossible dans certaines exploitations. Enfin, ces méthodes sont inefficaces face au risque d'introduction d'aérosols infectieux par le vent. Pour contrôler l'infection et notamment le risque en cas d'exposition des animaux sains, des mesures de maîtrise médicale sont également disponibles.

3.2. Mesures de maîtrise médicale en troupeau infecté

3.2.1. Antibiothérapie

L'antibiothérapie en médecine vétérinaire repose essentiellement sur l'utilisation des tétracyclines, du fait de leur diffusion intracellulaire et de leur spectre d'activité qui comprend les bactéries à Gram négatif telle que *Coxiella burnetii*. En élevage infecté en routine, différents protocoles sont appliqués. Les traitements sont effectués au tarissement pour éviter les avortements tardifs ou au vêlage pour limiter le pic d'excrétion potentiel. Peu d'études sur l'évaluation de l'efficacité des tétracyclines, et sur l'efficacité comparée de ces différents protocoles, sont disponibles (**Tableau 1- 3**).

Une étude sur les ovins menée dans un troupeau fortement infecté n'a pas montré de différences en termes d'occurrence ou de durée de l'excrétion entre les brebis traitées et les brebis témoins (**Tableau 1- 3**) (Astobiza et al., 2010a). Cependant, cette étude ayant été menée dans un seul troupeau avec un niveau d'infection important, il est difficile de généraliser ces résultats. Chez des brebis traitées à l'oxytétracycline autour de la mise bas (Berri et al., 2001), les avortements semblaient avoir été supprimés et la bactérie n'était plus détectée dans les voies d'excrétions étudiées, à l'exception d'un prélèvement d'une brebis 2 mois après la mise bas (**Tableau 1- 3**). Tous les animaux ayant été traités (absence de témoins), ces résultats ne peuvent être attribués avec certitude à l'oxytétracycline ou à l'évolution naturelle de l'infection.

Dans le cadre d'une étude menée sur 53 vaches de 7 troupeaux bovins cliniquement atteints par *Coxiella burnetii*, l'utilisation de l'oxytétracycline était associée à la diminution du nombre de placentas détectés positifs à la présence de *Coxiella burnetii* par la méthode de Stamp (Woernle et al., 1985). Dans une autre étude, 2 vaches infectées chroniques, excrétaient *Coxiella burnetii* dans leur lait, (Behymer et al., 1977) avaient été traitées à la chlortétracycline par voie orale. Après traitement, la bactérie n'était plus détectée dans le lait après une semaine pour la 1^{ère} vache, et après 4 semaines pour la 2^{ème} vache. La faible sensibilité des techniques de diagnostic utilisées dans ces 2 études et le faible nombre d'animaux testés, dans la dernière étude notamment, rendent ces résultats difficilement interprétables (**Tableau 1- 3**). De plus, le choix de l'administration de l'antibiotique par voie orale dans l'étude de Behymer (1977), avec un risque de mauvaise diffusion dans l'organisme, pose question quant à sa capacité d'action dans l'organisme des vaches traitées.

Les quelques études disponibles sur l'utilisation de l'antibiothérapie rapportent donc des résultats contradictoires. De plus, ces résultats sont peu comparables entre eux du fait de schémas d'études différents en termes de protocoles d'administration d'antibiotiques (voies et périodes), de critères d'efficacité et de méthodes de diagnostic. Les protocoles d'administration d'antibiotique unique dans chaque étude mais différents d'une étude à l'autre limitent les conclusions qui peuvent en être tirées.

Tableau 1- 3 : Etudes d'évaluation de l'antibiothérapie pour la maîtrise de l'infection par *Coxiella burnetii* chez les ruminants

Population	Plan d'étude	Nature des prélèvements	Méthode diagnostic	Résultats (% d'excréteurs)	Référence
Ovins					
60 traités 26 témoins (séroprévalence = 54%)	20 mg/kg oxytétracycline IM ^d , à 100 et 120 jours de gestation	Lait, MV ^a , fèces	PCR	Traités : 23%, 64%, 53% Témoins : 20%, 51%, 55%	(Astobiza et al., 2010a)
34 traités (séroprévalence = 32%)	20 mg/kg oxytétracycline IM, 4 jours avant et 3 jours après vêlage	Lait, MV ^a , fèces	PCR	Traités : 25%, 56%, 18%	(Berri et al., 2001)
Bovins					
33 traités 20 témoins	50 mL Terramycine L.A en IM, 3 semaines avant vêlage	Placentas	Stamp ^c	Traités : 24% Témoins : 35%	(Woernle et al., 1985)
2 traités (prévalence excrétion lait=100%)	8 mg/kg/jrs de chlorotétracycline per os durant 30 jrs : 61 et 31 jrs avant vêlage	Lait	Inoculation et MA ^b	Traités : 50%	(Behymer et al., 1977)

^aMV : mucus vaginal ; MA^b : Micro-agglutination ; Stamp^c : examen microscopique de frottis de placentas colorés par la méthode de stamp ; IM^d : intra-musculaire

3.2.2. Vaccination

En médecine vétérinaire, deux vaccins sont actuellement disponibles en France : le Chlamyvox® (Merial, AMM ovin et Caprin), vaccin combiné fabriqué à partir de *Chlamydophila abortus* et *Coxiella burnetii* en phase 2 indiqué pour la prévention des avortements (Anonymous, 2012b), et le Coxevac® (CEVA, AMM bovin et caprin), fabriqué à partir de *Coxiella burnetii* en phase 1 indiqué pour la prévention de l'excrétion chez les bovins et l'excrétion et les avortements chez les caprins (Anonymous, 2010).

Différentes études sont disponibles sur l'efficacité de ces vaccins pour le contrôle de l'infection par *Coxiella burnetii* chez les ruminants ([Tableau 1- 4](#)).

Une étude a été menée en 2003 en conditions expérimentales dans un troupeau sensible de chèvres vaccinées comparant le vaccin phase 1, le vaccin phase 2 et un placebo. Elle a montré que le vaccin phase 1 était le seul à prévenir l'excrétion et les avortements (Arricau-Bouvery et al., 2005). Ces résultats sont conformes à ceux précédemment obtenus avec le vaccin phase 1, présentant une diminution importante de l'excrétion et du nombre d'avortements obtenue suite à une inoculation chez les ovins (Brooks et al., 1986) et les bovins (Behymer et al., 1976). Ces résultats sont, de plus, en adéquation avec ce que l'on observe chez l'Homme, chez qui le seul vaccin qui semble efficace aujourd'hui est le vaccin phase 1 Q-Vax (sous ATU en France) (Bossi et al., 2004; Angelakis and Raoult, 2010). Si en conditions expérimentales le vaccin phase 1 semble être le seul efficace pour prévenir les signes cliniques et l'excrétion (Arricau-Bouvery et al., 2005), la question de son efficacité dans le cadre d'une infection naturelle demeurerait. Un essai de vaccination partielle sur les bovins mené pendant un an dans 6 troupeaux naturellement infectés, avec une stricte définition des statuts vis-à-vis de l'infection des animaux (déterminés 17 jours et 2 jours avant l'application du traitement -vaccin/placebo-, par sérologie et tests PCR sur 3 voies d'excrétion) a montré que le vaccin conférait une protection aux animaux vaccinés non gestants et non-infectés (risque de devenir excréteur 5 fois moins important que les animaux ayant eu le placebo) (Guatteo et al., 2008).

Deux essais de vaccination partielle menés respectivement dans 1 et 3 troupeaux caprins cliniquement affectés ont montré que le vaccin phase 1 réduisait la charge détectée chez les animaux vaccinés en comparaison aux animaux non vaccinés et que cet effet était plus marqué parmi les primipares (Rousset et al., 2009b), et encore plus lorsqu'elles étaient

séronégatives au moment de la vaccination (de Cremoux et al., 2011). Chez les ovins, le même schéma d'étude mené sur 4 ans, ne montrait pas d'effet significatif du vaccin (Astobiza et al., 2011b). L'occurrence et la charge détectée étaient significativement moins importantes les 3 dernières années, mais ces effets auraient pu être associés à l'effet du vaccin aussi bien qu'au cours naturel de l'infection. Dans le cadre d'une étude menée aux Pays-Bas dans des troupeaux caprins et un troupeau ovin infectés, la vaccination avec le vaccin phase 1 a entraîné la diminution de la prévalence des excréteurs et de la charge détectée chez ces animaux (Hogerwerf et al., 2011). Mais cette étude ne portait que sur des animaux gestants.

Les résultats de ces études montrent que le vaccin de phase 1 confère notamment une protection aux animaux vaccinés lorsque non infectés et non gestants, soulignant l'importance du statut initial au moment de la vaccination.

En ce qui concerne les animaux infectés, ou les troupeaux dans lesquels la prévalence d'animaux infectés est importante, les résultats varient de l'absence de protection conférée par le vaccin phase 1 (Guatteo et al., 2008; Astobiza et al., 2011b) à un effet sur la réduction des charges excrétées (Rousset et al., 2009b; de Cremoux et al., 2011).

Ces résultats sont obtenus avec des schémas de vaccination différents de ceux appliqués en élevage. Avec la vaccination partielle, les animaux vaccinés sont soumis à une pression infectieuse plus importante que dans le cadre d'une vaccination totale, puisque les animaux non vaccinés peuvent continuer à excréter et à contaminer l'environnement. À l'inverse, les animaux non vaccinés sont soumis à une pression infectieuse moins importante que s'ils avaient été dans un troupeau entièrement non vacciné, puisque la vaccination est associée à la prévention de l'excrétion chez les animaux vaccinés sensibles. Ainsi, l'effet du vaccin dans les études de vaccination partielle pourrait être sous-estimé.

Tableau 1- 4 : Efficacité de la vaccination pour maîtriser l'infection par *Coxiella burnetii* chez les ruminants (plan d'étude et résultats)

Type d'étude	Echantillon d'étude	Plan d'étude	Méthode diagnostic (nature des prélèvements)	Effet vaccin phase 1	Référence
Exp. ^c	47 chèvres (1-2 ans) sensibles	3 groupes : vaccin phase 1, vaccin phase 2, placebo inoculation 105 jours après injection booster à 84 jours de gestation	ELISA (sang), PCR qualitative (lait, MV ^a , fèces)	Prévention de l'excrétion et de l'avortement	(Arricau-Bouvery et al., 2005)
Obs. ^d	6 troupeaux infectés 336 vaches (48% séroprévalence)	Vaccination partielle des 4 groupes par trp ^b (sensible gestant, sensible non gestant, infecté gestant, infecté non gestant) : vaccin phase 1, placebo 50% groupe vaccin phase 1	PCR temps réel (lait, MV, fèces)	Prévention (risque divisé par 5) de l'excrétion chez les animaux sensibles et non gestants	(Guatteo et al., 2008)
Obs.	1 troupeau infecté 54 chèvres	Vaccination partielle du trp ^b : vaccin phase 1, non vacciné 50% trp ^b vaccin phase 1	PCR temps réel (MV)	Diminution de la charge bactérienne détectée chez les animaux vaccinés (effet marqué chez animaux primipares)	(Rousset et al., 2009b)
Obs.	1 troupeau infecté 408 brebis (57% séroprévalence)	Vaccination partielle 1ère année : vaccin phase 1, non vacciné 75% trp ^b vaccin phase 1 vaccination totale 3 ^{ème} et 4 ^{ème} année	PCR temps réel (lait, MV, fèces)	Pas d'effet	(Astobiza et al., 2011b)
Obs.	3 troupeaux infectés 905 chèvres (74,5% prévalence)	Vaccination partielle : vaccin phase 1, non vacciné 50% trp ^b vaccin phase 1	PCR temps réel (MV)	Diminution de la charge bactérienne détectée chez les animaux vaccinés (effet marqué chez les animaux primipares et sensibles)	(de Cremoux et al., 2011)
Obs.	13 troupeaux caprins et 1 ovin infectés	100 femelles gestantes / trp ^b : 7 troupeaux vaccinés avec vaccin phase 1 et 6 non vaccinés	PCR temps réel (Fluide utérin, MV, lait)	Diminution de la prévalence et de la charge bactérienne détectée chez les animaux vaccinés	(Hogerwerf et al., 2011)

MV^a : mucus vaginal ; trp^b : troupeau; Exp.^c : Expérimentale ; Obs.^d : Observationnelle

Les études expérimentales permettent d'évaluer l'efficacité *sensu stricto* du produit. En conditions expérimentales, l'efficacité est évaluée pour une dose infectieuse connue, selon un mode d'inoculation précis (ici sous cutanée, différent de la voie respiratoire lors d'infections naturelles) et tous les paramètres sont contrôlés. Or, dans le cadre d'une maladie infectieuse comme la fièvre Q, les caractéristiques individuelles, les caractéristiques des troupeaux, le mode de contamination ainsi que la charge infectieuse à laquelle les animaux sont exposés (La Scola et al., 1997), sont autant de paramètres qui peuvent impacter la dynamique d'infection intra-troupeau et l'efficacité d'un traitement. La diversité des situations lors d'infections naturelles est ainsi difficilement reproductible en conditions expérimentales. Ainsi, l'efficacité d'un traitement (utilisation d'un produit thérapeutique en population) doit être testée en conditions réelles (Asokan, 2009).

Il est donc important de mettre en place des études d'interventions multicentriques en troupeaux naturellement infectés pour évaluer l'efficacité de mesures de maîtrise notamment médicale.

4. Objectifs généraux de la thèse

Face aux enjeux de santé publique, de santé animale, et aux enjeux possibles pour la filière lait associés à l'infection des ruminants par *Coxiella burnetii*, l'objectif général de cette thèse a été d'évaluer l'efficacité de mesures de maîtrise médicale de l'infection par *Coxiella burnetii* en troupeaux bovins laitiers naturellement infectés.

Cet objectif général sera abordé à travers 3 axes :

- décrire la variabilité des situations des troupeaux infectés avant la mise en place de mesures de maîtrise,
- évaluer l'efficacité des mesures de maîtrise médicale pour contrôler l'excrétion dans le mucus vaginal au vêlage,
- évaluer l'efficacité des mesures de maîtrise médicale pour contrôler l'excrétion dans le lait de tank, dans le lait de mélanges de primipares et dans l'environnement des animaux.

Dans le 2^{ème} chapitre de la thèse, la diversité des situations sanitaires observées avant mise en place des mesures de maîtrise médicale dans des troupeaux naturellement infectés par la fièvre Q, est décrite et l'impact potentiel des mesures de maîtrise non médicale appliquées dans ces troupeaux est quantifié. Pour ce faire, nous proposons une description en termes de séroprévalence intra-troupeaux des vaches laitières et des génisses. Nous étudions aussi la relation entre ces séroprévalences intra-troupeau observées et les caractéristiques et pratiques d'élevage associées. Un sous-objectif est d'évaluer l'intérêt du lait de tank comme outil d'estimation de la séroprévalence intra-troupeau. Il s'agit d'évaluer la valeur informative d'un prélèvement facile à collecter et peu onéreux comme alternative à des sérologies individuelles.

Dans le 3^{ème} chapitre, l'efficacité des mesures de maîtrise médicale à l'échelle individuelle, combinant ou non la vaccination avec un vaccin phase 1 et l'antibiothérapie à base de tétracycline, sur la prévention de l'excrétion et la diminution de la charge excrétée au moment du vêlage dans le mucus vaginal a été évaluée.

Dans le 4^{ème} chapitre, nous évaluons l'efficacité de ces mêmes mesures de maîtrise médicale pour contrôler l'infection par *Coxiella burnetii* à l'échelle du troupeau. Les critères d'efficacité étudiés reposent sur l'évolution de la charge en *Coxiella burnetii* mesurée dans 4 types de prélèvements : le lait de tank, le lait de mélanges de primipares, la poussière cumulée dans les bâtiments et la poussière renouvelée sur l'aire d'exercice des animaux.

La nature des critères d'efficacité choisis dans les chapitres 3 et 4 est justifiée dans les chapitres correspondant.

Le 5^{ème} chapitre de la thèse consiste en une discussion générale. Les principaux résultats y sont rappelés et mis en perspectives. Les méthodes et critères choisis pour évaluer l'efficacité des mesures de maîtrise médicale mis en oeuvre sur le troupeau adulte pour contrôler l'infection par *Coxiella burnetii* sont discutés. Enfin, nous présentons les perspectives et recommandation qui peuvent découler des résultats de ces travaux.

Références

- ACERSA, 2007. Proposition de plan de maîtrise de la fièvre Q dans les élevages cliniquement atteints, p. 34.
- AFSSA, 2004. Fièvre Q : Rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion en élevage. AFSSA, p. 42.
- Angelakis, E., Raoult, D., 2010. Q fever. *Veterinary Microbiology* 140, 297-309.
- Anonyme, 2010. Coxevac : EPAR - Product Information. European Medicines Agency.
- Anonyme, 2011. Q fever epidemic cost up to €336m. *DutchNews*. Amsterdam.
- Anonyme, 2012a. Q-fever death toll reached at least 24. *DutchNews.nl*.
- Anonyme, 2012b. Résumé des Caractéristiques Produit : Chlamyvac FQ. Merial.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats : excretion routes. *Vet. Res.* 34, 423-433.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A., 2001. Etude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique - Study of *Coxiella burnetii* excretion in an experimental goat model and decontamination of dung with calcium Cyanamid. *Renc. Rech. Rum.*, pp. 153-156.
- Asokan, G.V., 2009. Epidemiological assessment of vaccine efficacy. *Vet. World* 2, 118-122.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010a. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *The Veterinary Journal* 184, 172-175.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2011a. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res Vet Sci* 91, e58-63.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2011b. Four-Year Evaluation of the Effect of Vaccination against *Coxiella burnetii* on Reduction of Animal Infection and Environmental Contamination in a Naturally Infected Dairy Sheep Flock. *Applied and environmental microbiology* 77, 7405-7407.
- Astobiza, I., Barral, M., Ruiz-Fons, F., Barandika, J.F., Gerrikagoitia, X., Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., 2010b. Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet Microbiol* 147, 190-194.
- Beaudeau, F., Assié, S., Seegers, H., Belloc, C., Sellal, E., Joly, A., 2001. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk *Vet. Rec.* 149, 236-240.

- Behymer, D., Ruppaner, R., Riemann, H.P., Biberstein, E.L., Franti, C.E., 1977. Observation on chemotherapy in cows chronically infected with *Coxiella burnetii* (Q fever). *Folia Vet. Lat.* 7, 64-70.
- Behymer, D.E., Biberstein, E.L., Riemann, H.P., Franti, C.E., Sawyer, M., Ruppaner, R., Crenshaw, G.L., 1976. Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle : challenge of immunity after vaccination. *Am. J. Vet. Res.* 37, 631-634.
- Benson, W.W., Brock, D.W., Mather, J., 1963. Serologic Analysis of a Penitentiary Group Using Raw Milk from a Q Fever Infected Herd. *Public health reports* 78, 707-710.
- Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A., 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 72, 285-293.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec.* 148, 502-505.
- Bossi, P., Tegnell, A., Baka, A., Van Loock, F., Hendriks, J., Werner, A., Maidhof, H., G, G., 2004. Recommandation Bichat* sur la prise en charge clinique des patients présentant une fièvre Q liée ou non à un acte de bioterrorisme. *Euro Surveill.*, p. 6.
- Brooks, D.L., Ermel, R.W., Franti, C.E., Ruppaner, R., Behymer, D.E., Williams, J.C., Stephenson, E.H., 1986. Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. *American journal of veterinary research* 47, 1235-1238.
- Buhariwalla, F., Cann, B., Marrie, T.J., 1996. A dog-related outbreak of Q fever. *Clinical Infectious Diseases* 23, 753-755.
- Burnet, F.M., Freeman, M., 1937. Experimental studies on the virus of "Q" fever. *Med. J. Aust.* 2, 299-305.
- Cabassi, C.S., Taddei, S., Donofrio, G., Ghidini, F., Piancastelli, C., Flammini, C.F., Cavirani, S., 2006. Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *New Microbiol* 29, 211-214.
- Capuano, F., Landolfi, M.C., Monetti, D.M., 2001. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Vet Rec.* 149, 669-671.
- Castillo, L., Fernandez-Llario, P., Carranza Almansa, J., Bermejo, F., Hermoso de Mendoza, J., 2010. First seropositive cases of *Coxiella burnetii* in red deer populations in the southwest Iberian peninsula. *J Zoo Wildl Med* 41, 468-473.
- CDC, 2011. Bioterrorism Agents/Diseases. Center for Disease Control and Prevention.
- Cox, H.R., 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. III. Description of organism and cultivation experiments. *Public health reports* 53, 2270-2276.
- Davis, G.E., Cox, H.R., 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. I. Isolation from *Dermacentor andersoni*, reactions in animals, and filtration experiments. *Public health reports* 53, 2259-2261.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Pape, M., 2011. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS immunology and medical microbiology*.

- DeLay, P.D., Lennette, E.H., DeOme, K.B., 1950. Q Fever in California: II. Recovery of *Coxiella burnetii* from Naturally-Infected Air-Borne Dust. *J Immunol* 65, 211-220.
- Delsing, C.E., Kullberg, B.J., Bleeker-Rovers, C.P., 2010. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *Neth. J. Med.* 68, 382-387.
- Derrick, E.H., 1937. "Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. *Med. J. Aust.* 2, 281-299.
- DGAL, 2007. DGAL/SDSPA/SDSSA/N2010-8262. p. 11.
- DGAL, 2011. Mise en place d'une surveillance de la fièvre Q dans des départements pilotes.
- Dijkstra, F., van der Hoek, W., Wijers, N., Schimmer, B., Rietveld, A., Wijkmans, C.J., Vellema, P., Schneeberger, P.M., 2011. The 2007–2010 Q fever epidemic in the Netherlands: characteristics of notified acute Q fever patients and the association with dairy goat farming. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 64, 3-12.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010. Scientific Opinion on Q Fever. *EFSA Journal*. p. 114.
- Emery, M.P., Ostlund, E.N., Schmitt, B.J., 2012. Comparison of Q fever serology methods in cattle, goats, and sheep. *J Vet Diagn Invest* 24, 379-382.
- Enright, J.B., Franti, C.E., Longhurst, W.M., Behymer, D.E., Wright, M.E., Dutson, V.J., 1971. *Coxiella burnetii* in a wildlife-livestock environment. Antibody response of ewes and lambs in an endemic Q fever area. *American journal of epidemiology* 94, 62-71.
- Field, P.R., Mitchell, J.L., Santiago, A., Dickeson, D.J., Chan, S.W., Ho, D.W., Murphy, A.M., Cuzzubbo, A.J., Devine, P.L., 2000. Comparison of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay with immunofluorescence and complement fixation tests for detection of *Coxiella burnetii* (Q fever) immunoglobulin M. *Journal of clinical microbiology* 38, 1645-1647.
- Frankel, D., Richet, H., Renvoise, A., Raoult, D., 2011. Q fever in France, 1985-2009. *Emerging infectious diseases* 17, 350-356.
- Guatteo, R., 2011. La Fièvre Q chez les petits ruminants : historique et impact de l'épidémie néerlandaise et mesures de maîtrise envisageables. *Bulletin des GTV* 58, 97-104.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Veterinary research* 37, 827-833.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007a. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. *Zoon. Pub. Health.* 54, 191-194.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007b. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.* 38, 849-860.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328.
- Hawker, J.I., Ayres, J.G., Blair, I., Evans, M.R., Smith, D.L., Smith, E.G., Burge, P.S., Carpenter, M.J., Caul, E.O., Coupland, B., Desselberger, U., Farrell, I.D., Saunders, P.J., Wood, M.J., 1998. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Communicable disease and public health / PHLS* 1, 180-187.

- Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H.I.J., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D., Nielen, M., 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of Goats and Sheep, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 379-386.
- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R., Pritchard, G.C., 2011. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 924-931.
- Kennerman, E., Rousset, E., Gökçe, E., Dufour, P., 2010. Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33, 37-45.
- Kittelberger, R., Mars, J., Wibberley, G., Sting, R., Henning, K., Horner, G.W., Garnett, K.M., Hannah, M.J., Jenner, J.A., Piggott, C.J., O'Keefe, J.S., 2009. Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants : recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *New Zealand veterinary journal* 57, 262-268.
- Kovacova, E., Kazar, J., Spanelova, D., 1998. Suitability of various *Coxiella burnetii* antigen preparations for detection of serum antibodies by various tests. *Acta Virologica* 42, 365-368.
- Kruszewska, D., Lembowicz, K., Tylewska-Wierzbanowska, S., 1996. Possible sexual transmission of Q fever among humans. *Clin Infect Dis* 22, 1087-1088.
- Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanowska, S., 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science* 62, 299-300.
- La Scola, B., Lepidi, H., Raoult, D., 1997. Pathologic changes during acute Q fever: influence of the route of infection and inoculum size in infected guinea pigs. *Infection and immunity* 65, 2443-2447.
- Loftis, A.D., Reeves, W.K., Szumlas, D.E., Abbassy, M.M., Helmy, I.M., Moriarity, J.R., Dasch, G.A., 2006. Rickettsial agents in Egyptian ticks collected from domestic animals. *Experimental & applied acarology* 40, 67-81.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M., Weinstein, R.A., 2003. Q fever: a biological weapon in your backyard. *The Lancet Infectious Diseases* 3, 709-721.
- Marrie, T.J., Durant, H., Williams, J.C., Mintz, E., Waag, D.M., 1988. Exposure to parturient cats - a risk factor for acquisition of q-fever in maritime Canada. *Journal of Infectious Diseases* 158, 101-108.
- Marrie, T.J., Raoult, D., 1997. Q fever - a review and issues for the next century. *Int. J. Antimicrobial Agents* 8, 145-161.
- Marrie, T.J., Williams, J.C., Schlech, W.F., Yates, L., 1986. Q-fever pneumonia associated with exposure to wild rabbits. *Lancet* 1, 427-429.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Reviews* 12, 518-553.
- McCaughey, C., Murray, L.J., McKenna, J.P., Menzies, F.D., McCullough, S.J., O'Neill, H.J., Wyatt, D.E., Cardwell, C.R., Coyle, P.V., 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol. Infect.* 138, 21-27.
- Milazzo, A., Hall, R., Storm, P.A., Harris, R.J., Winslow, W., Marmion, B.P., 2001. Sexually transmitted Q fever. *Clin Infect Dis* 33, 399-402.

- Ministère de l'Agriculture, d.l.A., de la Pêche, de la Ruralité et de l'Anénagement du territoire, 2011. Arrêté du 27 Décembre 2011 modifiant les normes d'hygiène et de salubrité auxquelles doit répondre le lait cru livré en l'état et destiné à la consommation humaine.
- Muskens, J., van Engelen, E., van Maanen, C., Bartels, C., Lam, T.J., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet Rec* 168, 79.
- Ormsbee, R.A., Bell, E.J., Lackman, D.B., Tallent, G., 1964. The Influence of Phase on the Protective Potency of Q Fever Vaccine. *J Immunol* 92, 404-412.
- Peter, O., Dupuis, G., Peacock, M.G., Burgdorfer, W., 1987. Comparison of enzyme-linked-immunosorbent-assay and complement-fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of coxiella-burnetii antibody. *Journal of clinical microbiology* 25, 1063-1067.
- Pinsky, R.L., Fishbein, D.B., Greene, C.R., Gensheimer, K.F., 1991. An outbreak of cat-associated q-fever in the united-states. *Journal of Infectious Diseases* 164, 202-204.
- Porter, S.R., Czaplicki, G., Mainil, J., Guatteo, R., Saegerman, C., 2011. Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *International journal of microbiology* 2011, 248418.
- Rodolakis, A., 2006. Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small Rum. Res.* 62, 121-124.
- Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natorp, J.C., Vadet, J.P., Arricau-Bouvery, N., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* Shedding in Milk of Dairy Bovine, Caprine, and Ovine Herds. *J. Dairy Sci.* 90, 5352-5360.
- Roest, H.I.J., Tilburg, J., Van der Hoek, W., Vellema, P., Van Zijderveld, F.G., Klaassen, C.H.W., Raoult, D., 2011. The Q fever epidemic in The Netherlands : history, onset, response and reflection. *Epidemiology and infection* 139, 1-12.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., 2009a. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Applied and environmental microbiology* 75, 428-433.
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M., Gasnier, T., Duquesne, V., Thiery, R., Aubert, M.F., 2009b. Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 2, 188-189.
- Ryan, E.D., Kirby, M., Collins, D.M., Sayers, R., Mee, J.F., Clegg, T., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiology and infection*, 1-5.
- Sanford, S.E., Josephson, G.K., MacDonald, A., 1994. *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. *The Canadian veterinary journal* 35, 376-378.
- Schimmer, B., Dijkstra, F., Vellema, P., Schneeberger, P.M., Hackert, V., ter Schegget, R., Wijkmans, C., van Duynhoven, Y., van der Hoek, W., 2009. Sustained intensive transmission of Q fever in the south of the Netherlands, 2009. *Euro Surveill* 14.

- Schimmer, B., Luttikholt, S., Hautvast, J.L.A., Graat, E.A.M., Vellema, P., Duynhoven, Y.T.H.P.v., 2011. Seroprevalence and risk factors of Q fever in goats on commercial dairy goat farms in the Netherlands, 2009-2010. *BMC Veterinary Research* 7, (30 December 2011).
- Schimmer, B., Ter Schegget, R., Wegdam, M., Zuchner, L., de Bruin, A., Schneeberger, P.M., Veenstra, T., Vellema, P., van der Hoek, W., 2010. The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC infectious diseases* 10, 69.
- Scott, G.H., Williams, J.C., 1990. Susceptibility of *Coxiella burnetii* to chemical disinfectants. *Ann N Y Acad Sci* 590, 291-296.
- Sting, R., Breitling, N., Oehme, R., Kimmig, P., 2004. [The occurrence of *Coxiella burnetii* in sheep and ticks of the genus *Dermacentor* in Baden-Wuerttemberg]. *Dtw* 111, 390-394.
- Tainturier, D., 1987. Recurrent metritis due to Q fever in cows. *Recl. Med. Vet.* 163, 195-198.
- Tigertt, W.D., Benenson, A.S., Gochenour, W.S., 1961. Airborne Q fever. *Bacteriological reviews* 25, 285-293.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1264-1269.
- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am. J. Epidemiol.* 150, 67-74.
- van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkmans C, ter Schegget R, Hackert V, van Duynhoven Y, 2010. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill.* .
- van der Hoek, W., Meekelenkamp, J.C., Leenders, A.C., Wijers, N., Notermans, D.W., Hukkelhoven, C.W., 2011. Antibodies against *Coxiella burnetii* and pregnancy outcome during the 2007-2008 Q fever outbreaks in The Netherlands. *BMC infectious diseases* 11, 44.
- Vellema, P., Van den Brom, R., Dercksen, D.P., Moll, L., Roest, H.I.J., 2010. Research in relation to the approach of Q fever in the Netherlands. In, Q-fever conference, Breda, the Netherlands.
- Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., Kaplan, W., 1959. Q fever studies. XXI. The recovery of *Coxiella burnetii* from the soil and surface water of premises harboring infected sheep. *Am. J. Hyg.* 70, 14-20.
- Willeberg, P., Ruppanner, R., Behymer, D.E., Haghighi, S., Kaneko, J.J., Franti, C.E., 1980. Environmental exposure to *Coxiella burnetii*: a sero-epidemiologic survey among domestic animals. *Am. J. Epidemiol.* 111, 437-443.
- Woernle, H., Limouzin, C., Muler, K., Durand, M.P., 1985. La fièvre Q bovine - effets de la vaccination et de l'antibiothérapie sur l'évolution clinique et l'excrétion de coxiella dans le lait et les sécrétions utérines. *Bull. Acad. Vet. De France* 58, 91-100.
- Yanase, T., Muramatsu, Y., Ueno, H., Morita, C., 1997. Seasonal variations in the presence of antibodies against *Coxiella burnetii* in dairy cattle in Hokkaido, Japan. *Microbiology and immunology* 41, 73-75.

CHAPITRE 2

Séroprévalences intra-troupeau et facteurs de variation

1. Résumé de l'article 'Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds'

L'objectif de cette étude était de décrire la distribution de la séroprévalence intra-troupeau de l'infection par *Coxiella burnetii* parmi les vaches laitières et les génisses de troupeaux naturellement infectés et d'explorer son association avec des caractéristiques et pratiques d'élevage.

Pour ce faire, de Janvier 2008 à Décembre 2009, 100 troupeaux bovins laitiers naturellement infectés par *Coxiella burnetii* ont été recrutés sur la base d'au moins 50% de sérologies ELISA FQ positives sur un échantillon d'au moins 6 vaches et d'un résultat positif en PCR sur un prélèvement de placenta de vache ayant avorté dans le mois précédant l'inclusion. Dans chaque troupeau, un prélèvement de sang a été effectué sur la totalité des vaches laitières et des génisses de plus de 12 mois pour une recherche d'anticorps anti-*Coxiella burnetii* (kit ELISA FQ, LSI). Les caractéristiques et pratiques d'élevage relatives au vêlage, à la réforme, à la gestion des effluents, aux mouvements d'animaux et aux contacts avec le voisinage, ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire adressé aux éleveurs. La relation entre, d'une part les caractéristiques et pratiques d'élevage et d'autre part la séroprévalence intra-troupeau, a été explorée indépendamment chez les vaches laitières et les génisses. Chez les vaches laitières, elle a été étudiée au travers de l'association avec la variation de la séroprévalence intra-troupeau, à l'aide d'un modèle de régression linéaire multivariée. Et, chez les génisses, le risque d'avoir dans un troupeau au moins une génisse séropositive a été quantifié à l'aide d'un modèle de régression logistique.

La médiane de la séroprévalence intra-troupeau était de 0.32 (Q1=0.22 ; Q3=0.43). Chez les génisses, la séroprévalence intra-troupeau observée était faible (Q1=0 ; Q2=0.01 ; Q3=0.10) et chez les vaches laitières élevée, mais variable (Q1=0.28 ; Q2=0.42 ; Q3= 0.56). Peu de caractéristiques et pratiques d'élevages sont ressorties significativement ($P<0.10$) associées aux séroprévalences intra-troupeau. La séroprévalence intra-troupeau chez les vaches était significativement plus élevée dans les troupeaux avec plus de 46 vaches (+11%) et significativement moins élevée dans ceux qui ne pratiquaient pas le regroupement des vêlages (-8%), et dans ceux où les vaches n'étaient pas en contact avec d'autres ruminants en pâture ou à travers les haies (-10%). Le risque d'avoir au moins une génisse séropositive dans le troupeau était plus élevé dans les troupeaux pratiquant le regroupement des vêlages (OR=2.7 ;

IC95% [1.11-7.87]) et dans ceux où les fœtus et/ou placentas n'étaient pas systématiquement ramassés après avortement (OR=2.9 ; IC95% [1.02-7.32]).

Ces résultats confirment que peu de génisses sont détectées infectées et à l'opposé que la séroprévalence intra-troupeau observée chez les vaches laitières est variable entre troupeaux. Parmi les caractéristiques et pratiques d'élevage associées à la séroprévalence intra-troupeau chez les vaches ou les génisses, seule l'hygiène au vêlage est facilement modifiable. Ainsi, afin de limiter l'infection par *Coxiella burnetii* dans les élevages infectés, l'application de pratiques d'hygiène strictes est un élément important. Compte-tenu du faible nombre de pratiques modifiables pouvant influencer sur la séroprévalence intra-troupeau, les mesures médicales, par exemple la vaccination, apparaissent comme un moyen de protéger les animaux sains, même dans les troupeaux infectés du fait de son efficacité rapportée dans la littérature à prévenir l'excrétion chez les animaux détectés comme non porteurs d'anticorps et non excréteurs. Les génisses sont confirmées comme cible de choix pour la vaccination du fait de la faible séroprévalence intra-troupeau observée. Compte tenu de la variabilité de la séroprévalence intra-troupeau observée chez les vaches laitières, la vaccination pourrait toujours présenter un intérêt dans certaines situations de faible séroprévalence qu'il serait intéressant de pouvoir déterminer de façon pratique (rapide et à faible coût).

2. Article ‘Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds’

Anne-Frieda Taurel^{1,2,3,4*}, Raphaël Guatteo^{1,2,3}, Alain Joly⁴, Henri Seegers^{1,2,3}, François Beaudou^{1,2,3}

¹ONIRIS, UMR 1300 Bio-Agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, F-44307, France ;

²INRA, UMR 1300 Bio-Agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, F-44307, France ;

³L’UNAM, Nantes, F-44200, France ;

⁴Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire, Vannes, F-56000, France ;

Preventive Veterinary Medicine, August 2011, 101 (1-2): 51-57

2.1. Abstract

Coxiella burnetii is the causal agent of Q fever, a worldwide spread zoonosis. Prevention of *C. burnetii* shedding in cattle is critical to control the spread of the pathogen between animals, and from animals to humans. Vaccination with a phase 1 vaccine has been shown to be effective in preventing shedding when implemented in still susceptible animals, even in infected cattle herds. The identification of these animals (dairy cows and nulliparous females) as targets for vaccination consequently is crucial. Hygiene measures conventionally also are implemented, but their relative impact on *C. burnetii* diffusion remains unknown. The objectives of this study therefore were to (i) describe the distribution of the within-herd apparent seroprevalence among cows and nulliparous females and (ii) to explore the association between management practices and herd characteristics on the one hand, and these seroprevalences on the other. In a sample of 100 naturally and clinically infected dairy herds, blood samples were taken systematically from all nulliparous females (older than 12 months) and cows, and serologically tested. Information on herd characteristics and management practices were collected through a questionnaire filled in by each farmer.

The variation in within-herd seroprevalence among cows and the risk for a herd of having at least one seropositive nulliparous female were investigated using multivariate (linear and logistic respectively) regression models. Median within-herd seroprevalence was 0.32 (Q1 =

0.22; Q3 = 0.43). We observed a low to null (median = 0.01; Q1 = 0; Q3 = 0.10) withinherd seroprevalence in nulliparous females contrary to a high value (median = 0.42) and variability (Q1 = 0.28; Q3 = 0.56) in cows. Only a few herd characteristics and management practices were found to be related to seroprevalence. Within-herd seroprevalence in cows was found to be significantly ($P < 0.10$) higher in herds (i) with a number of cows < 46 , (ii) with seasonal calving, and (iii) with grazing or contact through the fence with other ruminant herds. The risk of having at least one seropositive nulliparous female was increased in herds (i) with seasonal calving and (ii) where the foetus and/or the placenta of aborted cows were not systematically removed. Our findings support, in addition to the implementation of high level of hygiene measures, the relevance of vaccination (at least in nulliparous females) as a method to control the spread of *C. burnetii* within an infected herd, as vaccination is effective in susceptible animals and given that nulliparous females are mostly not infected even in infected herds.

2.2. Introduction

Q fever is a worldwide distributed zoonosis caused by *Coxiella burnetii*. Numerous species (arthropods, birds and mammals) can be infected. Q fever infection in humans usually is asymptomatic but it can induce acute (flu-like illness, pneumonia or hepatitis) or chronic (fatigue syndromes, endocarditis, abortion, stillbirth) disease (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). In livestock, which is considered to be the main reservoir for human infection, *Coxiella burnetii* infection can lead to abortion, stillbirth and metritis (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Livestock mainly shed *Coxiella burnetii* in birth products, faeces, urine, milk, and vaginal mucus (Welsh et al., 1958; Berri et al., 2001; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Guatteo et al., 2006b; Guatteo et al., 2007b). Contamination mainly occurs by inhalation of contaminated aerosols generated by shedding animals. As *Coxiella burnetii* is highly resistant, the environment also is an important source of contamination (Welsh et al., 1959; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). To limit human and animal infection, decreased exposure to both shedding animals and contaminated environments is critical.

Hygienic measures focusing on the calving period (e.g. destruction of placentas, specific calving box cleaned and disinfected after each calving period) and the management of manure (e.g. treatment of manure and limiting its wind-borne spread) can be implemented in infected

herds (Arricau-Bouvery et al., 2001; Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). However, the relative impact of these actions and of other management practices and herd characteristics on *Coxiella burnetii* diffusion within a herd has not been investigated to date.

Among the medical measures available, the use of a phase I vaccine on non-infected cattle has been shown to be highly efficient in preventing them from shedding when exposed to the infection (Biberstein et al., 1977; Guatteo et al., 2008). As vaccination is routinely recommended for infected herds, it is crucial, to ensure its efficacy, to target its use to the animal categories that remain susceptible. A previous study showed that no or few nulliparous females were detected as being infected (Guatteo et al., 2008). This study furthermore found a wide range of within-herd infection prevalence in cows; however, only six herds were included in the study sample. These findings nevertheless suggest that relevant target populations for vaccination may be nulliparous females and, when within-herd infection prevalence is low, cows.

The objectives of the present study were, in naturally and clinically infected dairy herds, (i) to describe the distribution of the within-herd apparent prevalence rates of seropositive cows and nulliparous females and (ii) to explore the association between management practices and herd characteristics on the one hand, and these seroprevalence rates on the other.

2.3. Materials and Methods

2.3.1. Herds

This study was carried out in 2008 and 2009 on a sample of 100 dairy herds located in western France that were known to be naturally and clinically infected by *Coxiella burnetii*. All herds that fulfilled the following requirements were included: detection of *Coxiella burnetii* by PCR on the placenta of at least one aborted cow within the month before the possible inclusion, no implementation of vaccination directed against *C. burnetii* within the previous five years and no antibiotic (i.e. tetracycline) treatment of reproductive tract disorders, such as metritis or abortion, within the previous six months.

2.3.2. Data collection

In each of the herds selected, blood samples were collected from all dairy cows and nulliparous females older than 12 months. Samples were immediately sent to the laboratory (Institut Départemental d'Analyses et de Conseil, Nantes, France) to be tested using the Q fever LSI ELISA kit (LSI, Lissieu, France) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in an optical density Sample/Positive control (S/P) ratio. A serum sample was considered to be positive when the S/P ratio of serum was > 40 , and seronegative otherwise. On the same day, data concerning herd characteristics and management practices assumed to be at risk (herd characteristics, culling and calving practices, management of livestock waste, animal movement and mixing, and neighbouring contacts) were collected using a questionnaire filled in by each farmer (**Table 2- 1**). For the management of straw manure, the different patterns of answers were summarized in three classes: straw manure totally isolated according to regulations (no contact with ground or wind), no isolation at all (on the ground without any fence or roof), and other.

Table 2- 1 : Definition, mean and distribution of explanatory variables in herds

Definition of variables level	Percentage of herds	Mean (95% CI) within-herd seroprevalence of cow	% of herds with within-herd seroprevalence of nulliparous females >0
Herds characteristics			
Number of cows*:			
- < 46	24	0.50 (0.42; 0.58)	50
- ≥ 46	76	0.41 (0.37; 0.46)	50
Average milk production L / cow/ year:			
- < 6000	17	0.43 (0.35; 0.50)	65
- [6000 ; 7000 [28	0.48 (0.39; 0.56)	46
- [7000 ; 8000[31	0.42 (0.35; 0.50)	48
- ≥ 8000	24	0.40 (0.33; 0.48)	46
Type of cow housing:			
- Cubicles	45	0.45 (0.39; 0.51)	51
- Stalls	55	0.42 (0.37; 0.48)	49
Other animal production in the farm:			
- Other ruminants	40	0.41 (0.35; 0.47)	55
- Others	27	0.45 (0.37; 0.53)	48
- No	33	0.45 (0.38; 0.53)	45
Type of service*:			
- Artificial insemination	68	0.47 (0.42; 0.52)	50
- Artificial insemination & natural service	32	0.36 (0.30; 0.42)	50
Calving practices			
Seasonal calving*			
- Yes	24	0.48 (0.39; 0.56)	67
- No	76	0.42 (0.38; 0.47)	45
Systematic removal of the placenta and/or foetus of aborted cows :			
- Yes	75	0.42 (0.38; 0.47)	44
- Other	25	0.46 (0.38; 0.47)	68
Use and hygiene of calving box :			
- No calving box	20	0.43 (0.34; 0.52)	50
- Box with several use, not systematically cleaned	48	0.42 (0.37; 0.48)	58
- Box with several use, systematically cleaned	14	0.50 (0.38; 0.62)	50
- Specific calving box, not systematically cleaned	14	0.47 (0.35; 0.58)	29
- Specific calving box, cleaned after each calving	4	0.27 (0.18; 0.35)	25
Isolation of the aborted cows*:			
- Yes	7	0.33 (0.22; 0.43)	43
- No	93	0.44 (0.40; 0.48)	50

* Variables significance at $P < 0.25$

Table 2-1: Definition, mean and distribution of explanatory variables in herds (continued)

Definition of variables level	Percentage of herds	Mean (95% CI) within-herd seroprevalence of cow	% of herds with within-herd seroprevalence of nulliparous females >0
Culling			
Animals culling in relation to Q fever status (PCR, ELISA)			
- Yes	11	0.44 (0.35; 0.52)	45
- No	89	0.43 (0.39; 0.48)	51
Management of livestock waste			
Management of the straw manure:			
- Conform to legislation	17	0.43 (0.33; 0.52)	53
- Others	38	0.42 (0.35; 0.49)	47
- No isolation at all	45	0.45 (0.39; 0.50)	51
Liquid manure coming from:			
- The farm	66	0.42 (0.38; 0.47)	53
- The farm and other farms	34	0.46 (0.38; 0.53)	44
Animals movement and mixing			
Animal purchase in the year before inclusion*			
- Yes (≥ 1)	55	0.41 (0.36; 0.45)	54
- No	45	0.47 (0.40; 0.54)	44
Quarantine for purchased animals			
- Yes	9	0.46 (0.35; 0.57)	44
- No	91	0.43 (0.39; 0.47)	51
Neighbouring contact			
Persons in contact with cattle having some activities in other farms			
- Yes	23	0.45 (0.35; 0.55)	48
- No	77	0.43 (0.39; 0.47)	51
Grazing and/or contact through the fence with other ruminants herds*			
- Yes	41	0.49 (0.43; 0.55)	56
- No	59	0.40 (0.34; 0.45)	46
Use of mutualised farm equipment			
- Yes	84	0.44 (0.40; 0.49)	50
- No	16	0.39 (0.29; 0.49)	50

* Variables significance at $P < 0.25$

2.3.3. Strategy of analysis

The statistical unit was the herd. In a first step, we described three apparent within-herd seroprevalence rates depending on the category of concerned animals: P_N (on nulliparous females), P_C (on dairy cows), and P_H (on nulliparous females and dairy cows). These seroprevalence rates were calculated as the number of animals detected seropositive over the total number of animals in each category. In a second step, the impact of herd characteristics and management practices was assessed. As a preliminary analysis reported a low variability of P_N , with no nulliparous females testing seropositive in 50 out of the 100 herds studied, a variable P_{ND} was created after dichotomization of P_N (herds with $P_N = 0$ vs. herds with $P_N > 0$ (i.e. comprising at least one seropositive nulliparous female)). Therefore the dependent variables were P_C (within-herd seroprevalence in cows) and P_{ND} (describing the herd-status among nulliparous females). The questionnaire provided to farmers was organized in six subsets (general herds characteristics, culling practices, calving practices, management of livestock waste, animals movement and putative neighbouring contact) related to the risk of introduction and/or diffusion of *Coxiella burnetii*. To build the variables, elementary information was gathered to create classes ranked by increasing risk (*a priori* no risk to maximum risk) and that comprised at least five herds to increase statistical power. The relationships between respectively P_C and P_{ND} and the putative explanatory variables were assessed in two stages. In the first stage, a univariate analysis relating the dependent variables to each explanatory variable was performed. Colinearity was tested between the explanatory variables using a chi square test. To assess the influence of management practices and herd characteristics on P_C , the second stage involved a GLM procedure (proc GLM, SAS Institute Inc., 1999) which included all factors retained after the first screening (P-value < 0.25; student's test or ANOVA). The variable with the highest P-value was removed, and the model was rerun until all variables had a P-value < 0.10. For P_{ND} , the second stage involved a logistic regression procedure (proc logistic, SAS Institute Inc., 1999) which included all factors retained after the first screening (P-value < 0.25; likelihood ratio Chi² test). The statistical significance of the variables in the model was assessed by the likelihood ratio test with a backward selection to exclude variables with a P-value > 0.10. The goodness-of-fit test of the final model was based on the Hosmer-Lemeshow test (Hosmer and Lemeshow, 1989).

2.4. Results

2.4.1. Seroprevalences

The included herds had a mean size of 62 cows and 25 nulliparous females older than 12 months. A total of 6,187 and 2,452 serums were collected respectively from cows and nulliparous females. The distribution of apparent within-herd seroprevalences P_H , P_N and P_C are displayed in **Table 2- 2**. While the median P_C was quite high with a wide range, we observed a quite systematic, very low or null P_N . In herds with $P_N > 0$, P_C was significantly ($P < 0.05$) higher (**Figure 2- 1**).

Table 2- 2 : Distribution of *Coxiella burnetii* within-herd seroprevalence, calculated for each herd, in the population of cows, of nulliparous females, and in the whole herd (100 naturally infected dairy herds)

Population	Within-herd seroprevalence				
	5 th percentile	Quartile 1	Median	Quartile 3	95 th percentile
Herd	0.10	0.22	0.32	0.43	0.60
Nulliparous females	0.00	0.00	0.01	0.10	0.33
Cows	0.13	0.28	0.42	0.56	0.75

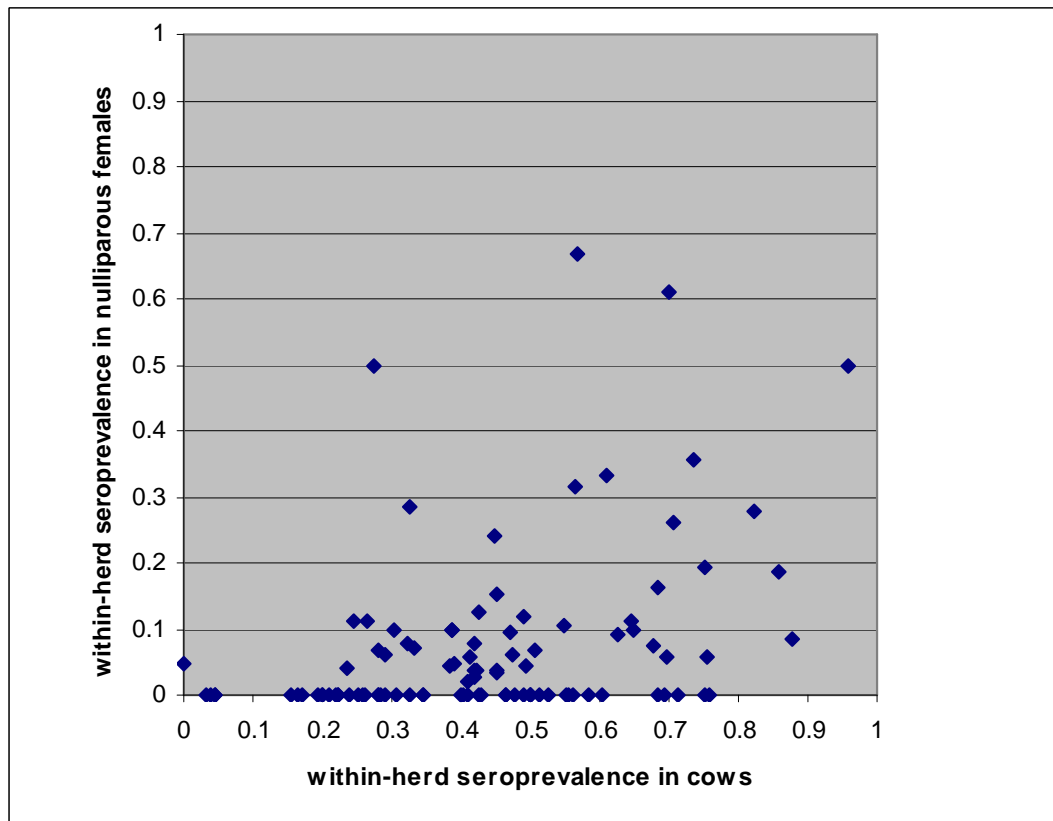


Figure 2- 1 : Relationship between the apparent within-herd seroprevalence in cows and nulliparous females in 100 naturally infected dairy cattle herds

2.4.2. Influence of management practices and herd characteristics

The Shapiro-Wilk test confirmed that the within-herd seroprevalence P_C was normally distributed ($P = 0.46$). The mean and standard deviation of P_C according to the classes of the explanatory variables are displayed in [Table 2- 1](#). The univariate analysis allowed us to retain six variables. The following management practices and herd characteristics were linked to higher apparent seroprevalence:

- cows serviced only through artificial insemination,
- no isolation of aborted cows,
- grazing and/or contact through the fence with other ruminant herds,
- seasonal calving,
- no purchase of cattle,
- number of cows in the herd < 46.

CHAPITRE 2 : Séroprévalences intra-troupeau et facteurs de variation

As type of service was strongly associated with animal purchase ($P < 0.0001$) and number of cows ($P < 0.004$), it was not included in the multivariate model. The final GLM model retained three variables (**Table 2- 3**). The seroprevalence P_C was significantly higher in herds comprising less than 46 cows, herds with seasonal calving, and herds with grazing or contact through the fence with other ruminant herds (**Table 2- 3**).

Table 2- 3: Results of analysis of variance for variables significantly ($P < 0.10$) associated with *Coxiella burnetii* within-herd seroprevalence in cows (PC)

Variables	Level	Estimate	90% CI
Number of cows	- < 46	+ 0.112	(0.036; 0.188)
	- \geq 46	-	
Seasonal calving	-No	- 0.079	(- 0.155; - 0.003)
	-Yes	-	
Grazing or contact through the fence with other ruminants herds	-No	- 0.100	(- 0.165; - 0.035)
	-Yes	-	

Intercept = 0.527 (0.452; 0.602), R-square = 0.12, P-value = 0.0074

Concerning P_{ND} , univariate logistic regression allowed us to identify two factors:

- seasonal calving
- non systematic removal of the foetus and/or placenta of aborted cows

The final multivariate logistic regression model retained these two variables (**Table 2- 4**).

Table 2- 4: Result of logistic regression for variables significantly ($P < 0.10$) associated with the *Coxiella burnetii* herd-status among nulliparous females (herds with no seropositive nulliparous females vs. herds at least one seropositive nulliparous females)

Variables	Level	OR	95% Wald CI
Seasonal calving	-Yes	2.73	1.02 - 7.32
	-No		
Systematic removal of the foetus and/or placenta of aborted cow	-Other	2.96	1.11 - 7.87
	-Yes		

Hosmer-Lemeshow test: P-value = 0.6425

2.5. Discussion

The aim of this study was to describe, in 100 naturally and clinically infected dairy cattle herds, the distribution of the within-herd apparent prevalence of seropositive animals among cows and nulliparous females and to quantify the impact of management practices and herd characteristics on these within-herd seroprevalences.

To our knowledge, this is the first description of the within-herd seroprevalence in cows and nulliparous females done on such a large scale, especially in naturally and clinically affected dairy herds. The only similar seroprevalence study based on an exhaustive sampling of both cows (lactating and dried off) and nulliparous females was carried out on a very small number of herds (n=6) (Guatteo et al., 2008). Other within-herd seroprevalence studies were based on either (i) a non exhaustive sampling within randomly selected herds (Scolamacchia et al., 2010) or (ii) the use of a less sensitive test (Complement Fixation Test) in only one herd (Literak, 1995).

Our finding of a quite systematically low to null within-herd seroprevalence in nulliparous females is consistent with previous studies (Guatteo et al., 2008; Scolamacchia et al., 2010). McCaughey (2010) reported that older animals had increased odds of having been infected (most often after first calving). This confirms that nulliparous females should be the target population for vaccination. The use of the phase I vaccine furthermore already has been demonstrated to be efficient in preventing shedding in still susceptible animals (Guatteo et al., 2008). The low within-herd seroprevalence among nulliparous females, even in herds with a high seroprevalence in cows, could be explained in part by the fact that nulliparous females and cows frequently are housed in different buildings in the study area. This highlights the need to vaccinate nulliparous females before they are introduced to, and then exposed within, the adult group. Regarding the within-herd seroprevalence in cows, a wide range of values was observed. The median value obtained (42%) is consistent with results provided by similar study designs (around 40%; (Guatteo et al., 2008; Scolamacchia et al., 2010)). However, while 75% of the herds had a cow seroprevalence of above 30%, low seroprevalence rates were observed in a few herds. The vaccination of adult cattle in such herds consequently could be relevant. In routine practice, the main constraint on the estimation of within-herd seroprevalence in cows is the time and cost of exhaustive blood sampling and testing. An easier and cheaper method could be to assess this within herd seroprevalence with an ELISA

performed on a bulk-tank milk sample, as done, for example, in BVDV monitoring. Further research on the informative value of such an ELISA applied to bulk-tank milk (BTM) to estimate the within-herd seroprevalence in lactating cows is needed. Nevertheless, our present findings can help to optimize the implementation scheme of vaccination in clinically infected dairy herds.

The few studies that investigated the putative determinants of *Coxiella burnetii* infection focused on the risk of being infected (*i.e.* seronegative vs. seropositive herds) (Capuano et al., 2004; Agger et al., 2010b; McCaughey et al., 2010), rather than on the within-herd *Coxiella burnetii* diffusion, measured using within-herd seroprevalence, as was the focus in our study.

Putative at risk herd characteristics and management practices were investigated using 17 explanatory variables. For each variable, the classes were built to be ranked by increasing risk (*a priori* no risk to maximum risk) of diffusion and to include a minimum of 5% of the herds involved. However, such an approach resulted in equal risks being attributed to the practices gathered within the same class. This may have been why the final GLM model (Table 3) had a low ability (Rsquare = 0.12) to explain variations in the within-herd seroprevalence in cows. The cross-sectional design of our study also may not have been entirely suited to the investigation of the risk factors of pathogen diffusion because it did not allow us to date the time of first infection (*i.e.* date of introduction of *Coxiella burnetii* within the herd). Thus, in the case of recent infection, some practices may erroneously have been considered to be not at risk because not enough time had elapsed for their putative effect to be observed.

The within-herd apparent seroprevalence in cows was found to be higher in herds (*i*) with a number of cows < 46, (*ii*) where grazing or contact through the fence with other ruminant herds were allowed, and (*iii*) with seasonal calving. In addition, the herds with at least one seropositive nulliparous female also reported seasonal calving and did not systematically remove the foetus and/or the placenta of aborted cows. The lower within-herd apparent seroprevalence in cows in “large” herds appears unexpected compared to previous studies (Agger et al., 2010b; McCaughey et al., 2010; Ryan et al., 2010). However, due to differences in design, it is difficult to compare our results with those of these studies. Ryan *et al.* (2010), reported large size (at least 140 cows) as a risk factor for evidence of *Coxiella burnetii* infection in a herd, using ELISA applied to BTM, but they did not investigate the effect of herd size on within-herd seroprevalence in infected herds. Agger *et al.* (2010) reported a

positive correlation between herd size and the S/P ratio of an ELISA applied on BTM. However, to our knowledge, the informative value of an ELISA applied to BTM to estimate within-herd seroprevalence is unknown. Consequently, it is impossible to conclude that a higher S/P ratio in BTM corresponds to higher within-herd seroprevalence. Lastly, McCaughey *et al.* (2010) reported a higher proportion of herds containing at least one seropositive animal in herds with at least 100 animals; however, in this study only 8% of the herds had more than 100 animals. The cut-off value retained in our study (1st quartile of the observed distribution, i.e. 46 cows) to distinguish the so-called large and small herds thus corresponds to the small and medium herd sizes of other studies (McCaughey *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2010), for which no difference was reported in terms of seroprevalence. Additionally, in these studies (McCaughey *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2010), seroprevalence was estimated at the animal level based on a sampling of 20 animals in each herd, not on an exhaustive sampling. There are several possible explanations of the relationship observed in our study. For a same number of infected animals, the proportion of infected animals, *i.e.* the within-herd seroprevalence, will be higher in herds with a lower herd size, or the so called “small” herds. We also cannot exclude that “small” herds could be managed differently (here not investigated) compared to “large” herds; for instance, animal density in stalls could be higher in smaller herds. Moreover, the difference in seroprevalence between “small” and “large” herds, although significant ($P < 0.10$), remained moderate.

Grazing or contact through the fence with other ruminant herds, seasonal calving, and a failure to remove the placenta and/or foetus of aborted cows expose the whole herd (nulliparous females and dairy cows) to a higher probability of contact with infectious aerosols and to a greater exposure to contaminated birth products because there is a higher risk of *Coxiella burnetii* shedding during the calving period (To *et al.*, 1998; Tissot-Dupont *et al.*, 1999). These findings are consistent with our biological assumptions. From a practical point of view, as herd size and seasonal calving are closely linked to the farming system and therefore cannot be modified easily, vaccination using a phase I vaccine could be particularly relevant for herds with such characteristics, especially apply to the replacement animals in these herds. When possible, grazing and contact through the fence with other ruminant herds should be avoided. Furthermore, hygienic measures related to calving (e.g. the systematic removal of placenta and/or foetus of aborted cows) appear pivotal to prevent the diffusion of *Coxiella burnetii* within the whole herd. Overall, our results highlight the value of combining

medical and non medical measures, especially around parturition, as already has been reported (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005).

We did not find higher seroprevalence in herds where farmers purchased at least one animal during the preceding year. Purchase can be considered to be a practice that is at risk in relation to the introduction of the pathogen rather than within-herd diffusion. A recent study made in Denmark (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010) reported an increased risk of becoming infected with *Coxiella burnetii* for herds where farmers buy cattle from other herds. Therefore, as a general rule, the purchase of animals should be avoided as much as possible, even if tests before introduction are implemented. Owing to the lack of sensitivity of the available ELISA tests, the purchase of an animal that has tested negative nevertheless may introduce the infection if the test result is a false negative.

The different types of livestock waste management also were not found to be associated with within-herd seroprevalence. This finding may be consistent with recent findings supporting that the temperature reached in composted manure is not favourable for the survival of *Coxiella burnetii* (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

2.6. Conclusion

To conclude, this descriptive, large-scale study of *Coxiella burnetii* infected herds confirmed a high level and variability of within-herd seroprevalence in cows and, in contrast, a low to null seroprevalence in nulliparous females. Only a few management characteristics were found to be related with seroprevalence. Given that vaccination is effective in susceptible animals and that nulliparous females remain largely uninfected even in infected herds, our findings suggest that the vaccination of nulliparous females (at the minimum) should be included alongside strict hygienic measures to control the spread of *Coxiella burnetii* within infected herds.

Acknowledgements

The authors wish to thank all of the farmers, veterinarians and staff involved in this study (especially Jean-Yves Audiart and Gaël Besseau), the members of the laboratory IDAC (Nantes, France) for their technical assistance, and the Groupements de Défense Sanitaire of Western France and the Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) for their financial support.

References

- Agger, J.F., Paul, S., Christoffersen, A.B., Agerholm, J.S., 2010. Biosecurity and presence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish dairy herds. SVEPM. Nantes.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet. Res. 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A., 2001. Etude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique - Study of *Coxiella burnetii* excretion in an experimental goat model and decontamination of dung with calcium Cyanamid. Renc. Rech. Rum., pp. 153-156.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet Rec. 148, 502-505.
- Biberstein, E.L., Riemann, H.P., Franti, C.E., Behymer, D.E., Ruppner, R., Bushnell, R., Crenshaw, G., 1977. Vaccination of dairy cattle against Q fever (*Coxiella burnetii*): results of field trials. Am. J. Vet. Res. 38, 189-193.
- Capuano, F., Parisi, A., Cafiero, M.A., Pitaro, L., Fenizia, D., 2004. [*Coxiella burnetii*: what is the reality?]. Parassitologia 46, 131-134.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010. Scientific Opinion on Q Fever. EFSA Journal. p. 114.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. Vet. Res. 37, 827-833.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. Vet. Res. 38, 849-860.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. Vaccine 26, 4320-4328.
- Literak, I., 1995. [Occurrence of *Coxiella burnetii* antibodies in cattle, sheep and small terrestrial mammals in the western region of Bohemia]. Veterinarni medicina 40, 77-80.
- McCaughey, C., Murray, L.J., McKenna, J.P., Menzies, F.D., McCullough, S.J., O'Neill, H.J., Wyatt, D.E., Cardwell, C.R., Coyle, P.V., 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. Epidemiol. Infect. 138, 21-27.
- Ryan, E.D., Kirby, M., Collins, D.M., Sayers, R., Mee, J.F., Clegg, T., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. Epidemiology and infection, 1-5.
- Scolamacchia, F., Handel, I.G., Fevre, E.M., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvort, B.M., 2010. Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. PloS one 5, e8623.
- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. Am. J. Epidemiol. 150, 67-74.

To, H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1998. Prevalence of *Coxiella burnetii* Infection in Dairy Cattle with Reproductive Disorders. J. Vet. Med. Sci. 60, 859-861.

Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., 1958. Air-borne transmission of Q fever : the role of parturition in the generation of infective aerosols. Ann. NY. Acad. Sci. 70, 528-540.

Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., Kaplan, W., 1959. Q fever studies. XXI. The recovery of *Coxiella burnetii* from the soil and surface water of premises harboring infected sheep. Am. J. Hyg. 70, 14-20.

3. Résumé de l'article 'Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows'

L'objectif de cette étude était d'évaluer la valeur informative du niveau d'anticorps anti-*Coxiella burnetii* dans le lait de tank pour estimer la séroprévalence intra-troupeau de l'infection par *Coxiella burnetii* parmi les vaches laitières en lactation de troupeaux naturellement infectés.

Pour ce faire, de Février 2008 à Juin 2010, 55 troupeaux bovins laitiers naturellement infectés par *Coxiella burnetii* ont été recrutés sur la base d'au moins 50% de sérologies ELISA FQ positives sur un échantillon d'au moins 6 vaches et d'un résultat positif en PCR sur un prélèvement de lait de tank ou sur un prélèvement de placenta de vache ayant avorté dans le mois précédent l'inclusion. Dans chaque troupeau, de façon concomitante, un prélèvement de lait de tank et un prélèvement de sang ont été effectués sur la totalité des vaches laitières en lactation pour une recherche d'anticorps anti-*Coxiella burnetii* (kit ELISA FQ, LSI). Les résultats étaient exprimés par le ratio de densité optique du prélèvement (S) sur le contrôle positif (P) (ratio S/P). Les résultats des sérums ont été classés en 5 catégories ($S/P \leq 40$ =négatifs, $40 < S/P \leq 100$ =faiblement positifs, $100 < S/P \leq 200$ =positifs, $200 < S/P \leq 300$ =fortement positifs, et $S/P > 300$ =très fortement positifs), et ceux du lait de tank en 4 catégories ($S/P \leq 30$ =négatifs, $30 < S/P \leq 100$ =faiblement positif, $100 < S/P \leq 200$ =positif et $S/P > 200$ =fortement positif).

Dans un premier temps, la relation linéaire entre le niveau d'anticorps et la séroprévalence intra-troupeaux des vaches en lactation, ajustée du nombre d'animaux contribuant au lait de tank et de la proportion de primipares, a été testée à l'aide d'une régression linéaire multivariée.

La relation entre les 4 classes de niveau d'anticorps dans le lait de tank et la séroprévalence intra-troupeau des vaches laitières en lactation, ajustée sur le nombre d'animaux contribuant au lait de tank et de la proportion de primipares parmi eux, a été étudiée à l'aide d'une analyse de variance. Afin de distinguer si la relation entre le niveau d'anticorps et la séroprévalence intra-troupeaux était liée au nombre d'animaux séropositifs ou à la présence dans les troupeaux des quelques animaux fortement ou très fortement séropositifs avec un ratio $S/P > 200$, la relation entre le niveau d'anticorps dans le lait de tank et le nombre d'animaux

ayant un résultat sérologique de ratio S/P>200, ajustée sur le nombre d'animaux contribuant au tank, a été étudiée à l'aide d'une régression de Poisson.

Parmi les laits de tank analysés, 50 avaient un résultat ELISA positif, permettant d'estimer la sensibilité du test ELISA sur le lait de tank à détecter les troupeaux infectés à 91% (IC95% : [85-99]). La relation linéaire entre niveau d'anticorps dans le lait de tank et la séroprévalence intra-troupeau des animaux contribuant au tank était modérée ($R^2=0,15$, $P=0,005$). La relation entre le niveau d'anticorps dans le lait de tank et le nombre d'animaux fortement séropositifs (résultat sérologique de ratio S/P>200) était positive. Le niveau d'anticorps dans le lait de tank augmentait avec le nombre d'animaux séropositifs et le nombre d'animaux fortement séropositifs (résultat sérologique de ratio S/P>200) contribuant au lait de tank. Lorsque le lait de tank était classé par catégorie de niveau d'anticorps, les séroprévalences les moins élevées étaient observées dans les classes de niveau d'anticorps du lait de tank les moins élevées. La séroprévalence moyenne était de 0,20 (IC95% : (0,02-0,38) ; $P\text{-value}=0,029$) lorsque le résultat de l'ELISA lait de tank était de $30 < S/P \leq 100$, et elle était de 0,40 (IC95% : (0,26-0,54) ; $P\text{-value} < 0,0001$) et 0,37 (IC95% : (0,23-0,51) ; $P\text{-value} < 0,0001$) lorsque le résultat de l'ELISA lait de tank était, respectivement, de $100 < S/P \leq 200$ et $S/P > 200$.

Cette étude montre que si le lait de tank ne permet pas d'estimer de façon précise la séroprévalence intra-troupeau des vaches en lactation, il pourrait permettre d'identifier à moindre coût des troupeaux où la séroprévalence intra-troupeau observée est inférieure en moyenne à 20%. Dans ces troupeaux, la vaccination des vaches laitières, en plus de celle des génisses (majoritairement sensibles même en troupeaux infectés), pourrait avoir un impact dans le contrôle de l'infection du fait de l'efficacité de la vaccination chez les animaux sensibles (détectés non porteurs d'anticorps et non excréteurs) et de la proportion d'animaux sensibles que l'on peut attendre dans des troupeaux à faible séroprévalence intra-troupeau. De plus, l'ELISA appliquée au lait de tank pourrait être un outil de suivi épidémiologique à grande échelle permettant de suivre l'évolution du statut sanitaire des troupeaux vis-à-vis de la fièvre Q et de détecter les troupeaux infectés. Cette utilisation est cependant limitée aux troupeaux où il n'y a pas eu de vaccination dans la mesure où il n'existe pas d'ELISA DIVA (différentiation entre animaux vaccinés et infectés) disponible actuellement.

4. Short report ‘Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows’

Anne-Frieda Taurel^{1,2,3,4*}, Raphaël Guatteo^{1,2,3}, Alain Joly⁴, François Beaudeau^{1,2,3}

¹ONIRIS, UMR 1300 Bio-Agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, F-44307, France ;

²INRA, UMR 1300 Bio-Agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, Nantes, F-44307, France ;

³LUNAM, F-44200, France ;

⁴Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire, Vannes, F-56000, France ;

Epidemiology and Infection, Published online November 2011, DOI:

10.1017/S0950268811002275, 1-4

4.1. Abstract

The relationship between the level of antibodies in bulk tank milk (BTM) and the within-herd seroprevalence (WHP) of *Coxiella burnetii* in cows was assessed. Blood from milking cows and BTM were sampled in 55 infected herds and tested using commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The relationship between antibody levels and WHP, which was quantified using a general linear model, was only moderate ($R^2=0.15$). Nevertheless, the lowest antibody level in BTM was associated with the lowest mean within-herd prevalence.

The present finding indicates that ELISA applied to BTM could identify infected herds with quite low within-herd seroprevalence. For such herds, the vaccination of dairy cows as well as nulliparous heifers using a phase I vaccine could effectively prevent *Coxiella burnetii* shedding.

4.2. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows

Given the public and animal health concerns related to *Coxiella burnetii* infection (Q fever), the control of this disease is crucial. As ruminants are the main reservoir (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005), decreasing the exposure of humans and animals to shedder ruminants is key to limiting the spread of the infection.

The vaccination of dairy cattle using a phase I vaccine was shown to be effective in preventing *C. burnetii* shedding when applied to non-infected animals (Guatteo et al., 2008). Previous studies conducted in infected cattle herds reported that most nulliparous heifers were not infected (Guatteo et al., 2008; Scolamacchia et al., 2010; Taurel et al., 2011a). However, the within-herd prevalence (WHP) of infected dairy cows varied widely between herds. Therefore, the WHP of dairy cows needs to be determined prior to vaccination to confirm the relevance of the procedure on this category of animal.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) applied to milk or serum (Guatteo et al., 2007c) currently is recognised as the most suitable serological method to identify ruminants infected by *C. burnetii*. Under the assumption that the level of antibodies in Bulk Tank Milk (BTM) could increase with the increased prevalence of seropositive cows, as well as the proportion of highly seropositive cows in a herd, ELISA applied to BTM could be an efficient, cost-effective, alternative to exhaustive blood sampling to estimate the WHP of infected dairy cows. The approach already has been demonstrated to be effective for bovine viral diarrhoea in cattle (Beaudeau et al., 2001) and Q fever in dairy sheep (Ruiz-Fons et al., 2011).

The objective of the present study was to assess the relationship between the level of antibodies in the BTM and the WHP of *C. burnetii* in cows in naturally infected dairy herds.

The herds included in the study: (i) had at least 50% of seropositive animals in a sample of at least six animals and a positive PCR result either on the placenta of an aborted cow or on BTM; (ii) had not been vaccinated against Q fever in the last 5 years to avoid putative false positive ELISA results.

The study was conducted between 2008 and 2010 in 55 dairy herds in western France. In each herd, one sample of BTM was collected and blood samples were taken from all of the milking cows. The samples were sent immediately to the Institut Départemental d'Analyses et de Conseil (Nantes, France) to be tested using the Q fever LSI ELISA kit (LSI, France). Results were expressed in an optical density sample/positive control (S/P) ratio. Serum were considered negative when the S/P ratio was ≤ 40 , low positive if $40 < \text{S/P ratio} \leq 100$, positive if $100 < \text{S/P ratio} \leq 200$, high positive if $200 < \text{S/P ratio} \leq 300$, and very high positive if $\text{S/P ratio} > 300$. BTM samples were considered negative if the S/P ratio ≤ 30 , low positive if $30 < \text{S/P ratio} \leq 100$, positive if $100 < \text{S/P ratio} \leq 200$, and high positive if $\text{S/P ratio} > 200$. The lactation number of each sampled cow and the number of milking cows were also recorded. This work was conducted in compliance with the STROBE statement for cross-sectional studies (www.strobe-statement.org).

The statistical unit was the herd. The outcome variable was the WHP of seropositive cows contributing to the BTM (P_{BTM}), defined as the number of positive individual serum samples ($\text{S/P ratio} > 40$) divided by the total number of individual blood samples collected. The relationship between the ELISA S/P ratio in BTM (S/P_{BTM}) and the P_{BTM} first was described using the Pearson correlation test and then quantified using a General Linear Model (GLM procedure, SAS Institute Inc., 1999). It is written as follows:

$$P_{\text{BTM}} = \mu + \text{S/P}_{\text{BTM}} + H_{\text{size}} + \text{PL1},$$

Where μ is the overall mean, S/P_{BTM} the ELISA S/P ratio in BTM (in 4 classes: ≤ 30 , $30 < \text{S/P ratio} \leq 100$, $100 < \text{S/P ratio} \leq 200$, > 200); H_{size} the number of milking cows (in 2 classes: < 46 ; ≥ 46), and PL1 the proportion of primiparous cows contributing to BTM (in 2 classes: $< 25\%$; $\geq 25\%$). The herd size was included as a confounding factor to account for a putative dilutive effect of the number of cows tested on the S/P_{BTM} . The proportion of primiparous cows contributing to BTM was taken into account by assuming that the risk of encountering *C. burnetii* is lower for primiparous cows than for older cows. The univariate analysis was performed first. Correlation was tested between explanatory variables retained after the first screening (P value < 0.25) using a χ^2 test. The GLM procedure included all factors retained. The variable with the highest P value was removed, and the model rerun until all variables had a P value < 0.05 .

The relationship between the number of highly seropositive cows (S/P ratio >200) and the S/P_{BTM} was assessed using a Zero Inflated Poisson (ZIP) model (Cameron, 1996), after adjustment for herd size. To assess whether it was relevant to perform the ZIP model, and because many herds showed no highly seropositive cows, the excess of zero first was tested.

Fifty out of the 55 BTM samples tested were considered positive (with a $S/P_{BTM} > 30$), showing that ELISA applied to BTM to detect infected herds had a sensitivity of 91% (95% CI 85-99). The relationship between the S/P ratio in BTM and P_{BTM} is shown in **Figure 2- 2**. The Pearson correlation coefficient between the S/P ratio in BTM and P_{BTM} was moderate ($r=0.38$, P value= 0.005); graphically, no linear relationship was observed. We observed that when $S/P_{BTM} < 100$ (negative or low positive), all herds except one had a $P_{BTM} < 30\%$, P_{BTM} below 20% for $S/P_{BTM} < 30$. When $S/P_{BTM} \geq 100$ (positive and high positive results), P_{BTM} had a wide distribution (8-79 %).

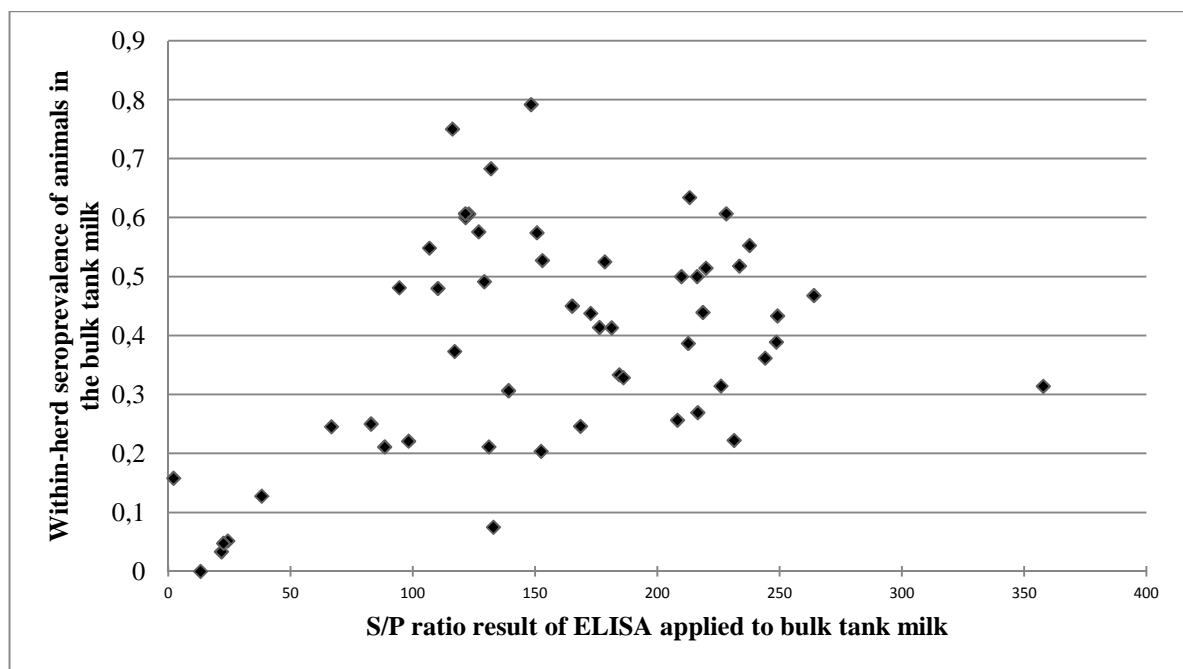


Figure 2- 2: Relationship between the ELISA S/P ratio of bulk tank milk and the within-herd seroprevalence seropositive milking cows in 55 naturally infected dairy herds

In the final GLM model (**Table 2- 5**), the P_{BTM} increased significantly ($P < 0.05$) in herds with higher S/P_{BTM} . However, the mean P_{BTM} did not increase when $S/P_{BTM} > 100$.

Table 2- 5: Variables significantly ($P < 0.05$) associated with within-herd seroprevalence of *C. burnetii* infection in milking cows of 55 naturally infected dairy herds

Variables	Estimate (sd)	95% CI	P value
Classes of S/P ratio of BTM :			
≤ 30			
30 < S/P ratio ≤ 100	0.20 (0.09)	(0.02 ; 0.38)	0.029
100 < S/P ratio ≤ 200	0.40 (0.07)	(0.26 ; 0.54)	<0.0001
> 200	0.37 (0.07)	(0.23 ; 0.51)	<0.0001

BTM, Bulk tank milk; CI, confidence interval

Intercept = 0.06 (-0.04 to 0.16), $R^2 = 0.43$, P value < 0.0001

The distribution of the number of highly seropositive animals confirmed the presence of excess zero values ($P=0.0014$). The ZIP model showed a positive relationship between the number of highly seropositive animals and the S/P_{BTM} (results not shown). Consequently, a high S/P_{BTM} may result from the contribution of a high number of seropositive animals and/or a few animals with a high level of antibodies.

To our knowledge, our study is the first to aim at assessing the relationship between the level of antibodies in BTM using ELISA and the within-herd seroprevalence of *C. burnetii* in cows based on an exhaustive sampling of cows carried out concomitantly to BTM collection, and taking into account some confounding factors. Consequently, the WHP reported here is deemed more reliable than those reported by previous studies conducted in cattle (Muskens et al., 2011) and sheep (Ruiz-Fons et al., 2011) that were assessed on a sub-sample of animals (30 per herd). Moreover, by taking both the BTM and blood samples on the same day, any possible bias that could have been introduced by taking samples on different days (e.g. variation in individual serological status over time, variation in the population contributing to BTM) was avoided (Muskens et al., 2011; Ruiz-Fons et al., 2011).

In 5/55 infected herds, ELISA indicated a negative BTM result, leading to a negative predictive value below 100%. We could not assess its positive predictive value because we only investigated infected herds; consequently, we could not determine the specificity of ELISA applied to BTM.

As shown in previous studies (Muskens et al., 2011; Ruiz-Fons et al., 2011), the level of antibodies in BTM increased when the WHP of seropositive cows increased. Our findings suggest that in the case of a negative or low positive ELISA result on BTM, a high number of seronegative cows (assumed to be non-infected) can be expected. As vaccination is effective

when applied to non-infected animals, the vaccination of dairy cows in addition to nulliparous heifers should thus be considered when the S/P BTM ratio suggests a low WHP. In addition to detecting infected herds (Agger et al., 2010a), ELISA applied to BTM could be used to estimate a proxy of within-herd seroprevalence and create opportunities for epidemiological surveillance. However, as a differentiating infected from vaccinated (DIVA) ELISA has not yet been developed, once a herd has been vaccinated, ELISA can no longer be used on BTM to monitor the status of herds over time. Further studies on a larger scale should be performed to identify easy-to-collect information to improve the estimation of within-herd seroprevalence.

Acknowledgements

The authors thank all of the farmers, veterinarians and staff involved in this study (especially Jean-Yves Audiart), the Groupements de Défense Sanitaire of Western France and the Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) for their financial support.

References

- Agger, J.F., Christoffersen, A.B., Rattenborg, E., Nielsen, J., Agerholm, J.S., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish dairy herds. Acta veterinaria Scandinavica 52, 5.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet. Res. 36, 327-349.
- Beaudeau, F., Assié, S., Seegers, H., Belloc, C., Sellal, E., Joly, A., 2001. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk Vet. Rec. 149, 236-240.
- Cameron, A.C., Trivedi, P. K., 1996. Count Data Models for Financial Data. In: Rao, G.S.M.a.C.R. (Ed.), Handbook of Statistics. North-Holland, Amsterdam, pp. 363-392.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007. Performances of an ELISA applied to serum and milk for the detection of antibodies to *Coxiella burnetii* in dairy cattle. Revue De Medecine Veterinaire 158, 250-252.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. Vaccine 26, 4320-4328.
- Muskens, J., van Engelen, E., van Maanen, C., Bartels, C., Lam, T.J., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. Vet Rec 168, 79.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L., 2011. Measuring antibody levels in bulk-tank milk as an epidemiological tool to search for the status of *Coxiella burnetii* in dairy sheep. Epidemiology and infection, 1-6.
- Scolamacchia, F., Handel, I.G., Fevre, E.M., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvort, B.M., 2010. Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. PloS one 5, e8623.
- Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2011. Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. Preventive Veterinary Medicine 101, 51-57.

CHAPITRE 3

Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle

1. Résumé de l'article 'Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows'

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'efficacité de mesures de maîtrise médicale combinant ou non la vaccination et l'antibiothérapie, sur la prévention et/ou la réduction de l'excrétion de *Coxiella burnetii* au vêlage dans des troupeaux bovins laitiers cliniquement affectés.

Pour ce faire, 22 troupeaux bovins laitiers ont été recrutés de février 2008 à septembre 2010 dans 5 départements du Grand Ouest de la France, sur la base d'au moins 50% de résultats sérologiques positifs (ELISA FQ) sur un échantillon d'au moins 6 vaches et d'un résultat positif en PCR sur un prélèvement de placenta ou de fœtus suite à un avortement. Dans ces 22 troupeaux, 4 stratégies médicales attribuées par tirage au sort ont été mises en oeuvre chez les vaches laitières : la vaccination (à base d'un vaccin composé de *Coxiella burnetii* en phase 1), l'antibiothérapie (à base de tétracycline), la vaccination associée à l'antibiothérapie, ou aucune de ces mesures médicales. Dans les troupeaux dont la stratégie comprenait l'antibiothérapie, 5 protocoles différents étaient ensuite attribués par tirage au sort aux vaches laitières (20 mg/kg à chaque injection): une injection au tarissement, une injection au tarissement et 15 jours plus tard, une injection au vêlage, une injection au tarissement et au vêlage, ou une injection au tarissement et 15 jours plus tard et au vêlage. Pour des raisons éthiques, quelle que soit la stratégie attribuée au troupeau, les génisses de plus de 12 mois étaient systématiquement vaccinées. Afin de prendre en compte le statut infectieux préalable des animaux à la mise en place d'un protocole dans l'élevage, du fait de son influence potentielle sur l'efficacité vaccinale, un prélèvement de sang a été systématiquement effectué à l'inclusion dans le protocole chez les animaux de plus de 12 mois pour recherche d'anticorps (kit ELISA FQ, LSI). Enfin, lors de chaque vêlage, un prélèvement de mucus vaginal a été systématiquement réalisé par le vétérinaire dans les 4 jours suivant le vêlage, pour être analysé par PCR en temps réel afin de détecter et d'estimer la charge présente de *Coxiella burnetii*.

Afin de tenir compte de l'influence des pratiques d'élevage sur le risque d'excrétion, un modèle hiérarchique avec effet aléatoire troupeau a été choisi. Dans ce modèle les mesures de maîtrise médicale ont été prises en compte au travers de 2 variables. La variable décrivant la

CHAPITRE 3 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle

vaccination devant prendre en compte le statut de gestation (rapporté comme influençant l'efficacité vaccinale chez les vaches laitières), a été considérée sous 3 modalités : non vaccinée, vaccinée avant insémination artificielle (IA), vaccinée après insémination artificielle. Concernant l'antibiotique, seules les stratégies centrées autour du tarissement ont été considérées, sous l'hypothèse que le délai entre l'injection d'antibiotique au vêlage et le prélèvement au vêlage n'étaient pas suffisamment long pour pouvoir observer un effet éventuel de l'antibiotique sur l'excrétion. Ainsi, la variable antibiotique a été décrite par 3 modalités : pas d'antibiotique, antibiotique injecté au tarissement, antibiotique injecté au tarissement et 15 jours plus tard. Les animaux ayant reçu de l'antibiotique au vêlage étant considérés comme non traités au vêlage. Le statut sérologique initial et l'âge au vêlage ont également été pris en compte dans le modèle. Deux modèles logistiques ont été construits pour évaluer l'efficacité des mesures de maîtrise sur (i) l'occurrence de l'excrétion :

$$(i) P(Y=0/1)_{ij} = \beta_1 * \text{vaccination} + \beta_2 * \text{antibiotique} + \beta_3 * \text{age} + \beta_4 * \text{statut sérologique initial} + \mu * \text{troupeau} + \varepsilon$$

et (ii) sur le niveau de l'excrétion par les animaux détectés excréteurs, considérant 3 niveaux d'excrétion (1)]0-100], (2)]100-10000] et (3) >10000 bactéries par mL de mucus vaginal :

$$(ii) P(Y=1/2)_{ij} = \beta_1 * \text{vaccination} + \beta_2 * \text{antibiotique} + \beta_3 * \text{age} + \beta_4 * \text{statut sérologique initial} + \mu * \text{troupeau} + \varepsilon$$
$$P(Y=1/3)_{ij} = \beta_1 * \text{vaccination} + \beta_2 * \text{antibiotique} + \beta_3 * \text{age} + \beta_4 * \text{statut sérologique initial} + \mu * \text{troupeau} + \varepsilon$$

Les analyses ont été effectuées sur 883 vaches dans 22 troupeaux, avec une séroprévalence initiale de 42.2%, et une prévalence de vaches détectées excrétrices de 18.3%. La vaccination n'était pas significativement associée au risque pour une vache d'être détectée excrétrice ($P=0,35$). À l'opposé, l'antibiothérapie administrée une fois au tarissement était significativement associée à une diminution du risque pour une vache d'être détectée excrétrice (OR=0,40, IC95% [0,21-0,75]). Une 2^{ème} injection 15 jours plus tard ne présentait pas d'intérêt. Le statut sérologique initial négatif était associé à une diminution du risque d'être détecté excréteur (OR=0,39, IC95% [0,26-0,59]). Concernant l'effet sur le niveau d'excrétion, la vaccination était associée à une diminution du risque d'excréter de grande quantité de bactéries. Le risque associé chez une vache vaccinée après IA était de 0,29 (IC

CHAPITRE 3 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle

95% [0,12-0,67]), il était de 0,15 (IC 95% [0,03-0,85]) lorsque la vache était vaccinée avant IA. L'antibiothérapie ne l'était significativement pas. Le statut sérologique initial négatif était associé à la diminution du risque d'excréter à un niveau élevé (OR=0,26, IC95% [0,11-0,63]).

Cette étude est caractérisée par un protocole ambitieux du fait du nombre d'élevages recrutés et de la diversité des protocoles médicaux mis en place. Cependant, la prise en compte du statut infecté des animaux estimé par le statut sérologique initial, alors qu'il existe des animaux infectés excréteurs séronégatifs, peut être à l'origine de l'absence d'effet observé de la vaccination sur la prévention de l'excrétion, effet montré par ailleurs dans des études sur des caprins et des bovins non infectés avant vaccination. Ces résultats peuvent servir de base de recommandation pour une utilisation raisonnée des antibiotiques en élevage infecté et aider à l'élaboration de protocoles de mesures de maîtrise médicale en élevages infectés. L'antibiothérapie apparaît comme une mesure à court terme, avec un intérêt à discuter en fonction de la situation sanitaire de l'élevage. La vaccination est une alternative à long terme ayant un impact dans la dynamique d'infection. En effet la présente étude met en évidence l'association de la vaccination à une diminution des charges excrétées. Par ailleurs, des travaux antérieurs ont montré qu'elle prévient l'excrétion chez les animaux encore sensibles dans les troupeaux infectés. En outre, les animaux séronégatifs ont également un moindre risque d'être excréteur et d'excréter en grande quantité. L'ensemble de ces résultats renforcent l'intérêt de cibler ces animaux dans le cadre de mesures de contrôle médical de l'infection par *Coxiella burnetii*.

2. Article 'Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows'

Anne-Frieda Taurel, Raphaël Guatteo, Alain Joly and François Beaudeau

ONIRIS, Nantes, F-44307, France (AF. Taurel, R. Guatteo, F. Beaudeau) ; INRA, Nantes, F-44307, France (AF. Taurel, R. Guatteo, F. Beaudeau) ; LUNAM, France (AF. Taurel, R. Guatteo, F. Beaudeau) ; Union Bretonne des Groupements de Défense Sanitaire, F-56000 Vannes, France (AF. Taurel, A. Joly)

Veterinary Microbiology, soumis le 09 février 2012

2.1. Abstract

Effectiveness of phase 1 vaccine, combined or not with tetracycline, to control *Coxiella burnetii* vaginal shedding at calving in cows was assessed through a 13 months study in 22 Q fever clinically affected commercial dairy herds. Four medical strategies implemented at herd level but randomly assigned to cows (vaccination, vaccination and tetracycline, tetracycline, nothing) were compared. There was no significant interaction effect between vaccination and antibiotherapy. Tetracycline used once at drying off was associated with a lower risk of being detected shedder at calving (OR=0.40, CI95% [0.21-0.75]), but had no significant effect on the bacterial load shed. Vaccination did not significantly prevent shedding but was significantly (OR=0.15, CI95% [0.03-0.85]) associated with lower bacterial load shed. Thus, vaccination using a phase 1 vaccine and antibiotherapy using tetracycline is associated with a decrease in shedding in dairy cows and could contribute to reduce the bacterial load generated in the environment.

2.2. Introduction

Coxiella burnetii is the infectious agent responsible for Q fever, a world wide spread zoonosis. The recent epidemics in the Netherlands, with more than 3,500 human cases since 2007, 7 of them leading to deaths (van der Hoek W et al., 2010), and frequent reports of sporadic cases (e.g. Florac in France in 2007 (King et al., 2011), highlight the public health issues related to Q fever. In domestic ruminants, Q fever can induce abortion and metritis (Tainturier, 1987). Ruminants are recognized as the main source of infection (Marrie and Raoult, 1997), which occurs mainly after inhalation of infectious aerosols. They shed the bacteria through birth products (e.g., placenta), but also through semen (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanowska, 1997), vaginal mucus, urine, milk and feces (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Guatteo et al., 2007b). Additionally, parturition is considered as a period-at-risk, as ruminants have been reported to shed a very high bacterial load at that time (Berri et al., 2002). Moreover, the apparent prevalence of *C. burnetii* infection is quite important, with estimated mean value at animal and herd level of 20% and 38% in cattle and 15% and 25% in sheep and goat (Guatteo et al., 2011). Therefore, any measure which aims to control *Coxiella burnetii* shedding in ruminants will improve animal health status and result in reducing the zoonotic risk.

When applied to susceptible (i.e. seronegative and non-shedder) animals before mating, vaccination using a phase 1 vaccine has been shown to strongly prevent shedding both in goats (Arricau-Bouvery et al., 2005) and cattle (Guatteo et al., 2008). Nulliparous heifers, reported as quite systematically non-infected even in infected herds (Taurel et al., 2011a), are considered as a target population for vaccination. In contrast, a wide distribution of within-herd prevalence of antibody-carriers cows is observed (Taurel et al., 2011a), making the use of vaccination questionable in adults.

When applied to infected animals, vaccination does not prevent *Coxiella burnetii* shedding (Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009b). Therefore in routine practice, antibiotics (mainly tetracycline) are classically used by practitioners. They are used at different regimens: at drying off to prevent late abortion and/or around calving time to limit the shedding peak (Berri et al., 2001; Arricau-Bouvery et al., 2003). Few studies aiming at assessing its effectiveness have been performed until now in cows (Behymer et al., 1977) and

sheep (Astobiza et al., 2010a). Additionally, these studies, which included few numbers of animals subjected to a unique regimen, reported contradictory results. This gap of knowledge possibly leads to current practices in field which are not in line with a rational use of antibiotics.

Therefore, the aim of this study was to compare the effectiveness of several medical strategies, combining vaccination using a phase 1 vaccine and/or antibiotics (tetracycline) at drying off, to control *Coxiella burnetii* vaginal shedding at calving time in cows from commercial dairy herds clinically affected by Q fever.

2.3. Material and methods

2.3.1. Herds and animals

This work was conducted in compliance with the STROBE statement for cohort studies (von Elm et al., 2007). From February 2008 to May 2010, 22 Q fever clinically affected dairy herds were recruited. All dairy herds that fulfilled the following requirements were included in the study: detection of *Coxiella burnetii* by PCR on the placenta or a vaginal swab of at least one aborting cow within the month before the inclusion and at least 50% of seropositive results (using ELISA) among at least 6 sampled cows (in line with the EFSA report (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010)); no implementation of vaccination directed against *Coxiella burnetii* within the previous five years; no systematic tetracycline treatment for reproductive tract disorders, such as metritis or abortion, within the previous six months. Farmers had to sign a consent form and to give their agreement for cows' to be vaccinated during gestation.

All dairy females older than 12 months expected to experience a calving in the 13 months following inclusion time were included in the follow-up.

2.3.2. Experimental design

2.3.2.1. Nature and allocation of treatments

At inclusion time, medical strategies were randomly attributed to each herd. Due to ethics concerns, and given the effectiveness of vaccination on still susceptible animals (Guatteo et al., 2008) and the susceptible status of nulliparous heifers (Taurel et al., 2011a), the vaccination of these was systematically performed regardless the strategy for cows. Dairy cows were randomly assigned to 4 different herd strategies: (i) vaccination, (ii) vaccination and antibiotherapy, (iii) antibiotherapy without vaccination, or (iv) nothing. Vaccination consisted in 2 injections 3 weeks apart and an annual booster injection, clustered in time with the vaccination of new eligible animals after one year follow-up (heifers of 12 months and more at booster time injection). The vaccine used was a phase 1 inactivated vaccine (Coxevac®, CEVA Santé Animale, ZI de la Ballastière, Libourne, France), licensed for cattle in France. The antibiotic used was a long acting oxytetracycline (Ténaline LA®, CEVA Santé Animale, ZI de la Ballastière Libourne, France). Within the herds allocated to the 2 medical strategies including antibiotics, cows were randomly assigned to 5 different individual antibiotic regimens (20 mg/kg at each injection): antibiotic at (i) drying off, at (ii) calving, at (iii) drying off and calving, at (iv) drying off and 15 days later, or (v) drying off and 15 days later and calving.

In order to help farmers improving the compliance of the antibiotic strategies, the farmers received a reminder text message on their cell phone on the expected day of intervention (based on the estimated dates of drying off and calving provided by the milk recording scheme).

2.3.2.2. Sample and laboratory analysis

At inclusion time, in each selected herd, blood samples were collected by the practitioner from all animals older than 12 months, to determine their antibody-carrier status. Samples were immediately sent to the laboratory (Institut Départemental d'Analyses et de Conseil, Nantes, France) to be tested using the Q fever LSI ELISA kit (LSI, Lissieu, France) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in an optical density Sample/Positive control (S/P) ratio. A serum sample was considered as positive when the S/P ratio in serum was >40, and seronegative otherwise.

A vaginal swab was performed within 4 days after each calving on each included animals by the practitioner. The vaginal swabs were immediately sent to the laboratory (IDHESA

Bretagne Océane, Quimper) to be tested using the real time PCR LSI TAQVET *Coxiella burnetii* kit (LSI, Lissieu, France) to detect putative *Coxiella burnetii* shedding. The results were considered positive for a Cycle threshold (Ct) <40, and were expressed in number of bacteria per mL of vaginal mucus.

2.3.3. Strategy of analysis

The statistical unit was the cow. The pregnancy status of animals has been reported to impact the vaccination effectiveness (Guatteo et al., 2008). Thus, the variable describing vaccination took into account the time of injections with regards to the presumed conceiving artificial insemination (AI), with 3 modalities: not vaccinated, vaccinated after AI, vaccinated before AI. Only antibiotic at drying off was considered for analysis. It was assumed that there was not enough time between injection at calving and vaginal mucus sampling to observe a putative, if any, effect of antibiotics at calving on shedding. The antibiotic strategies were described through one variable taking into account the time and number of injections: no antibiotic vs. received antibiotic at drying off vs. received antibiotic at drying off and 15 days later. Cows receiving antibiotic at calving were then considered as not treated, those receiving antibiotic at drying off and calving were considered as treated at drying off only.

The data structure was hierarchical (with cows clustered within herds). To assess the effectiveness of medical strategies to prevent *Coxiella burnetii* shedding at calving, we modeled the probability of being shedder for a j cow from an i herd through a hierarchical logistic model regression (Proc Glimmix, SAS® v. 9.2) with herd as the random factor, and taking account of individual adjustment variables (initial serological status and age at calving), as follows:

$$- P(Y=0/1)_{ij} = \beta_1 * \text{vaccination} + \beta_2 * \text{antibiotic} + \beta_3 * \text{age} + \beta_4 * \text{initial serologic status} + \mu * \text{herd} + \varepsilon$$

where $P(Y=0/1)_{ij}$ is the probability for a j cow of being shedder or not (yes=1, no=0) in an i herd, β_s are parameter estimates of the fixed part of the model, μ the random herd effect, and ε the error term. A binomial distribution and a logit link were used for the model. Interaction terms among the 2 variables describing the medical strategies (vaccination and antibiotic) and

with the initial serological status were tested. All variables with a P-value<0.05 were considered significantly related to the shedding status at calving.

To assess the effectiveness of medical strategies to limit *Coxiella* shedding at calving when it occurred, the probability for shedder animals to shed at a certain level was also assessed, depending on the medical strategies that the animals received. Three shedding levels (named 1, 2, 3 respectively) expressed in number of bacteria per mL of vaginal mucus were considered: [1-100], [101-10,000], >10,000. The relationship was evaluated through a multinomial logistic mixed model regression (Proc Glimmix, SAS 9.2) with herd as the random factor, and taking account of individual adjustment variables (initial serologic status and age at calving), as follows:

$$- P(Y=1/2)_{ij} = \beta_1 * \text{vaccination} + \beta_2 * \text{antibiotic} + \beta_3 * \text{age} + \beta_4 * \text{initial serologic status} + \mu * \text{herd} + \varepsilon$$

$$- P(Y=1/3)_{ij} = \beta_1 * \text{vaccination} + \beta_2 * \text{antibiotic} + \beta_3 * \text{age} + \beta_4 * \text{initial serologic status} + \mu * \text{herd} + \varepsilon$$

where $P(Y=1/2)_{ij}$ is the probability for a j cow of being a level 2 shedder vs. being a level 1 shedder in an i herd, $P(Y=1/3)_{ij}$ is the probability for a j cow of being a level 3 shedder vs. being level 1 shedder in an i herd, β the fixed part of the model, μ the random herd effect, and ε the error term. A multinomial distribution and a logit link were used for the model. All variables with a P-value<0.05 were considered significantly associated with the shedding level at calving.

2.4. Results

A sample of 883 calving cows with complete demographic data from 22 herds was considered for analyses. Among them, 18.3% were detected shedders and 42.2% were seropositive. There was a mean of 40 cows by herd (Q1=26; Q2=51) and a median age at calving of 4.7 years (Q1=3.4; Q2=5.6). The distribution of shedder cows according to their different shedding level is displayed in [Table 3-1](#).

CHAPITRE 3 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle

Table 3- 1 : Individual serological status and medical strategy received by cows according to their shedding level

Variable	No. of cows	No. of shedder cows	Distribution of shedder cows (%)		
			level 1 ¹	level 2 ²	level 3 ³
Total cows	883	162	46.3	24.1	29.6
Initial serologic status					
Seronegative cows	510	65	55.4	26.1	18.5
Seropositive cows	373	97	40.2	22.7	37.1
Vaccination					
No vaccination	448	76	36.8	22.4	40.8
Vaccination after AI	348	73	53.4	26	20.5
Vaccination before AI	87	13	61.5	23.1	15.4
Antibiotic					
No antibiotic	687	130	47.7	26.1	26.1
Antibiotic at drying off	129	21	42.9	9.5	47.6
Antibiotic at drying off and 15 days later	67	11	36.4	27.2	36.4

¹:]0-100] bacteria per mL of vaginal mucus; ²:]101-10,000] bacteria per mL of vaginal mucus;

³:>10,000 bacteria per mL of vaginal mucus;

The risk of being detected shedder at calving time associated with the medical strategies received by the cows is displayed in **Table 3- 2**. No interaction between medical strategies was found to be significant ($P>0.05$). Vaccination strategies were not significantly associated with shedding status in cows ($P>0.05$), whereas tetracycline used once at drying off was associated with a lower risk of shedding at calving (OR=0.40, CI95% [0.21-0.75]). A second injection does not improve the (OR=0.50, CI95% [0.22-1.12]). Initially seronegative cows had a significantly lower risk of being detected shedders at calving. There was no significant interaction between medical strategies variable and the initial serological status ($P>0.05$).

CHAPITRE 3 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle

Table 3- 2 : Risk of being detected shedder at calving time associated with cow characteristics and their medical strategy (883 dairy cows located in 22 herds clinically affected by *Coxiella burnetii*, mixed logistic regression)

Variable	No. of cows	% shedder cows	Risk of shedding occurrence		
			OR	CI 95%	P-value
Total	883	18.3			
Vaccination					0.35
No	448	17.0	1		
Vaccination after AI	348	21.0	1.03	0.59-1.82	
Vaccination before AI	87	14.9	0.63	0.28-1.40	
Antibiotic					0.015
No	687	18.9	1		
Day of drying off	129	16.3	0.40	0.21-0.75	
Day of drying off and 15 day later	67	16.4	0.50	0.22-1.12	
Initial serologic status					<0.001
Seropositive	373	26.0	1		
Seronegative	510	12.7	0.39	0.26-0.59	
Age at calving			0.94	0.84-1.04	0.23

Among shedders, when vaccinated, cows had a significant (P=0.03) lower risk of shedding at a higher level than level 1 (**Table 3-3**). For instance, the risk for a cow of being shedder at level 3 compared to shedder at level 1 is lower when vaccinated before AI (OR=0.15, CI95% [0.03-0.85]) and after AI (OR=0.29, CI95% [0.12-0.67]). Antibiotic treatment at drying off, was not significantly (P>0.05) associated with the shedding level at calving time. When initially seronegative at inclusion time, a cow had a significant lower risk of being shedder at level 3 compared to being a level 1 shedder (OR=0.26, CI95% [0.11-0.63]).

CHAPITRE 3 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle

Table 3- 3 : Risk of being detected a level 21 and level 32 shedder cow, compared to level 13, associated with cow characteristics and modalities of vaccination (162 dairy cows located in 22 herds clinically affected by *Coxiella burnetii*, mixed logistic regression

Variable	No. of cows	Shedding level 2 ¹ vs. 1 ³		Shedding level 3 ² vs. 1 ³		P
		OR	IC 95%	OR	IC 95%	
Vaccination						0.03
No vaccination	76	1		1		
Vaccination after AI	73	0.70	0.30-1.63	0.29	0.12-0.67	
Vaccination before AI	13	0.50	0.11-2.29	0.15	0.03-0.85	
Antibiotic						0.34
No	130					
Day of drying off	21	0.40	0.08-2.02	1.92	0.64-5.76	
Day of drying off and 15 days later	11	1.46	0.26-7.25	2.12	0.45-10.08	
Initial serologic status						0.01
Seropositive	97	1		1		
Seronegative	65	0.75	0.33-1.70	0.26	0.11-0.63	
Age at calving						0.19

¹: (101-10,000] bacteria per mL of vaginal mucus; ²:>10,000 bacteria per mL of vaginal mucus; ³:]0-100] bacteria per mL of vaginal mucus;

2.5. Discussion

To our knowledge, this is the first study that aimed at comparing the effectiveness of medical strategies, using vaccination and/or antibiotics at different regimens, to prevent and limit *Coxiella burnetii* shedding at calving in dairy cows from clinically affected herds.

The originality of this study lies on its ambitious design. This study was performed under field conditions on a large number of herds and animals contrary to previous studies (Behymer et al., 1977; Woernle et al., 1985; Arricau-Bouvery et al., 2005; Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009b; Astobiza et al., 2010b; de Cremoux et al., 2011). Additionally,

the evaluated strategies (including up to 2 different antibiotic regimens and a control group) were applied within each herd to the whole population of cows, in contrast to recent studies based on split design, unique regimen and without systematic control group (Guatteo et al., 2008; Astobiza et al., 2010b; de Cremoux et al., 2011), possibly leading to bias in estimating of medical strategies effectiveness. Lastly, contrary to previous studies conducted in cattle aiming to assess the effectiveness of antibiotics (Behymer et al., 1977; Woernle et al., 1985), the choice made here to sample vaginal mucus at calving time (instead of milk) and to use real time PCR (instead of serological methods), led to a more accurate description of the dynamics of *Coxiella burnetii* infection.

In the present study, vaccination does not appear to prevent significantly individual shedding occurrence at calving time in cows, although the estimated ORs were lower than unity when the cows were vaccinated before AI (Table 2), as already reported in goat and cattle (Arricau-Bouvery et al., 2005; Guatteo et al., 2008). A possible explanation for this result could rely on the less strict definition of the infectious status of cows in our study. In Guatteo et al (2008), given the putative *Coxiella burnetii* shedding patterns previously reported (Guatteo et al., 2007b) (no concomitancy in shedding routes, intermittent shedding), and the existence of seronegative shedders, the infectious status of cows was determined based on PCR results on 3 shedding routes (individual milk, vaginal mucus and feces) explored concomitantly and ELISA responses on individual blood, all samplings being performed twice 15-days apart. In our study, the shedding status of cows was not tested, possibly leading to the existence of seronegative cows (considered as non-infected) but in fact shedders. A lack of sensitivity of ELISA result cannot be excluded, although we used an ELISA based on ovine antigen recognized as the most sensitive ELISA (Horigan et al., 2011). Additionally, the unknown delay between exposure to potential infectious aerosols and determination of initial serological status, together with the delay (2 to 5 weeks) between determination of initial serological status and effective immunization of animals by vaccination, can have allowed the occurrence of undetected infection. This hypothesis about the lack of accuracy in the definition of the infectious status of cows based only on the initial serologic status was strengthened by the fact that we did not evidence any significant interaction between initial serologic status and vaccination strategy, though this interaction has been evidenced in previous studies (Guatteo et al., 2008; de Cremoux et al., 2011). However, the trend observed in the present study, towards a lower risk of shedding

occurrence when vaccinated (even if non-significant), was also reported in a study performed in infected goat and sheep herds whatever the infectious status of animals (Rousset et al., 2009b; Astobiza et al., 2010b; de Cremoux et al., 2011). Thus the accurate determination of the infectious status of animals (towards shedding and antibody carriage) seems to be a key point to assess the effectiveness of vaccination. Moreover, a cow was considered to be shedder at calving time when the PCR was positive regardless the estimated bacterial load, while the reproducibility and the biological significance (infectiousness and viability) of very high Ct value (corresponding to <100 bacteria) are still debated (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

As for technical reasons, some nulliparous heifers (21.5%) were not vaccinated, the risk for seronegative and vaccinated primiparous cows (*i.e.* former nulliparous heifers) to become shedder was assessed, in comparison to non-vaccinated ones. Seronegative nulliparous heifers, when vaccinated before AI, had a significant lower risk of shedding (OR=0.17, CI95% [0.04-0.67]), than the ones that were not vaccinated (data not shown). Nulliparous heifers are known to be rarely infected (Taurel et al., 2011a), thus the population of seronegative nulliparous heifers are more likely to be really non-infected compared to cows.

Considering the bacterial load shed, vaccinated cows had a significantly reduced risk of being high (more than 10,000 bacteria per mL of vaginal mucus) shedders (OR vaccinated before AI=0.15, CI95% [0.03-0.85]; OR vaccinated after AI=0.29, CI95% [0.12-0.67]), in agreement with previous reports in goats (Rousset et al., 2009b; de Cremoux et al., 2011). As the negative initial serologic status was the only variable modality linked both to shedding prevention and limitation, the interest of focusing treatment on sensitive (or at least seronegative) cows besides heifers in case of low within-herd seroprevalence seems of interest. To this end, a money and time saving option to identify herds with low seroprevalence is the use of ELISA applied to bulk tank milk (Taurel et al.).

Antibiotic, when used once at drying off (Table 1), was found to significantly prevent shedding at calving time, as reported in another study (Behymer et al., 1977). A second injection done 15 days later did not improve this preventive effect. Nevertheless, when shedding occurred, antibiotics (regardless the number of injection) did not significantly

reduce the bacterial load of the shedder cows. In sheep (Astobiza et al., 2010a) antibiotic was reported to have no effect neither on prevention or duration of shedding. In this latter study, only one antibiotic regimen was applied, and few animals were tested (50-60 sheep per sampling time). Given the need for a decreased and rational use of antibiotics to limit the risk of antibioresistance, our results provide evidence for a rational use to avoid a massive implementation of repeated and useless injection of tetracycline at drying off. Moreover, slight differences were observed in the overall proportions of animal detected shedders among the 3 antibiotic modalities: 18.9% in cows without antibiotics, and respectively 16.3% and 16.4% in cows with 1 or 2 injections at drying off. Despite this slight difference on average, large variability existed between farms: the proportions of cows detected as shedders ranged from 3% to 38% depending on the herds. Thus, herd characteristics should be further investigated to identify and target herds where use of antibiotic could be of highest interest.

This study focused on calving as it is known as the period of higher risk of shedding. As *Coxiella burnetii* can be shed over the whole lactation period in different shedding routes (Berri et al., 2000; Guatteo et al., 2006b), further field studies would be relevant to evaluate the effectiveness of medical strategies under study to control shedding over a longer horizon, especially in routes (feces, urine and vaginal mucus) which also contribute to generate infective aerosols.

Acknowledgments

The authors wish to thank all farmers, veterinarians and staff involved in this study (especially Jean-Yves Audiart), the members of the laboratory IDAC (Nantes, France) and the laboratory IDHESA (Quimper, France) for their technical assistance, CEVA Santé Animale, the Groupements de Défense Sanitaire of Western France and the Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) for their financial support.

References

- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats : excretion routes. *Vet. Res.* 34, 423-433.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010a. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *The Veterinary Journal* 184, 172-175.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2010b. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res Vet Sci* 91, e58-63.
- Behymer, D., Ruppaner, R., Riemann, H.P., Biberstein, E.L., Franti, C.E., 1977. Observation on chemotherapy in cows chronically infected with *Coxiella burnetii* (Q fever). *Folia Vet. Lat.* 7, 64-70.
- Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A., 2000. The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 72, 285-293.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec.* 148, 502-505.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A., 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Veterinary Microbiology* 85, 55-60.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Pape, M., 2011. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS immunology and medical microbiology*.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010. Scientific Opinion on Q Fever. *EFSA Journal.* p. 114.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.* 37, 827-833.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.* 38, 849-860.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328.

CHAPITRE 3 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle individuelle

- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.-F., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Veterinary Microbiology* 149, 1-16.
- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R., Pritchard, G.C., 2011. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 924-931.
- King, L.A., Goirand, L., Tissot-Dupont, H., Giunta, B., Giraud, C., Colardelle, C., Duquesne, V., Rousset, E., Aubert, M., Thiery, R., Calatayud, L., Daurat, G., Hocqueloux, L., Cicchelerio, V., Golliot, F., de Valk, H., 2011. Outbreak of Q fever, Florac, Southern France, Spring 2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 341-347.
- Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbanowska, S., 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science* 62, 299-300.
- Marrie, T.J., Raoult, D., 1997. Q fever - a review and issues for the next century. *Int. J. Antimicrobial Agents* 8, 145-161.
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M., Gasnier, T., Duquesne, V., Thiery, R., Aubert, M.F., 2009. Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 2, 188-189.
- Tainturier, D., 1987. Recurrent metritis due to Q fever in cows. *Recl. Med. Vet.* 163, 195-198.
- Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2011a. Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine* 101, 51-57.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2011b. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. *Epidemiology and Infection*, 1-4.
- van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkmans C, ter Schegget R, Hackert V, van Duynhoven Y, 2010. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill.* .
- von Elm, E., Altman, D.G., Egger, M., Pocock, S.J., Gãtzsche, P.C., Vandenbroucke, J.P., 2007. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies. *Preventive Medicine* 45, 247-251.
- Woernle, H., Limouzin, C., Muler, K., Durand, M.P., 1985. La fièvre Q bovine - effets de la vaccination et de l'antibiothérapie sur l'évolution clinique et l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans le lait et les sécrétions utérines. *Bull. Acad. Vet. De France* 58, 91-100.

CHAPITRE 4

Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

1. Introduction

Coxiella burnetii est l'agent pathogène responsable d'une zoonose, la fièvre Q. À l'exception de la Nouvelle-Zélande (Greenslade et al., 2003), c'est une zoonose mondialement répartie qui a la particularité d'infecter un spectre très large d'organismes comprenant différentes espèces parmi les mammifères, les oiseaux et les arthropodes (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). *Coxiella burnetii* est une bactérie extrêmement résistante dans l'environnement : elle peut être retrouvée jusqu'à 150 jours dans les sols (Welsh et al., 1959). L'Homme et l'animal s'infectent principalement par voie aérienne en inhalant des aérosols contaminés produits par les ruminants infectés (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005).

Chez l'Homme, la fièvre Q est majoritairement asymptomatique, mais peut s'exprimer lors d'infections aiguës par des syndromes grippaux principalement et lors d'infections chroniques par des endocardites et des avortements chez les femmes enceintes. Récemment aux Pays-Bas, une épidémie de fièvre Q a touché près de 3500 personnes et a provoqué 24 morts entre 2007 et 2011 (Roest et al., 2011; Anonymous, 2012a). Les ruminants lorsqu'ils sont infectés sont également majoritairement asymptomatiques, mais des avortements, en particulier chez les petits ruminants (Rousset et al., 2009a), des métrites (Tainturier, 1987) et des cas d'infertilité sont rapportés (To et al., 1998).

Toute mesure visant à prévenir ou diminuer l'excrétion de *Coxiella burnetii* chez les ruminants infectés induirait une diminution du risque d'exposition et d'infection des populations à proximité et aurait un intérêt en termes de santé animale et de santé publique.

Lorsqu'ils sont infectés, les ruminants excrètent la bactérie principalement par le lait (Guatteo et al., 2007b). Ils peuvent également excréter par l'urine, les fèces, le mucus vaginal, les produits de la parturition et alimentent ainsi l'environnement en aérosols contaminés (DeLay et al., 1950; Yanase et al., 1998; Arricau-Bouvery et al., 2003; Guatteo et al., 2007b; Rousset et al., 2009a). La parturition et les avortements sont considérés comme des périodes à risque élevé vis-à-vis de l'excrétion tant en survenue qu'en intensité avec pour conséquence une contamination maximale de l'environnement (Berri et al., 2001; Arricau-Bouvery et al., 2003; Tissot-Dupont et al., 2004). Les bactéries présentes dans l'environnement peuvent être transportées sur une distance de plus d'une dizaine de km (Hawker et al., 1998; Tissot-Dupont

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

et al., 2004; Schimmer et al., 2011). Un environnement contaminé représente donc un risque d'exposition et d'infection pour les animaux au sein et autour des troupeaux infectés.

Evaluer la charge bactérienne dans l'environnement est donc nécessaire pour décrire le risque d'exposition des populations humaines et animales.

Pour maîtriser l'infection par *Coxiella burnetii* chez les ruminants, deux types de mesures sont disponibles : des mesures de maîtrise non médicale et médicale. Les mesures de maîtrise non médicale reposent sur des mesures d'hygiène principalement centrées autour du vêlage et de la gestion des effluents d'élevage. L'objectif est alors de limiter la diffusion des bactéries excrétées afin de limiter l'exposition qui peut y être associée.

Les mesures de maîtrise médicale sont utilisées dans le but de réduire l'incidence de l'infection et/ou de prévenir ou diminuer l'excrétion dans les troupeaux infectés. La vaccination avec le vaccin phase 1 a été évaluée en conditions expérimentales dans une étude en comparaison avec un vaccin phase 2 et un placebo (Arricau-Bouvery et al., 2005). Cette étude montrait que les animaux vaccinés avec le vaccin phase 1 étaient les seuls chez qui était observée une prévention de l'excrétion et des signes cliniques. Afin d'évaluer l'efficacité de ce vaccin pour contrôler une infection naturelle, des études ont également été menées en troupeaux naturellement infectés. Le vaccin phase 1 était associé à une prévention de l'excrétion et/ou à une diminution de la charge excrétée chez les ruminants vaccinés (Hogerwerf et al., 2011; Taurel et al., 2012a), les chèvres primipares et/ou sensibles (Rousset et al., 2009b; de Cremoux et al., 2011) et les vaches laitières non gestantes (Guatteo et al., 2008). L'antibiothérapie, sur la base d'utilisation de la tétracycline, est également utilisée dans la pratique courante au tarissement contre le risque d'avortement tardif et au vêlage pour limiter le pic d'excrétion. Peu d'études ont évalué l'efficacité de ces protocoles. De plus, ces études ont été réalisées avec des plans expérimentaux peu comparables entre eux et ont rapporté des résultats contradictoires (Behymer et al., 1977; Woernle et al., 1985; Berri et al., 2005; Astobiza et al., 2010a; Taurel et al., 2012a). Cependant, il apparaîtrait que la tétracycline soit associée à une prévention de l'excrétion au vêlage dans le mucus vaginal chez les vaches lorsqu'elle est injectée au tarissement (2 mois à 3 semaines avant vêlage) (Woernle et al., 1985; Taurel et al., 2012a).

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

Puisque les stratégies médicales ont un effet sur l'excrétion à l'échelle individuelle, cet effet pourrait être observé au travers d'une diminution de la charge mesurée à l'échelle du troupeau. Cependant, les mesures de maîtrise médicale étant efficaces sous certaines conditions, tel que le statut non infecté par *Coxiella burnetii* au moment de la vaccination, l'efficacité de ces mesures sur la charge excrétée à l'échelle du troupeau pourrait varier en fonction de l'étendue de l'infection dans le troupeau et du taux de couverture thérapeutique. Pour estimer cette efficacité, l'évolution de la prévalence des excréteurs et de la charge excrétée dans l'environnement pourraient être des critères de choix.

Les voies d'excrétion étant non concomitantes et les fréquences d'excrétion étant très variables (Guatteo et al., 2007b), la pression de prélèvement nécessaire pour estimer la prévalence des excréteurs est très importante. Ainsi, une alternative est d'estimer cette prévalence d'excréteurs et la charge associée au travers de prélèvements représentatifs à l'échelle du troupeau. Le lait est rapporté comme étant la voie d'excrétion la plus fréquente et la plus persistante (Guatteo et al., 2007b; Rousset et al., 2009a). La prévalence d'excréteurs dans le lait est positivement corrélée à la charge bactérienne mesurée dans le lait de mélange et plus précisément dans le lait de tank (Guatteo et al., 2007a) dans lequel cela a été démontré. De plus, les bactéries excrétées dans le mucus vaginal, les produits de la parturition, l'urine et les fèces contaminent l'environnement (DeLay et al., 1950; Astobiza et al., 2011a). Ainsi, en complément d'une estimation de la prévalence des excréteurs dans le lait de mélange, une mesure de la charge présente dans l'environnement pourrait être un bon indicateur de la charge excrétée dans les voies autres que le lait par les animaux et du risque d'exposition associé.

L'objectif de cette étude était donc d'évaluer l'efficacité comparée à l'échelle du troupeau de stratégies médicales associant vaccination et antibiothérapie pour diminuer la charge bactérienne mesurée dans l'environnement, le lait de tank et le lait de mélange de primipares de troupeaux bovins laitiers naturellement infectés par la fièvre Q.

2. Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué selon la grille de recommandations de l'Initiative STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) concernant les études de cohorte (von Elm et al., 2007).

2.1. Troupeaux et animaux

De Février 2008 à Juin 2010, 136 troupeaux naturellement infectés par *Coxiella burnetii* ont été recrutés dans le Grand Ouest de la France. Pour être inclus dans le protocole, les troupeaux devaient répondre aux critères suivants : au moins 50% de résultats ELISA positifs parmi un échantillon d'au moins 6 vaches prélevées et un avortement imputable à *Coxiella burnetii* (confirmé par un résultat positif à *Coxiella burnetii* en PCR temps réel sur placenta) dans le mois précédant l'inclusion ou un résultat de lait de tank positif en PCR temps réel avec un seuil <36 Ct. Compte tenu de l'absence d'ELISA DIVA (Differentiating Infected and Vaccinated Animals), pour ne pas interférer dans l'estimation de la séroprévalence intra-troupeau, il ne devait pas y avoir eu de vaccination contre la fièvre Q depuis au moins 5 ans dans ces élevages. De plus, il ne devait pas y avoir eu d'utilisation systématique de tétracycline pour le traitement des troubles de la reproduction dans les 6 derniers mois avant l'inclusion. Une fiche de consentement a été signée par tous les éleveurs.

Toutes les femelles de plus de 12 mois, dont le vêlage était attendu au cours du protocole ont été incluses dans le protocole.

2.2. Protocole expérimental

2.2.1. Nature et allocation des traitements

À l'inclusion, 1 stratégie médicale parmi 4 a été aléatoirement attribuée à chaque élevage. Pour des raisons éthiques, du fait de l'efficacité déjà démontrée du vaccin sur les animaux sensibles (Arricau-Bouvery et al., 2005; Guatteo et al., 2008) et du statut sensible observé chez la plupart des génisses en élevages infectés (Taurel et al., 2011a), toutes les génisses (de 12 mois et plus) ont été vaccinées quelle que soit la stratégie attribuée à l'élevage. La stratégie aléatoirement attribuée concernait donc l'ensemble des vaches du troupeau et consistait en : (i) la vaccination avec un vaccin phase 1, (ii) la vaccination et l'antibiothérapie à base de

tétracycline, (iii) l'antibiothérapie seule ou (iv) aucun de ces traitements. La vaccination consistait en 2 injections de primo-vaccination à 21 jours d'écart, suivies d'une injection de rappel annuel. Dans les élevages dont la stratégie comprenait de l'antibiothérapie, 1 stratégie individuelle parmi 5 était attribuée aléatoirement aux vaches : (i) une injection au tarissement, (ii) une injection au vêlage, (iii) une injection au tarissement et au vêlage, (iv) une injection au tarissement et 15 jours après ou (v) une injection au tarissement, 15 jours après et au vêlage. Le vaccin utilisé était le vaccin inactivé à partir de *Coxiella burnetii* en phase 1 (Coxevac®, CEVA Santé Animale, Libourne, France). L'antibiotique utilisé était une oxytétracycline longue action (20 mg/kg par injection de Ténaline LA®, CEVA Santé Animale, Libourne, France).

Afin d'aider les éleveurs à respecter les stratégies incluant l'injection d'antibiotique attribuées à leurs animaux, un système d'envoi de SMS a été mis en place. La veille de l'injection (sur la base des dates de tarissement et vêlages estimées par le Contrôle Laitier), les éleveurs recevaient un SMS leur indiquant les animaux à traiter.

2.2.2. Echantillons biologiques et analyse au laboratoire

À l'inclusion, pour estimer la séroprévalence, un prélèvement de sang a été réalisé sur toutes les génisses de plus de 12 mois et les vaches laitières du troupeau. Ces prélèvements ont été envoyés au laboratoire IDAC-44 pour une recherche d'anticorps anti *Coxiella burnetii* par ELISA. Les analyses ont été effectuées, selon les instructions du fabricant, à l'aide du kit ELISA Fièvre Q de LSI (LSI, Lissieu, France), rapporté comme plus sensible car basé sur un antigène ovin (Horigan et al., 2011). Les sérums ont été classés selon le ratio S/P (Densité optique du prélèvement/ densité optique du control positif) suivant les recommandations du fabricant : les prélèvements étaient considérés comme négatifs pour un ratio S/P <40 et positifs dans les autres cas.

2.2.3. Nature et rythme des prélèvements

Du fait de la présence d'animaux forts excréteurs persistants, susceptibles de masquer une éventuelle diminution de la prévalence des excréteurs contribuant au lait de tank, le lait de mélange de primipares pourrait être un indicateur additionnel pertinent. Les animaux n'y sont présents que durant leur première lactation, ainsi son caractère dynamique permettrait d'avoir

un suivi plus fin de l'évolution de la prévalence d'excréteurs dans le troupeau de renouvellement. De plus, les caractéristiques des exploitations et les pratiques des éleveurs sont susceptibles d'avoir un impact sur les charges présentes dans l'environnement. Ainsi, le risque d'exposition auquel sont soumis les animaux pourrait ne pas être homogène dans l'environnement des animaux. Des prélèvements de poussières dans les bâtiments des animaux pourraient être représentatifs du risque permanent auquel les animaux sont exposés. Des prélèvements de litière (environnement qui peut être renouvelé de façon plus ou moins fréquente) apporteraient une information plus fine sur le risque d'exposition et sur la charge excrétée par les animaux sur une période plus ou moins courte avant le prélèvement en fonction des pratiques des éleveurs.

Au final 4 types de prélèvements sont réalisés dans les élevages : le lait de tank, le lait de mélange de primipares, la poussière cumulée dans les bâtiments et la poussière renouvelée sur l'aire d'exercice. Afin de pouvoir mesurer une diminution de la charge bactérienne dans ces prélèvements qui pourrait être associée à une efficacité des stratégies médicales, les 4 types de prélèvements ont été réalisés durant 18 mois. Dans tous les troupeaux, un prélèvement de lait de tank et de lait de mélange de primipares a été effectué à un rythme trimestriel (59% des troupeaux) ou mensuel (41% des troupeaux). Dans un sous-échantillon de 22 élevages en rythme de prélèvements mensuel, 2 types de prélèvements d'environnement ont été effectués. Des prélèvements de poussières cumulées dans les bâtiments ont été réalisés afin d'avoir un suivi de la pression infectieuse à laquelle sont soumis les animaux (support Chiffonnette®, Sodibox, Nevez, France) (**Figure 4- 1**). Des prélèvements de poussières renouvelées sur l'aire de travail des animaux, ont été réalisés pour tenir compte de la variation de charges bactériennes dues aux pratiques d'élevage (comme le renouvellement de la litière) (support Stérisox®, Sodibox, Nevez, France) (**Figure 4- 2**).

Ces 4 types de prélèvements ont été envoyés au laboratoire IDHESA (Quimper) pour détection et quantification, par analyse PCR en temps réel (kit TAQVET® *Coxiella burnetii*, LSI), de la charge de *Coxiella burnetii* présente. Les échantillons étaient considérés comme positif quant le Ct était inférieur au seuil de 40.

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

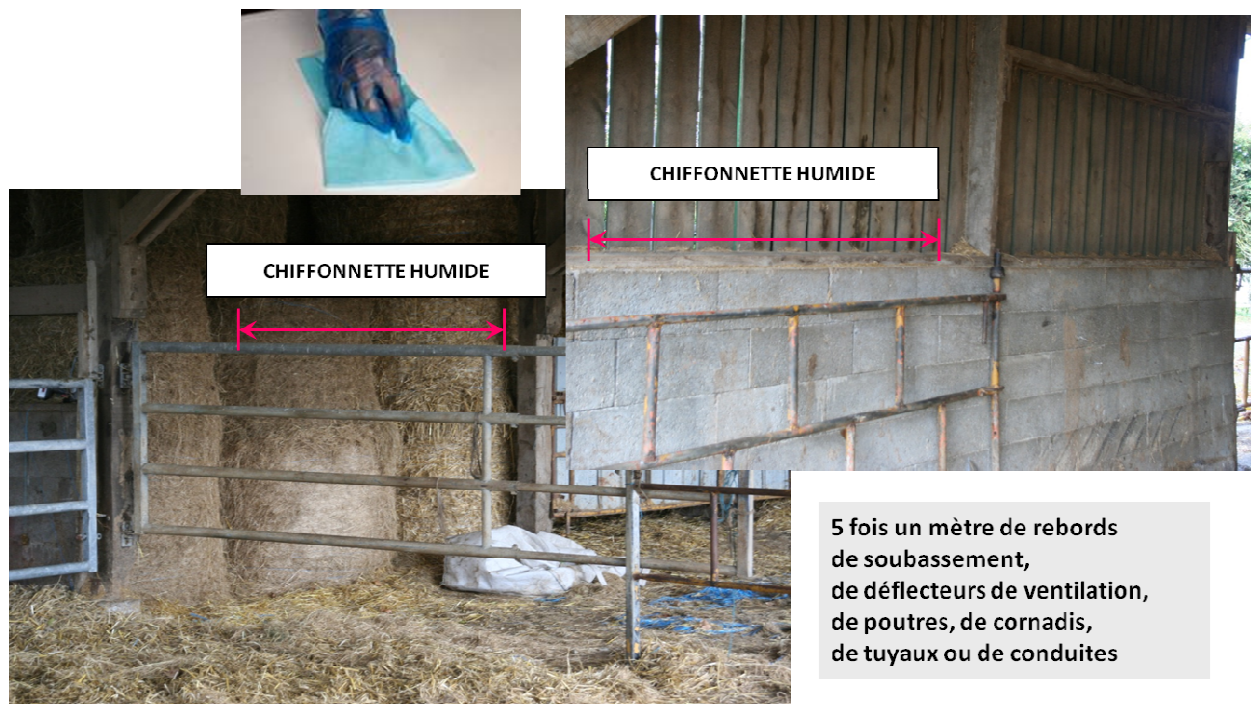


Figure 4- 1 : Procédure de prélèvement des poussières cumulées en bâtiments d'élevage à l'aide de Chiffonnette®



Figure 4- 2 : procédure de prélèvement des poussières renouvelées sur l'aire de vie des animaux dans l'élevage à l'aide de Stérisox®

2.3. Stratégie d'analyse

Les charges mesurées dans les quatre types de prélèvements (lait de tank, lait de mélange des primipares, poussières accumulées, poussière renouvelées) ont d'abord été décrites dans le temps.

Dans un second temps, dans les prélèvements de lait de tank et de lait de mélange de primipares, la relation entre l'évolution de la charge mesurée dans le prélèvement et la stratégie médicale appliquée dans chaque troupeau a été étudiée. Afin de ne prendre en compte que l'effet potentiel de la primo-vaccination sur l'évolution de la charge bactérienne dans les prélèvements, seuls ont été considérés les prélèvements réalisés dans les 13 mois suivant cette primo-vaccination : le suivi a donc été censuré avant le prélèvement pour lequel une vache ayant eu son rappel annuel de vaccination contribuait au tank.

La variable à expliquer était binaire et décrivait la variation de charge bactérienne mesurée dans les prélèvements entre le prélèvement du 1^{er} trimestre (T1) et les prélèvements des trimestres suivants (T2, T3, T4). A chaque temps, la charge bactérienne mesurée dans le prélèvement a été classée en 3 catégories : pas de bactérie détectée donc un prélèvement considéré comme négatif (0), de 1 à 100 bactéries détectées donc un prélèvement considéré comme faiblement positif (1) et plus de 100 bactéries détectées donc un prélèvement positif (2). Deux trajectoires d'évolution ont été considérées (**Figure 4- 3** et **Figure 4- 4**) : une évolution favorable ou une évolution défavorable. La définition de l'évolution défavorable reposait sur 2 hypothèses : une réduction de l'incidence des excréteurs qui serait associée à une diminution de la prévalence dans le temps et/ou une diminution de la charge excrétée par les animaux. L'évolution favorable était définie comme la persistance d'un résultat négatif, la transition d'un résultat positif (ou faiblement positif) vers un résultat négatif, ou la transition d'un résultat positif vers un résultat faiblement positif (**Figure 4- 3**). La définition de l'évolution favorable reposait également sur 2 hypothèses : l'absence d'effet observé sur l'incidence des animaux excréteurs de *Coxiella burnetii* qui serait associé à une augmentation potentielle de la prévalence au cours du temps du fait des nouveaux animaux excréteurs et/ou l'absence d'effet sur la charge excrétée. L'évolution défavorable était définie comme un résultat persistant positif de même classe, la transition d'un résultat négatif vers un résultat

positif (ou faiblement positif), ou la transition d'un résultat faiblement positif vers un résultat positif (Figure 4- 4).

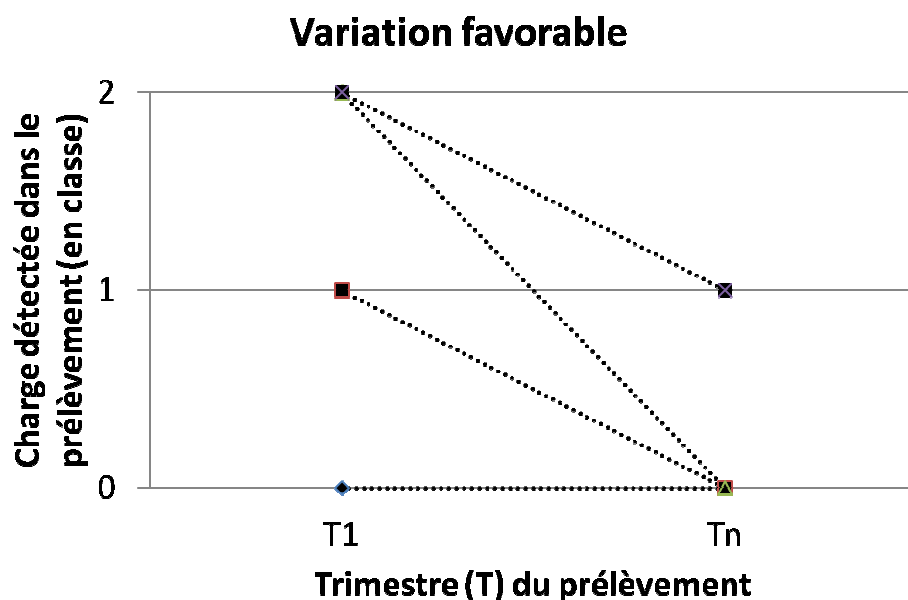


Figure 4- 3 : Trajectoires correspondant aux évolutions favorables des résultats de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans les prélèvements d'un troupeau (0 : pas de bactérie ; 1 :1 à 100 bactéries par mL de lait ; 2 : plus de 100 bactéries par mL de lait)

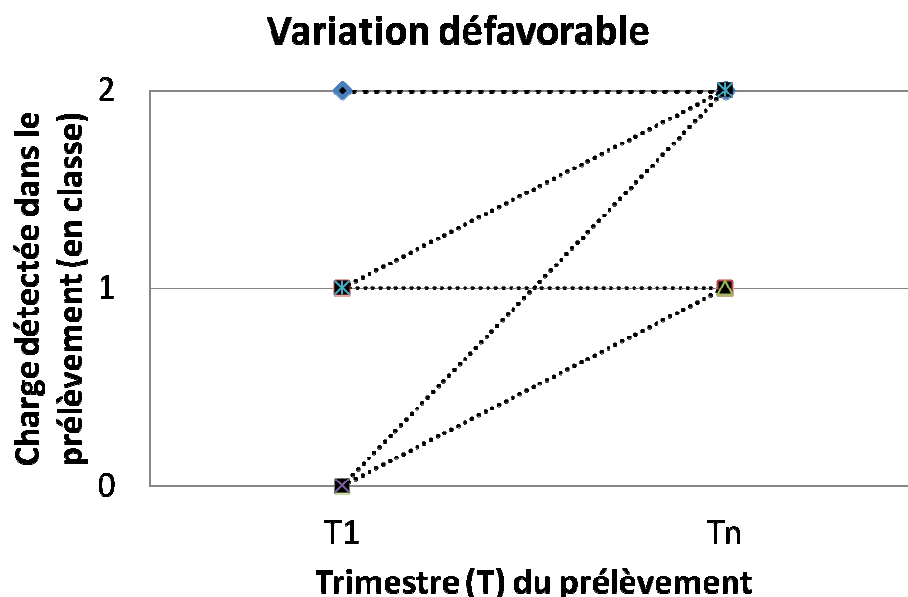


Figure 4- 4 : Trajectoires correspondant aux évolutions défavorables des résultats de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans les prélèvements d'un troupeau (0 : pas de bactérie ; 1 :1 à 100 bactéries par mL de lait ; 2 : plus de 100 bactéries par mL de lait)

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

Deux modèles d'analyse ont été utilisés.

Dans le modèle I, les stratégies médicales au temps T ont été décrites à travers 2 variables : (i) une variable catégorielle désignant la stratégie (A pour la vaccination, B pour la vaccination et l'antibiothérapie, C pour l'antibiothérapie, D pour le protocole sans traitement sur les vaches) ; (ii) le pourcentage d'animaux contribuant au tank et ayant reçu leur traitement attendu selon la stratégie (vaccination et/ou antibiotique), rapporté aux animaux contribuant au lait de tank au temps T.

Dans le modèle II, les stratégies médicales au temps T ont été décrites à travers des variables décrivant la proportion d'animaux vaccinés et d'animaux ayant reçu l'antibiotique respectivement, parmi les animaux contribuant au tank au temps T.

Dans chaque modèle, les variables d'ajustement décrivaient (i) la classe de charge bactérienne mesurée dans le prélèvement du 1^{er} trimestre du troupeau, (ii) la proportion de primipares, (iii) la proportion d'animaux initialement séropositifs contribuant au tank, (iv) le numéro d'ordre du prélèvement. Un effet aléatoire troupeau a été ajouté à chaque modèle, pour tenir compte de la non-indépendance des prélèvements intra-troupeau. Deux modèles logistiques mixtes d'étude de la probabilité d'évolution favorable de la charge bactérienne mesurée dans le prélèvement ont donc été réalisés. Les interactions d'ordre 1 ont été testées entre toutes les variables du modèle.

Dans le modèle 1, le risque pour un prélèvement j d'un troupeau i de suivre une variation favorable par rapport à une variation défavorable était :

$$- P1(Y=0/1)_{ij} = \beta_1 * \text{Classe_titre1} + \beta_2 * \text{protocole} + \beta_3 * \text{Proportion_totale} + \beta_4 * \text{Proportion_seropositif} + \beta_5 * \text{Proportion_primipare} + \beta_6 * \text{Trimestre} + \mu * \text{troupeau} + \varepsilon$$

Où $P(Y=0/1)$ était la probabilité pour un prélèvement i de l'élevage j de suivre une variation favorable par rapport au prélèvement précédent. Les paramètres β étaient les paramètres fixes du modèle avec : Classe_titre1, la classe de charge bactérienne mesurée dans le prélèvement du 1^{er} trimestre (0, 1 ou 2) ; Protocole, le protocole médical attribué à l'élevage (A, B, C ou D) ; Proportion_totale, le pourcentage (en classe) d'animaux ayant reçu tous les traitements associés au protocole parmi les animaux contribuant au tank à la date du prélèvement ([0-20]%, [20-40]%, $\geq 40\%$) ; Proportion_seropositif, le pourcentage (en classe) d'animaux

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

initialement détectés séropositifs parmi tous les animaux contribuant au tank à la date du prélèvement ([0-15[%, [15-30[% ou $\leq 30\%$) ; Proportion_primipare, le pourcentage (en classe) de primipares parmi les animaux contribuant au tank à la date du prélèvement ([0-30[% ou $\geq 30\%$) ; Trimestre ; le numéro d'ordre du trimestre du prélèvement considéré (2, 3 ou 4). L'effet troupeau (aléatoire) dans le modèle est représenté par μ et ε est le terme d'erreur.

Dans le modèle 2, le risque pour un prélèvement j d'un troupeau i de suivre une variation favorable par rapport à une variation défavorable était :

$$- P2(Y=0/1)_{ij} = \beta_1 * Classe_titre1 + \beta_2 * Proportion_vaccin + \beta_3 * Proportion_vaccin_avIA + \beta_4 * Proportion_antibiotique + \beta_5 * Proportion_antibiotique_tarissement + \beta_6 * Proportion_seropositif + \beta_7 * Proportion_primipare + \beta_8 * Trimestre + \mu * troupeau + \varepsilon$$

Avec les mêmes paramètres que pour le modèle I, sauf pour la stratégie médicale qui a été exprimée par : Proportion_vaccin, le pourcentage (en classe) d'animaux vaccinés parmi les animaux contribuant au tank à la date du prélèvement ([0-20[%, [20-80[%, $\geq 80\%$); Proportion_vaccin_avIA, le pourcentage (en classe) d'animaux vaccinés avant insémination artificielle parmi les animaux vaccinés contribuant au tank (0%,]0-30[%, $\geq 30\%$); Proportion_antibiotique, le pourcentage (en classe) d'animaux ayant reçu au moins une injection d'antibiotique au tarissement et/ou au vêlage parmi les animaux contribuant au tank (0%,]0-35[%, $\geq 35\%$) ; Proportion_antibiotique_tarissement, le pourcentage (en classe) d'animaux ayant reçu au moins une injection au tarissement parmi les animaux ayant reçu au moins une injection d'antibiotique au tarissement et/ou au vêlage contribuant au tank (0%,]0-67[%, $\geq 67\%$).

Les bornes des classes étaient choisies pour représenter une gradation *a priori* du risque et permettre d'assurer un effectif suffisant par classe.

Une procédure pas à pas descendante a été appliquée afin de conserver uniquement les variables significatives ($P < 0.05$) dans le modèle. Les variables « Proportion_seropositif » et « Trimestre » ont été forcées dans le modèle afin de conserver l'ajustement sur le temps et un indicateur du niveau d'infection dans le troupeau. De plus, dans le modèle II, les variables « Proportion_vaccin » et « Proportion_antibiotique » ont été forcées dans le modèle afin de conserver la totalité de l'information liée aux traitements reçus par les animaux.

3. Résultats

3.1. Description des effectifs de troupeaux

Au total 136 troupeaux ont été recrutés et 120 troupeaux ont été suivis jusqu'au terme de l'étude (18 mois). Parmi eux, 77 troupeaux avaient au moins 3 prélèvements trimestriels consécutifs de lait de mélange de primipares avec la totalité des informations sur les animaux constituant le lait de tank aux dates du prélèvement de lait de mélange de primipares, 74 troupeaux pour le prélèvement de lait de tank. Les prélèvements de poussières (Chiffonnette® et Stérisox®) ont été effectués dans un sous échantillon de 21 troupeaux, parmi eux, 13 troupeaux avaient des prélèvements par Chiffonnettes® pendant au moins 3 trimestres consécutifs et 14 troupeaux des prélèvements par Stérisox® (**Figure 4- 5**).

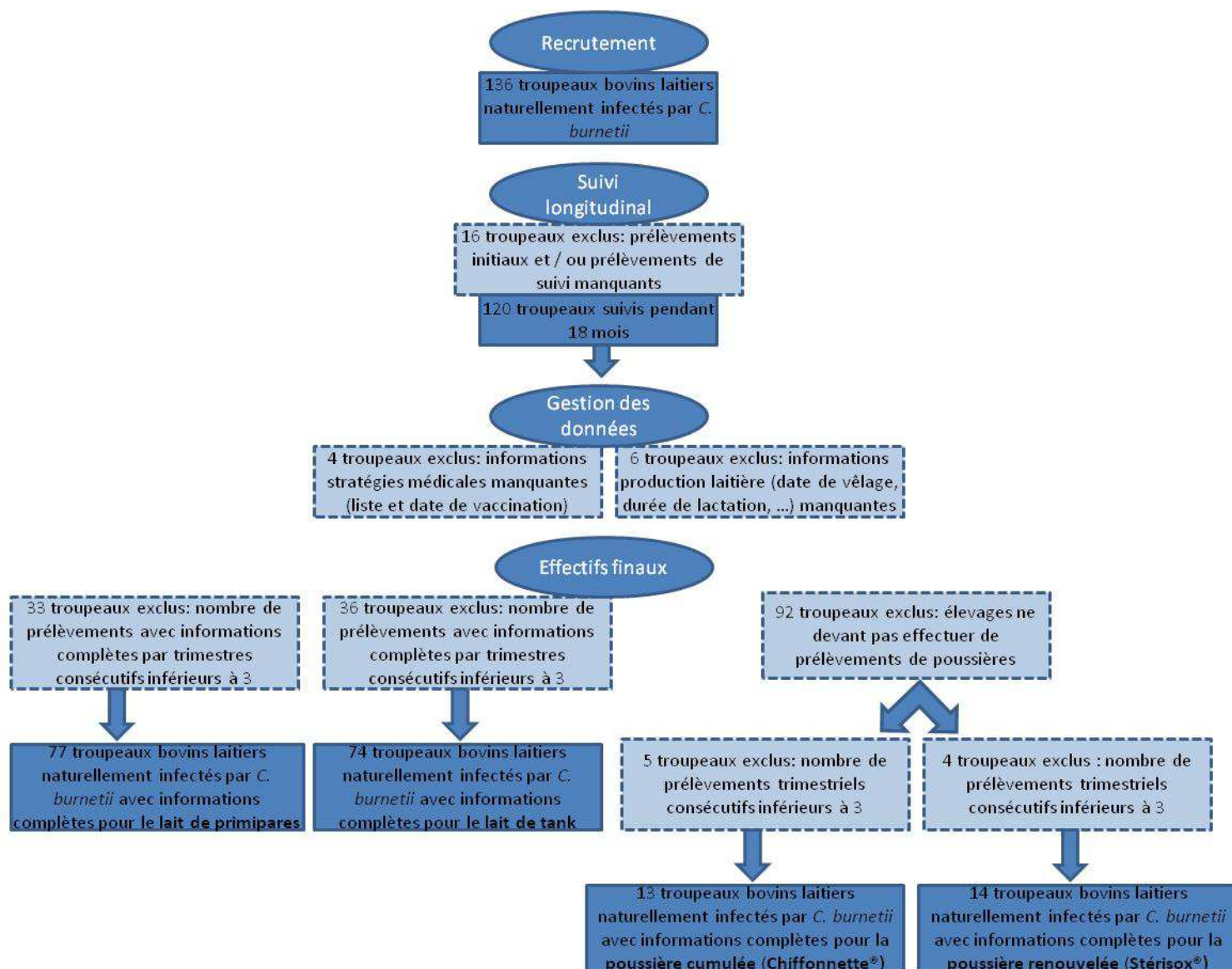


Figure 4- 5 : Diagramme de flux des effectifs de troupeaux pour l'analyse de la détection de *Coxiella burnetii* dans 4 types de prélèvements au niveau du troupeau

3.2. Description de la charge mesurée dans les 4 types de prélèvements

Quelle que soit la stratégie mise en place dans les élevages, il y avait plus de prélèvements positifs au 1^{er} trimestre parmi les prélèvements de lait de tank (Tableau 4- 1 et Tableau 4- 2) que parmi les prélèvements de lait de mélange de primipares (Tableau 4- 3 et Tableau 4- 4). Parmi les prélèvements de poussières, il y avait plus de prélèvements fortement positifs parmi les prélèvements de poussières cumulées dans les bâtiments (Chiffonnette®) (Tableau 4- 5)

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

que parmi les prélèvements de poussières renouvelées sur l'aire d'exercice (Stérisox®) (**Tableau 4- 5**) au premier trimestre. Les profils de variation du niveau de charge mesurée aux quatre trimestres consécutifs étaient assez variables d'un élevage à l'autre (constant, en augmentation, en diminution ou variable) quel que soit le type de prélèvement considéré et la stratégie médicale appliquée.

Le niveau de charge au trimestre 4 était fortement corrélé ($P < 0,05$) au niveau de charge mesuré au trimestre 1 pour le lait de tank, alors qu'aucune association statistiquement significative n'a été mise en évidence pour les autres types de prélèvements (**Tableau 4- 6**). Les prélèvements de lait de mélange de primipares, en particulier, étaient en majorité devenus négatifs au 4ème trimestre quelle que soit la stratégie médicale.

Tableau 4- 1 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de lait de tank en fonction du trimestre dans les troupeaux en stratégie A (vaccination) et B (vaccination et antibiothérapie)

	A														B																			
Trimestre 1	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Trimestre 2	0	0	1	1	2	2	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Trimestre 3	0	0	1	0	2	2	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Trimestre 4	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

0 = 0 bactérie par unité de prélèvement; 1 = 1 à 100 bactéries par unité de prélèvement ; 2 = plus de 100 bactéries par unité de prélèvement

Tableau 4- 2 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de lait de tank en fonction du trimestre dans les troupeaux en stratégie C (antibiothérapie) et D (pas de traitement)

	C														D																			
Trimestre 1	0	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Trimestre 2	0	0	1	2	2	2	0	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Trimestre 3	0	0	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Trimestre 4	2	2	2	0	1	2	0	0	2	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

0 = 0 bactérie par unité de prélèvement; 1 = 1 à 100 bactéries par unité de prélèvement ; 2 = plus de 100 bactéries par unité de prélèvement

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle du troupeau

Tableau 4- 5 : Evolution pour chaque troupeau (en colonne) de la classe de charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le prélèvement de poussières cumulées dans les bâtiments (Chiffonnette®) et dans le prélèvement de poussières renouvelées sur l'aire de travail des animaux (Chiffonnette®) en fonction du trimestre et de la stratégie médicale appliquée dans le troupeau

	Chiffonnette								Stérisoxx																				
	A		B		C		D		A		B		C		D														
Trimestre 1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	1	1	1	2	2	2	1	1	2	0	2	2	0	1	1	
Trimestre 2	0	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	0	0	1	0	1	2	0	2	0	0	2	2	0	0	0	2	
Trimestre 3	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	1	0	1	1	0	2	2	0	0	2	0	2	0	0	0	0
Trimestre 4	0	2	0	1	1	2	2	0	1	2	0	2	0	0	0	1	1	1	1	0	2	1	0	0	2	0	0	0	2

0 = 0 bactérie par unité de prélèvement; 1 = 1 à 100 bactéries par unité de prélèvement ; 2 = plus de 100 bactéries par unité de prélèvement

A : vaccination ; B : vaccination et antibiotique ; C : antibiotique ; D : aucun de ces traitements

3.3. Effet des stratégies médicales sur l'évolution de la charge bactérienne

3.3.1. Charge bactérienne mesurée dans le lait de tank

Dans le modèle 1, aucune des 2 variables décrivant la stratégie médicale appliquée n'étaient significativement liées à l'évolution du niveau de charge mesurée dans le lait de tank. Cependant, en observant les modalités des différentes stratégies, les stratégies incluant la vaccination (A et B) étaient associées à une augmentation de la probabilité d'évolution favorable par rapport à la stratégie D (**Tableau 4- 7**). Le modèle I a donc été resoumis à analyse en regroupant les stratégies avec vaccination (i.e., la modalité vaccination (A) regroupée avec la modalité vaccination et antibiotique (B)). Dans ce nouveau modèle, les stratégies incluant la vaccination (A et B) étaient significativement associées à une augmentation de la probabilité d'évolution favorable de la charge mesurée dans le lait de tank (OR=6,37, IC95% [1,40-29,10]). L'effet associé à la stratégie C (antibiothérapie) n'était pas significativement différent de celui de la stratégie D (pas de traitement) (OR=3,26, IC95% [0,60-17,85]). Dans le modèle 2, la vaccination était associée à la probabilité d'évolution favorable de la charge mesurée dans le lait de tank. La probabilité d'évolution favorable de la charge bactérienne mesurée dans le lait de tank diminuait lorsque la couverture vaccinale était inférieur à 80% (OR = 0,29, IC95% [0,09-0,95]). Aucune interaction n'était significative dans chacun des modèles.

Tableau 4- 6 : Comparaison de la distribution de la charge (en classe) de *Coxiella burnetii* mesurée dans les prélèvements au trimestre 4 en fonction de la charge (en classe) mesurée au trimestre 1

Niveau de charge trimestre 1	Lait de Tank (n=74)				Lait de primipare (n=77)				Poussière accumulée (n=13)				Poussière renouvelée (n=14)			
	Niveau de charge au trimestre 4				Niveau de charge au trimestre 4				Niveau de charge au trimestre 4				Niveau de charge au trimestre 4			
	0	1	2	P	0	1	2	P	0	1	2	P	0	1	2	P
0	9	0	0	<0,001	25	1	5	0,57	1	0	1	1,0	2	0	0	0,08
1	0	3	4		14	1	2		0	0	0		3	0	2	
2	7	7	33		12	3	2		3	3	4		1	4	1	

(0 = 0 bactérie par unité de prélèvement ; 1 = 1 à 100 bactéries par unité de prélèvement ; 2 = plus de 100 bactéries par unité de prélèvements)

Tableau 4- 7 : Probabilité d'évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de tank de 74 troupeaux en fonction des stratégies médicales appliquées (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®). Seules les variables significativement associées au risque ou forcées sont présentées.

Variable	Modèle 1			Variable	Modèle 2		
	Risque d'évolution favorable				Risque d'évolution favorable		
	OR	IC 95%	P		OR	IC 95%	P
Stratégie			0,11	Stratégie			0,048
A ^a	5,84	1,16-29,47		A+B	6,37	1,40-29,10	
B ^b	7,12	1,34-37,83		C	3,26	0,60-17,85	
C ^c	3,28	0,59-18,35		D	1		
D ^d	1						
				Couverture vaccinale			0,01
				[0-20[%	0,29	0,09-0,95	
				[20-80[%	0,17	0,05-0,62	
				≥ 80 %	1		
				Couverture antibiotique			0,23
				0	0,99	0,28-3,50	
]0-35%[2,48	0,65-9,38	
				≥ 35%	1		

A^a : vaccination ; B^b : vaccination et antibiotique ; C^c : antibiotique ; D^d : pas de traitement

Le sens et l'amplitude des effets des autres facteurs restaient proches, quel que soit le modèle (**Tableau 4- 8**). Seule la charge mesurée au trimestre 1 impactait significativement ($P < 0,05$) l'évolution ultérieure de la charge bactérienne mesurée dans le lait de tank. Une charge positive au trimestre 1 était associée à une diminution de la probabilité d'évolution favorable.

Tableau 4- 8 : Probabilité d'évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de tank de 74 troupeaux en fonction de la classe de la charge mesurée au trimestre 1, de la proportion d'animaux initialement séropositifs contribuant au tank à la date du prélèvement et du trimestre (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®)

Variable	Risque d'évolution favorable		
	OR	IC 95%	P
Classe_charge1			0,008
2	0,10	0,02-0,50	
1	0,04	0,004-0,38	
0	1		
Proportion_seropositif			0,13
[0-15[%	4,25	0,94-19,28	
[15-30[%	1,01	0,34-2,95	
≥30%)	1		
Trimestre			0,23
2	0,41	0,15-1,15	
3	0,57	0,23-1,44	
4	1		

3.3.2. Charge bactérienne mesurée dans le lait de mélange de primipares

Pour les prélèvements de lait de mélange de primipares, aucune des variables décrivant les stratégies n'était significativement associée à la variation de charge bactérienne mesurée dans le prélèvement (**Tableau 4- 9**). Le sens et l'amplitude des effets des facteurs autres que les stratégies médicales étaient proches quel que soit le modèle. Seul le trimestre était significativement associé à une diminution de la probabilité d'évolution favorable (**Tableau 4- 10**), avec un risque d'évolution favorable qui était moins élevé pour les prélèvements les plus proches dans le temps du 1^{er} prélèvement.

CHAPITRE 4 : Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de maîtrise médicale à l'échelle troupeau

Tableau 4- 9 : Probabilité d'évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de mélange de primipares de 77 troupeaux en fonction des stratégies médicales appliquées (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®)

Variable	Risque d'évolution favorable			Variable	Risque d'évolution favorable		
	OR	IC 95%	P		OR	IC 95%	P
protocole			0.46	Couverture vaccinale			0.84
A ^a	0.97	0.27-3.54		[0-20[%	0.75	0.27-2.05	
B ^b	2.49	0.61-10.06		[20-80[%	0.79	0.28-2.27	
C ^c	1.22	0.31-4.78		≥ 80 %	1		
D ^d	1			Couverture antibiotique			0.33
				0	0.45	0.13-1.53	
]0-35%[0.77	0.21-2.82	
				≥ 35%	1		

A^a : vaccination ; B^b : vaccination et antibiotique ; C^c : antibiotique ; D^d : pas de traitement

Tableau 4- 10 : Probabilité d'évolution favorable de la charge de *Coxiella burnetii* mesurée dans le lait de mélange de primipares de 77 troupeaux en fonction de la charge mesurée au trimestre 1, de la proportion d'animaux initialement séropositifs contribuant au lait de mélange de primipares à la date du prélèvement et du trimestre (Régression logistique mixte, Proc GLIMMIX SAS 9.2®)

Variable	Risque d'évolution favorable		
	OR	IC 95%	P
Classe_titre1			0.38
2	0.57	0.19-1.72	
1	0.49	0.17-1.45	
0	1		
Proportion_seropositif			0.34
[0-15[%	1.84	0.49-6.96	
[15-30[%	1.95	0.75-5.04	
≥30%)	1		
Trimestre			0.013
2	0.27	0.10-0.68	
3	0.62	0.25-1.56	
4	1		

4. Discussion

Cette étude est la première visant à évaluer l'efficacité de stratégies médicales, combinant ou non la vaccination et l'antibiothérapie, sur la charge bactérienne mesurée dans le lait de tank, le lait de mélange de primipares et dans l'environnement de troupeaux bovins laitiers naturellement infectés.

L'originalité de cette étude repose sur plusieurs éléments. Tout d'abord, la puissance statistique : l'effectif de troupeaux sur lequel les stratégies médicales ont pu être mises en place est supérieur à celui d'autres études portant sur l'évaluation de stratégies médicales (Behymer et al., 1977; Woernle et al., 1985; Berri et al., 2001; Arricau-Bouvery et al., 2005; Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009b; Astobiza et al., 2010a; Astobiza et al., 2011a; de Cremoux et al., 2011; Hogerwerf et al., 2011). Les effectifs ici sont de 13 à 78 troupeaux en fonction des prélèvements étudiés et de 23 à 14 troupeaux par stratégie médicale dans les prélèvements de lait de tank et de lait de mélange de primipares, contre au plus 14 troupeaux dans les études précédentes.

La stratégie médicale appliquée à la totalité du troupeau, *i.e.* telle que mise en œuvre en pratique de routine, notamment pour la vaccination, permet de transposer ces résultats à ce qui pourrait être observé sur le terrain de façon plus robuste que lors d'essai de vaccination partielle (Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009b; Astobiza et al., 2011a; de Cremoux et al., 2011). Cette transposition est d'autant plus aisée qu'il s'agit d'une étude menée dans des troupeaux naturellement infectés, différente d'une étude en conditions expérimentales où les animaux sont infectés par inoculation ou élevés dans des conditions différentes des pratiques en élevage commercial (Arricau-Bouvery et al., 2005).

Le choix des critères d'efficacité permet une estimation de la prévalence d'excréteurs (par le biais du lait de tank et du lait de mélange de primipares) et une mesure de la pression infectieuse à laquelle sont soumis les animaux (par le biais des poussières cumulées et des poussières renouvelées). Le choix d'une mesure à l'échelle du troupeau et dans l'environnement représente mieux l'impact des stratégies médicales sur la dynamique d'infection qu'un prélèvement sur un échantillon d'animaux du troupeau (Hogerwerf et al., 2011).

Du fait qu'une évolution favorable de la charge mesurée dans le prélèvement de lait de tank indique une diminution de la prévalence d'excréteurs et/ou de la quantité de bactéries excrétées, la vaccination apparaît donc associée à une diminution de la charge détectée et/ou du nombre d'excréteurs dans le lait de tank. Ces résultats sont en accord avec les résultats d'études sur l'excrétion individuelle. Dans ces études la vaccination était associée à une diminution (de Cremoux et al., 2011) ou une prévention de l'excrétion chez les animaux vaccinés sensibles et non gestants (Guatteo et al., 2008) et à une diminution de la charge chez des animaux dans des troupeaux infectés ou chez des animaux vaccinés infectés (Rousset et

al., 2009b; Hogerwerf et al., 2011; Taurel et al., 2012a). Cet effet est d'autant plus marqué pour une couverture vaccinale importante ($\geq 80\%$). Une étude chez l'Homme portant sur le choléra a montré que l'augmentation de la couverture vaccinale augmentait significativement la protection indirecte des personnes non vaccinées et améliorait la protection des personnes vaccinées : l'incidence de nouveaux cas était de 5.28 pour 1000 individus quand au moins 20% étaient vaccinés et de 3.27 pour 1000 individus quand plus de 80% étaient vaccinés (Root et al., 2011).

L'antibiothérapie n'est, quand à elle, pas associée au risque d'évolution favorable dans le temps. Une étude menée à l'échelle individuelle sur la charge excrétée dans le mucus vaginal, montrait pourtant une association entre l'antibiothérapie au tarissement et la prévention de l'excrétion mesurée au plus tard dans les 4 jours suivant le vêlage (Taurel et al., 2012a). Plusieurs facteurs sont potentiellement explicatifs de ces résultats divergents. Premièrement, dans le cadre de notre étude, les animaux contribuant au tank avaient un intervalle d'au moins 7 jours entre le vêlage et l'inclusion dans le tank. Le moment de mesure de l'excrétion n'était donc pas le même. Deuxièmement, à l'échelle du troupeau, le lait était la matrice d'intérêt alors qu'à l'échelle individuelle, il s'agissait du mucus vaginal. Une étude (Guatteo et al., 2007b) a montré que ces voies n'étaient pas concomitantes. Enfin, la dilution du lait dans le tank (mélange de laits d'animaux excréteurs et non excréteurs, d'animaux ayant reçu de l'antibiotique ou non, animaux ayant reçu de l'antibiotique à un intervalle plus ou moins éloigné de la date du prélèvement) peut avoir masqué une diminution de la charge qui aurait pu être observée à l'échelle individuelle.

L'absence de *Coxiella burnetii* dans le prélèvement du premier trimestre est associée à une augmentation de la probabilité de suivre une variation favorable. On peut supposer que les troupeaux ayant une charge nulle dans le premier prélèvement de lait de tank, sont ceux qui sont susceptibles d'avoir une proportion importante d'animaux sensibles, *i.e.* sur lesquels le vaccin serait le plus à même de prévenir l'excrétion. Au 1^{er} trimestre, 75% des troupeaux avec un prélèvement nul ont également une séroprévalence des animaux contribuant au tank qui est nul, ce pourcentage est de 25% pour les troupeaux avec un prélèvement positif et de 0% pour les troupeaux avec un prélèvement faiblement positif. Ces troupeaux auraient pu être les plus susceptibles de subir une augmentation de leur niveau d'excrétion, puisque le nombre d'animaux pouvant devenir excréteurs y était plus important. L'évolution favorable suivie par ces troupeaux est en accord avec une efficacité du vaccin sur les populations sensibles.

La variation de la charge mesurée dans le lait de mélange de primipares n'est pas associée aux stratégies médicales (**Tableau 4- 9**). Toutes les génisses, sauf oubli, ayant été vaccinées, le lait de mélange de primipares est constitué de laits d'animaux en majorité vaccinés. Il était donc attendu que la majorité des prélèvements aient une charge mesurée nulle à la fin du suivi (**Tableau 4- 3 et Tableau 4- 4**). La seule variable associée à l'évolution de la charge mesurée dans le lait de mélange de primipares est le temps (mesuré en trimestre), avec une probabilité d'évolution favorable diminuée dans les prélèvements de lait de mélange de primipares faits en début de suivi (**Tableau 4- 10**). Ces prélèvements sont composés de primipares ayant intégré le troupeau adulte (source d'exposition à *Coxiella burnetii* (Enright et al., 1971)), *i.e.* susceptibles d'avoir été exposés à des aérosols infectieux, avant la mise en place des stratégies médicales. La diminution de la charge mesurée pourrait être associée à l'évolution naturelle de l'infection, mais la majorité des animaux composant ce prélèvement ayant été vaccinés, cette évolution pourrait également correspondre à la composition du prélèvement, *i.e.* plus on avance dans le temps plus le lait de mélange de primipares est composé uniquement d'animaux protégés par vaccination avant d'entrer dans le troupeau adulte. Les résultats obtenus dans le lait de tank, *i.e.* l'effet des stratégies médicales et l'absence d'effet du temps sur l'évolution de la charge mesurée, sont en faveur de la deuxième hypothèse.

Concernant la charge bactérienne mesurée dans l'environnement, la proportion des prélèvements avec une charge mesurée nulle augmente dans le temps, quelle que soit la stratégie médicale mise en œuvre sur les vaches (**Tableau 4- 5**). Dans les prélèvements de poussières renouvelées, la charge mesurée diminue beaucoup plus vite que dans les prélèvements de poussières cumulées. Ceci est conforme à l'hypothèse selon laquelle le curage et le renouvellement de la litière diminue la quantité de bactérie contenue dans l'environnement des animaux. Ces résultats semblent indiquer l'intérêt du renouvellement de la litière dans la diminution de la pression infectieuse et donc du risque d'exposition des animaux sains dans des troupeaux infectés. De plus dans les poussières renouvelées, la charge mesurée serait plus représentative de la composition du troupeau à l'instant du prélèvement, *i.e.*, l'entrée de primipares vaccinées commune à toutes les stratégies, ce qui pourraient expliquer la diminution de la proportion de prélèvements positifs en fin de suivi. Cependant, le rôle du renouvellement de la litière dans l'aérosolisation des bactéries est mal documenté. Ainsi, dans certaines conditions cette mesure pourrait être contre-productive et provoquer l'exposition d'animaux sensibles non protégés.

Si la PCR en temps réel permet d'avoir un suivi semi-quantitatif de la charge détectée, elle ne permet pas de distinguer les bactéries vivantes des bactéries mortes. Ainsi, pour une même charge bactérienne mesurée, les implications en termes de risque de propagation de l'infection peuvent être totalement différentes si la proportion de bactéries mortes est faible ou importante. Cette limite a pu entraîner une sous-estimation de l'effet des stratégies médicales si celles-ci ont eu un effet sur la viabilité des bactéries excrétées. Ainsi, dans le cas des prélèvements réalisés dans l'environnement, il est possible que la diminution de la charge mesurée soit associée à une diminution de l'excrétion des animaux mais également à une dégradation du matériel génétique de bactéries mortes (mais présentes dans l'environnement depuis le premier trimestre).

Dans cette étude, l'intérêt a été porté sur le lait de tank, car le lait est la voie d'excrétion la plus courante ; et sur l'environnement, car la charge bactérienne mesurée est susceptible d'avoir un impact sur la dynamique d'infection (risque d'exposition). Lorsque les génisses sont vaccinées, la stratégie médicale appliquée au troupeau adulte n'a pas d'effet sur le niveau de charge bactérienne mesuré dans le lait de mélange de primipares. Cependant, la charge bactérienne diminue globalement dans les prélèvements de lait de mélange de primipares et d'environnement, confirmant l'intérêt de la vaccination *a minima* des génisses pour diminuer la pression infectieuse. Au niveau du troupeau adulte, dans le lait de tank, la vaccination induit une diminution de la charge mesurée dans les prélèvements. Ces résultats confirment l'intérêt de la vaccination simultanée de la totalité du troupeau, le plus tôt possible, pour diminuer la prévalence des excréteurs et l'intensité de l'excrétion. De plus, l'absence d'association entre l'antibiothérapie et la variation de charge mesurée, *a priori* contradictoire avec la prévention de l'excrétion observée au vêlage à l'échelle individuelle, donne des éléments pour la rationalisation de l'utilisation des antibiotiques et des éléments d'aide à la formulation de protocoles de maîtrise médicale de l'infection par *Coxiella burnetii* en élevage infecté. Si l'utilisation de l'antibiothérapie a un impact trop limité pour qu'il soit observé à l'échelle du troupeau, elle devrait peut-être être réservée aux situations de forte prévalence d'excréteurs lors de saisons denses de vêlage. Compte tenu de la résistance de *Coxiella burnetii* dans l'environnement, il serait intéressant de disposer d'éléments concernant le temps nécessaire de mise en place des stratégies médicales et l'impact des stratégies non médicales pour atteindre une forte diminution de l'excrétion dans le troupeau et de la charge bactérienne de *Coxiella burnetii* dans l'environnement des troupeaux infectés. À cette fin la modélisation mathématique peut être un outil d'intérêt (Courcoul et al., 2011).

Références

- Anonymous, 2012. Q-fever death toll reached at least 24. DutchNews.nl.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327-349.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats : excretion routes. *Vet. Res.* 34, 423-433.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *The Veterinary Journal* 184, 172-175.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2011. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res Vet Sci* 91, e58-63.
- Behymer, D., Ruppner, R., Riemann, H.P., Biberstein, E.L., Franti, C.E., 1977. Observation on chemotherapy in cows chronically infected with *Coxiella burnetii* (Q fever). *Folia Vet. Lat.* 7, 64-70.
- Berri, M., Crochet, D., Santiago, S., Rodolakis, A., 2005. Spread of *Coxiella burnetii* infection in a flock of sheep after an episode of Q fever. *Vet Rec* 157, 737-740.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet Rec.* 148, 502-505.
- Courcoul, A., Hogerwerf, L., Klinkenberg, D., Nielen, M., Vergu, E., Beaudou, F., 2011. Modelling effectiveness of herd level vaccination against Q fever in dairy cattle. *Veterinary research* 42, 9.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Pape, M., 2011. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS immunology and medical microbiology*.
- DeLay, P.D., Lennette, E.H., DeOme, K.B., 1950. Q Fever in California: II. Recovery of *Coxiella burnetii* from Naturally-Infected Air-Borne Dust. *J Immunol* 65, 211-220.
- Enright, J.B., Franti, C.E., Longhurst, W.M., Behymer, D.E., Wright, M.E., Dutson, V.J., 1971. *Coxiella burnetii* in a wildlife-livestock environment. Antibody response of ewes and lambs in an endemic Q fever area. *American journal of epidemiology* 94, 62-71.
- Greenslade, E., Beasley, R., Jennings, L., Woodward, A., Weinstein, P., 2003. Has *Coxiella burnetii* (Q fever) been introduced into New Zealand? *Emerg. Infect. Dis.* 9, 138-140.
- Guatteo, R., Beaudou, F., Joly, A., Seegers, H., 2007a. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. *Zoon. Pub. Health.* 54, 191-194.

- Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H., 2007b. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.* 38, 849-860.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328.
- Hawker, J.I., Ayres, J.G., Blair, I., Evans, M.R., Smith, D.L., Smith, E.G., Burge, P.S., Carpenter, M.J., Caul, E.O., Coupland, B., Desselberger, U., Farrell, I.D., Saunders, P.J., Wood, M.J., 1998. A large outbreak of Q fever in the West Midlands: windborne spread into a metropolitan area? *Communicable disease and public health / PHLIS* 1, 180-187.
- Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H.I.J., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D., Nielen, M., 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of Goats and Sheep, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 379-386.
- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R., Pritchard, G.C., 2011. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 924-931.
- Roest, H.I.J., Tilburg, J., Van der Hoek, W., Vellema, P., Van Zijderveld, F.G., Klaassen, C.H.W., Raoult, D., 2011. The Q fever epidemic in The Netherlands : history, onset, response and reflection. *Epidemiology and infection* 139, 1-12.
- Root, E.D., Giebultowicz, S., Ali, M., Yunus, M., Emch, M., 2011. The role of vaccine coverage within social networks in cholera vaccine efficacy. *PloS one* 6, e22971.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., 2009a. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Applied and environmental microbiology* 75, 428-433.
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M., Gasnier, T., Duquesne, V., Thiery, R., Aubert, M.F., 2009b. Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 2, 188-189.
- Schimmer, B., Lutikholt, S., Hautvast, J.L.A., Graat, E.A.M., Vellema, P., Duynhoven, Y.T.H.P.v., 2011. Seroprevalence and risk factors of Q fever in goats on commercial dairy goat farms in the Netherlands, 2009-2010. *BMC Veterinary Research* 7, (30 December 2011).
- Tainturier, D., 1987. Recurrent metritis due to Q fever in cows. *Recl. Med. Vet.* 163, 195-198.
- Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2011. Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine* 101, 51-57.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, accepté le 23 Avril 2012.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezri, M., Raoult, D., 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1264-1269.
- To, H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1998. Prevalence of *Coxiella burnetii* Infection in Dairy Cattle with Reproductive Disorders. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 859-861.

von Elm, E., Altman, D.G., Egger, M., Pocock, S.J., Gãtzsche, P.C., Vandenbroucke, J.P., 2007. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies. *Preventive Medicine* 45, 247-251.

Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., Kaplan, W., 1959. Q fever studies. XXI. The recovery of *Coxiella burnetii* from the soil and surface water of premises harboring infected sheep. *Am. J. Hyg.* 70, 14-20.

Woernle, H., Limouzin, C., Muler, K., Durand, M.P., 1985. La fièvre Q bovine - effets de la vaccination et de l'antibiothérapie sur l'évolution clinique et l'excrétion de coxiella dans le lait et les sécrétions utérines. *Bull. Acad. Vet. De France* 58, 91-100.

Yanase, T., Muramatsu, Y., Inouye, I., Okabayashi, T., Ueno, H., Morita, C., 1998. Detection of *Coxiella burnetii* from dust in a barn housing dairy cattle. *Microbiology and immunology* 42, 51-53.

CHAPITRE 5

Discussion générale

L'objectif général de cette thèse était d'évaluer l'efficacité de mesures de maîtrise médicale pour contrôler l'infection par *Coxiella burnetii* agent de la fièvre Q, dans des troupeaux bovins laitiers naturellement infectés.

Ce travail visait en particulier à 1) décrire la situation de troupeaux bovins laitiers naturellement infectés par *Coxiella burnetii* en termes de niveau d'infection et de caractéristiques et pratiques d'élevages associées et d'évaluer l'intérêt d'un test ELISA appliqué au lait de tank comme outil d'estimation de la séroprévalence intra-troupeau, 2) évaluer l'efficacité de mesures de maîtrise médicale pour limiter l'excrétion de *Coxiella burnetii* à l'échelle individuelle et 3) à l'échelle du troupeau.

Suite à l'épidémie humaine de fièvre Q aux Pays-Bas, une requête a été faite par la Commission Européenne auprès de l'EFSA (« European Food Safety Authority »). Cette requête concernait les informations et besoins d'informations nécessaires pour déterminer l'amplitude, la distribution, l'impact et l'importance de l'infection et de la maladie dans les troupeaux ruminants et chez l'Homme, les facteurs de risque pour la persistance et la diffusion de *Coxiella burnetii* et les options de contrôle dans les populations de ruminants domestiques (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). Le rapport produit a conclu au besoin de connaissances et donc de recherches relatif à 3 domaines :

- l'estimation de l'occurrence de la fièvre Q dans les états membres de l'Union Européenne, pour une meilleure compréhension de l'ampleur et de la distribution de la maladie et de l'infection (centrée sur les animaux d'élevages et les Hommes),

- l'évaluation des facteurs de risque de l'occurrence et de la persistance de la fièvre Q dans les élevages et le risque associé pour l'Homme, en prenant en compte la présence et la densité de troupeaux sensibles et la gestion d'élevage associée,

- l'évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise médicale et des mesures de maîtrise non médicale.

La discussion générale aura pour objectif d'exposer l'apport de nos résultats, leurs limites et les perspectives associées, à la lumière de ces 3 besoins de recherche identifiés.

1. Occurrence de l'infection par *Coxiella burnetii*

Le premier besoin de connaissances concernait l'occurrence de la fièvre Q chez l'Homme et chez l'animal (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

L'étude de la littérature (Annexe 1 : Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review (Guatteo et al., 2011)) montre qu'il n'y a, à l'échelle du globe, chez les ruminants, aucune estimation de prévalence fiable de l'infection à l'échelle nationale. Les estimations disponibles (par région ou à des échelles plus ou moins importantes) sont très variables selon les études avec des valeurs pour les vaches allant de 0 à 100% pour la prévalence animale ou de 4.4 à 100% pour la prévalence troupeau (Annexe 1 : Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review (Guatteo et al., 2011)). Cette variabilité peut certes traduire des prévalences d'infections différentes, mais également être la conséquence de définitions différentes pour considérer des troupeaux ou animaux infectés, de différences relatives aux méthodes d'échantillonnages et/ou aux outils diagnostics utilisés (chapitre 1 ; Annexe 1 : Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review (Guatteo et al., 2011)).

La fièvre Q n'est pas une maladie à déclaration obligatoire dans tous les pays de l'Union Européenne et elle n'est entrée dans le système de notification des maladies zoonotiques animales de l'Union Européenne (catégorie B : maladies à notifier en fonction du contexte épidémiologique) qu'à partir de 2005 (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010; Sidi-Boumedine et al., 2010). Un projet mené en 2010 en Europe a permis d'identifier la forte variabilité d'information disponible entre pays européens dans le cadre de cette notification (Sidi-Boumedine et al., 2010). De plus, ce projet a permis de proposer une procédure d'harmonisation pour les espèces cibles (les ruminants), de la définition d'un troupeau cliniquement infecté et de la procédure de diagnostic sur la base de l'utilisation de l'ELISA et de la PCR (Sidi-Boumedine et al., 2010). En France, très peu de données sont disponibles et il n'y a aucune estimation à l'échelle nationale. Pour y remédier, un plan de surveillance clinique de la fièvre Q dans les avortements de ruminants est en train d'être mis en place dans 10 départements pilotes par la Direction générale de l'alimentation (DGAL, 2011). Ce plan de surveillance devrait être opérationnel avant la fin du premier semestre 2012. L'objectif est d'estimer la proportion d'élevages cliniquement atteints par la fièvre Q parmi les ovins, caprins et bovins, selon une procédure commune à celle proposée dans les

recommandations du rapport EFSA cité précédemment. Ces différents projets concourent à répondre au besoin d'harmonisation des procédures diagnostiques au niveau européen identifié par l'EFSA (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). Cependant, en l'absence de méthode de référence pour le diagnostic de la fièvre Q, ces recommandations ne sont basées que sur les connaissances actuellement disponibles. Ainsi, l'ELISA qui est considérée comme la méthode de détection indirecte la plus sensible (Peter et al., 1987b; AFSSA, 2004; EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010; Horigan et al., 2011) apparaît dans certaines études moins sensible que d'autres méthodes, telles que la fixation du complément (FC) ou l'immuno-fluorescence indirecte (IFI) (Emery et al., 2012; Kantso et al., 2012). Cependant l'ELISA reste la méthode la plus pratique à utiliser à grande échelle car plus rapide que l'IFI (Kantso et al., 2012) et globalement plus sensible que la FC en dehors des situations où les animaux n'ont pas développé de réponses IgG (Kittelberger et al., 2009). De plus, il est difficile d'affirmer que ces différences soient dues à un manque de sensibilité de l'ELISA ou un manque de spécificité des méthodes considérées. Ainsi, l'interprétation d'un résultat de diagnostic individuel est délicate. Ces difficultés sont prises en compte dans les recommandations d'harmonisation de diagnostic de fièvre Q (Guatteo et al., 2005; ACERSA, 2007; EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010; Sidi-Boumedine et al., 2010). Il est recommandé d'établir un diagnostic de fièvre Q à l'échelle du troupeau après suspicion clinique, notamment sur la base de l'existence d'avortements répétés en excluant les autres agents abortifs et en confirmant le diagnostic de fièvre Q par le recours à des méthodes complémentaires (PCR et ELISA) appliquées sur des prélèvements adaptés (placenta pour PCR) et issus d'un échantillon d'animaux (ELISA). D'où l'utilisation de plusieurs critères diagnostiques pour définir un troupeau comme infecté dans le cadre de notre étude : un avortement imputable à *Coxiella burnetii* impliquant un diagnostic différentiel et un résultat positif en PCR associé à une analyse ELISA menée sur au moins 6 vaches avec au moins 50% de résultats positifs.

L'infection par *Coxiella burnetii* étant souvent asymptomatique chez les ruminants, l'avortement est le seul signe clinique à l'origine de la recherche et du diagnostic de fièvre Q en routine. Contrairement aux petits ruminants (Sanford et al., 1994), chez les bovins l'avortement est un événement rare. Ainsi, lorsque *Coxiella burnetii* est identifiée comme agent responsable, le niveau d'infection dans l'élevage peut être très variable (Woldehiwet, 2004). De ce fait, les troupeaux bovins laitiers présentent l'intérêt d'être, sur la base d'un même signe clinique visible et identifiable, une population qui offre un contexte sanitaire

diversifié avec une étendue de l'infection plus ou moins importante dans le troupeau. En effet, dans le cadre de notre étude nous avons observé des séroprévalences intra-troupeau très variées (chapitre 2). L'utilisation conjointe de l'ELISA et de la PCR nous garantissait de recruter des troupeaux infectés contenant des animaux excréteurs et représentant ainsi un potentiel risque zoonotique.

Dans nos travaux, les séroprévalences intra-troupeau faibles et peu variables observées chez les nullipares confirment le statut fréquemment séronégatif de cette catégorie d'animaux (chapitre 2). Chez les vaches laitières les séroprévalences intra-troupeau observées étaient élevées et variables (chapitre 2). Les nullipares conservaient leur statut majoritairement sensible même au sein des troupeaux présentant une forte séroprévalence intra-troupeau observée chez les vaches laitières. Deux hypothèses peuvent expliquer ce statut chez les génisses. Du fait du défaut de sensibilité des techniques diagnostiques utilisées, on ne peut exclure la présence de faux négatifs. Cette différence de prévalence pourrait également être due à une meilleure réponse immunitaire des jeunes animaux. Cette hypothèse est évoquée chez l'Homme, chez qui les enfants (avant la puberté) paraissent moins infectés que les adultes (Maltezou and Raoult, 2002; Raoult et al., 2005; Terheggen and Leggat, 2007; Tissot-Dupont et al., 2007). De plus, compte-tenu de la place centrale de l'immunité cellulaire, l'ELISA ne serait pas la méthode la plus adaptée. Des investigations relatives au degré de l'immunité cellulaire dans les différentes classes d'âge pourraient éclairer cette hypothèse. Mais au final, en l'état des connaissances actuelles, nos résultats confirment le fait que les nullipares sont une cible de choix pour le vaccin qui a été montré comme efficace sur les animaux sensibles (Guatteo et al., 2008).

Ces résultats soulignent la nécessité de mesurer, pour définir le risque associé, l'étendue de l'infection chez les vaches laitières. Le lait de tank ayant déjà fait ses preuves comme matrice d'intérêt pour mesurer la séroprévalence intra-troupeau dans d'autres infections (infection par le virus de la diarrhée virale bovine par exemple) (Beaudeau et al., 2001), nous nous sommes intéressés à sa valeur informative pour estimer à moindre coût la séroprévalence intra-troupeau.

Nos travaux rapportent qu'un seuil de densité optique de 100 (ratio S/P de l'ELISA) permettait d'identifier les troupeaux présentant une séroprévalence intra-troupeau moyenne de

20% d'animaux infectés. Ainsi, cet outil peut permettre d'identifier des troupeaux dans lesquels un nombre important d'animaux sont encore séronégatifs et donc des troupeaux où la vaccination est susceptible d'être plus efficace pour diminuer la pression infectieuse. De plus, la littérature rapporte, pour le même kit ELISA, que la meilleure concordance entre un résultat ELISA et PCR sur le lait de tank est obtenue pour un seuil de densité optique de 93 (ratio S/P de l'ELISA), donc proche de notre seuil, et de 100 bactéries par mL de lait (estimé par PCR) (van den Brom et al., 2012). Dans cette étude la séroprévalence intra-troupeau associée au seuil de densité optique de 100 est de 17,3% (donc cohérente avec nos résultats) et le seuil de 100 bactéries par mL de lait estimé par PCR est associé à une séroprévalence intra-troupeau de 9% (van den Brom et al., 2012). Ainsi, l'utilisation du seuil de densité optique de 100 (ratio S/P de l'ELISA appliquée au lait de tank) permettrait de distinguer des troupeaux avec une prévalence peu importante d'animaux porteurs d'anticorps et d'animaux excréteurs.

Afin de mener nos analyses sur des données les plus pertinentes possibles, les prélèvements effectués plus de 3 semaines après la première injection de vaccin, soit au plus tard le jour de la 2^{ème} injection de vaccin, étaient supprimés de l'analyse. Ainsi les animaux qui auraient pu être considérés comme séropositifs à tort du fait d'anticorps provenant de la vaccination (Arricau-Bouvery et al., 2005) et non de l'infection étaient éliminés. Cette sélection a été encore plus stricte pour l'échantillon de l'analyse menée sur l'évaluation de la valeur informative du lait de tank pour mesurer la séroprévalence intra-troupeaux. Les prélèvements de sang et de lait devaient avoir eu lieu au plus tard le jour de la 1^{ère} injection de primo-vaccination, sinon le troupeau était exclu de l'analyse. Ainsi, malgré les difficultés liées à la transmission et à la validité des informations en provenance des élevages, nous avons fait le choix de mener nos analyses sur des données les plus robustes possibles, quitte à perdre un effectif conséquent de notre échantillon de départ, soit de 7 à 60 troupeaux éliminés selon les analyses.

La mise en œuvre d'un test ELISA appliqué au lait de tank pourrait permettre, en l'absence de vaccination, de déterminer le statut des troupeaux vis-à-vis de la fièvre Q dans le cadre de fusion de troupeaux, par exemple pour analyser *a priori* le risque lié à des statuts sanitaires différents, mais également de déterminer et de suivre l'évolution dans le temps des statuts sanitaires des troupeaux dans le cadre de surveillance épidémiologique. Cependant, il est possible notamment dans le cas de grands troupeaux, que des troupeaux soient considérés à tort comme ayant une faible prévalence de l'infection. Dans ces situations, la combinaison

avec une analyse PCR sur lait de tank pourrait limiter le nombre de troupeaux qui seraient considérés à tort comme peu ou non infectés.

2. Facteurs de risque et mesures de maîtrise non médicale de l'infection par *Coxiella burnetii*

L'identification des facteurs de risque associés à l'occurrence permettrait d'améliorer les protocoles de mesures de maîtrise en renseignant sur le caractère contrôlable ou non contrôlable des facteurs identifiés. Quand les facteurs de risque sont contrôlables, il est alors possible d'envisager la mise en place de mesures de maîtrise non médicale pour les contrôler.

Dans le cadre de notre travail, l'étude transversale a permis d'identifier des facteurs associés à des séroprévalences intra-troupeau élevées (chapitre 2). La date de début d'infection dans les élevages étant inconnue, les facteurs liés à l'occurrence ou à la persistance ne peuvent être identifiés car les pratiques d'élevage ont pu évoluer entre le début d'infection et le recrutement de l'élevage dans notre étude. Les facteurs de risque que nous avons identifiés sont ainsi ceux associés à une variation de la séroprévalence plutôt qu'à l'occurrence ou à la persistance de l'infection au sens strict. Indirectement, ils permettent donc d'appréhender les mesures liées à une propagation plus ou moins aisée de *Coxiella burnetii* au sein du troupeau.

Malgré le nombre important de variables décrivant les facteurs de risque potentiels testées (17 variables), seules 3 ont été identifiées comme significativement associées aux variations de prévalence (regroupement des vêlages, retrait systématique des produits d'avortements et taille du troupeau < 46 vaches). De plus, parmi ces 3 mesures, seul le retrait systématique des produits de la parturition semble maîtrisable, la taille du troupeau et le regroupement des vêlages étant des facteurs intrinsèques à la conduite de l'élevage. Le renforcement des règles d'hygiène associées à la parturition est donc plus que jamais à appliquer.

Contrairement à nos hypothèses, nous n'observons pas de relations entre les caractéristiques associées aux effluents d'élevage (gestion de la litière et du fumier, caractéristiques de stockage...) (chapitre 2). Les effluents d'élevage (litière et fumier) peuvent pourtant contenir de fortes charges de bactéries et être associés à une diffusion de l'infection au sein du troupeau et dans le voisinage (Astobiza et al., 2011b). Nos résultats semblent cependant conformes à l'absence de cas humains en périphérie proche des zones d'épandage de fumier et lisier

constatée lors de l'épidémie aux Pays-Bas (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010). Cependant les risques associés aux effluents ne sont pas à négliger et devraient être précisés puisque plusieurs caractéristiques sont susceptibles d'influer sur le risque infectieux associé à ces matières. Dans le cadre du fumier de vache par exemple, le taux d'humidité, la couverture de la fumière, la température, la force des vents auxquels il est soumis sont des paramètres impactant l'aérosolisation des bactéries contenues et ainsi le risque d'infection associé. Cependant, la diminution de la charge mesurée dans les prélèvements dans la litière des animaux, plus rapide que celle mesurée dans les poussières de bâtiments (chapitre 4), semble indiquer un impact du retrait de la litière sur la charge présente et donc sur le risque d'exposition des animaux. Mais, le caractère exploratoire de cette mesure (la PCR sur poussière pour des mesures de charges bactériennes dans l'environnement n'est pas une méthode validée), l'absence d'information sur la viabilité des bactéries ou sur le caractère représentatif des prélèvements réalisés (entre élevages et au sein d'un même élevage entre temps de prélèvements) limitent les conclusions qui auraient pu en être tirées en termes de risque infectieux.

Dans un objectif de limitation de l'exposition à et de la diffusion de l'infection par *Coxiella burnetii*, les mesures d'hygiène autour du vêlage semblent importantes. Ainsi, nos résultats ont montré en particulier l'importance du retrait systématique des produits de l'avortement. Mais notre étude ne répond qu'à l'identification de facteurs de risque de transmission au sein d'un troupeau et pas à l'identification de ce risque entre troupeaux, *i.e.* la transmission vers un troupeau sain. Or, ce sont des éléments également importants pour la formulation de protocoles de maîtrise de l'infection par *Coxiella burnetii* qu'il conviendrait d'investiguer.

Pour déterminer les facteurs de risque d'occurrence de l'infection il serait intéressant de mettre en place une étude longitudinale prospective et recruter des troupeaux non infectés ayant des caractéristiques à risque (proximité de troupeaux infectés, achat d'animaux,...). Les facteurs à prendre en compte sont multiples, puisque du fait de la diversité d'hôtes, de l'aérosolisation de la bactérie et de sa résistance dans l'environnement, plusieurs sources, telles que la faune sauvage et le vent, en plus de l'introduction d'animaux infectés peuvent être mises en cause. Dans ce cadre, des prélèvements individuels, exigeant une pression de prélèvement importante, seraient nécessaires. C'est une situation où l'utilisation du lait de tank pourrait permettre, en l'absence de vaccination des troupeaux, la détection des troupeaux dont les animaux deviendraient séropositifs vis-à-vis de l'infection par *Coxiella burnetii* et/ou

excréteurs. De plus, les charges excrétées dans le mucus vaginal, les produits de la parturition, les urines et les fèces contaminant l'environnement, des prélèvements d'air pourraient renseigner sur le risque d'exposition, en plus ou à la place des prélèvements de poussières. Les prélèvements d'air présentent aussi l'intérêt pour l'appréciation du risque d'infection puisque ce sont les bactéries aérosolisées qui peuvent être inhalées. Ces derniers sont d'autant plus intéressants que les matières telles que le fumier ou la litière des animaux peuvent présenter des problèmes d'homogénéité.

Ainsi, l'impact relatif des mesures de maîtrise non médicale sur la propagation entre troupeaux et l'occurrence de l'infection restent à explorer. Compte tenu des contraintes associées à leur mise en place (chapitre 1), il est en effet important d'identifier les mesures qui ont réellement un impact sur le risque de propagation de l'infection de celles qui n'en ont pas.

Au final, ces résultats mettent l'accent sur l'importance de respecter les règles d'hygiène classiquement recommandées en élevage, notamment celles centrées sur le vêlage. Au vu du peu de caractéristiques associées à des séroprévalences élevées et à la difficulté de modification associée à certaines de ces caractéristiques, la combinaison avec des mesures de maîtrise médicale efficaces apparaît essentielle.

3. Efficacité des mesures de maîtrise médicale de l'infection par *Coxiella burnetii*

Il est important dans les études observationnelles en troupeaux commerciaux de contrôler la mise en place et l'observance du protocole d'étude. Notre étude, menée dans 13 départements français, a fait intervenir plus de 200 participants au travers de 120 élevages recrutés, impliquant le même nombre d'éleveurs et leurs vétérinaires traitants, 13 vétérinaires de groupement de défense sanitaire départementaux et un certain nombre de techniciens pour les appuyer, le personnel de 2 laboratoires départementaux d'analyses (respectivement pour les analyses ELISA et PCR), le personnel du laboratoire pharmaceutique CEVA pour fournir le vaccin et l'antibiotique et un technicien, une doctorante et 2 chercheurs de l'équipe de recherche. Cette organisation a été mise en place pour garantir un suivi le moins lourd possible pour les éleveurs participant à cette étude. Cependant, la multiplication des intervenants et des intermédiaires dans la transmission des informations peut être source d'un biais d'information concernant les données recueillies.

Les traitements ont été attribués de façon aléatoire afin de limiter le biais de sélection et de rendre les groupes recevant les différents traitements les plus comparables possibles entre eux. Les distributions des séroprévalences intra-troupeau à l'inclusion, par stratégie médicale attribuée, n'étant pas différentes entre elles confirment cette équivalence. Cependant, l'attribution de traitements ne renseigne pas sur l'observance et donc sur l'exposition réelle des animaux à ces traitements. Un retour d'information sur l'observance des stratégies a été systématiquement demandé aux éleveurs et les animaux non notés comme traités ont été considérés comme non traités, même si ils devaient l'être en théorie. Les animaux étaient donc considérés comme effectivement traités par rapport à une population d'animaux non traités ou sans connaissance qu'un traitement ait été réalisé. Ainsi, autant que faire se peut, nous avons essayé de disposer de données nous permettant d'estimer un effet à l'exposition réelle au traitement. En observant les différences entre animaux qui auraient dû être traités et ceux qui ont été notés comme traités, nous arrivions à 66% d'animaux qui auraient dû et ont effectivement été traités (antibiotique et/ou vaccin). Cependant, les analyses d'efficacité des mesures de maîtrise médicale effectuées à partir des données attendues (considérant les animaux qui auraient dû être traités comme traités) avaient les mêmes tendances que celles que nous avons obtenues.

Un biais de participation ne peut pas être exclu. Des éleveurs avec de nombreux problèmes dans leur troupeau ont pu refuser un protocole attribué trop « léger » (vaccination uniquement des génisses) par rapport aux contraintes qu'il imposait (pression de prélèvements). De plus, les éleveurs confrontés à une prévalence de troubles importante peuvent avoir appliqué d'autres mesures plus générales (meilleure observation des animaux par exemple) qui auraient ainsi « potentialisé » la stratégie médicale mise en œuvre.

Concernant les études sur le vaccin phase 1, les premières études en conditions expérimentales (Arricau-Bouvery et al., 2005) et de vaccination partielle (Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009b; Astobiza et al., 2011b; de Cremoux et al., 2011) ou totale (Hogerwerf et al., 2011), ont permis d'identifier des facteurs de variation de l'efficacité vaccinale que sont le statut vis-à-vis de l'infection et le statut de gestation avant vaccination. Ainsi, dans le cadre de notre étude ces 2 éléments ont été pris en compte. À l'échelle du troupeau, ces paramètres ont été estimés avec la séroprévalence intra-troupeau à l'inclusion et le pourcentage d'animaux vaccinés non gestants. Cependant, l'absence d'interaction entre le statut sérologique initial et la vaccination à l'échelle individuelle, montre les limites du statut sérologique pour décrire le

statut infectieux. Le fait que l'effet de la vaccination ne dépende pas du statut sérologique peut s'expliquer par la difficulté à détecter les infections précoces par ELISA (i.e. avant 3 semaines (Boden et al., 2010; Porter et al., 2011)) et le délai qu'il y a pu y avoir entre l'estimation du statut et la vaccination, avec des séroconversions qui auraient pu avoir lieu dans cet intervalle et qui auraient donc conduit à considérer à tort dans nos analyses des animaux infectés comme non infectés. L'ELISA utilisée détecte, comme tous les kits ELISA actuellement commercialisés, les anticorps dirigés à la fois contre des antigènes de *Coxiella burnetii* en phase 1 et en phase 2. Or une récente étude a montré que 50% des animaux détectés séropositifs avec une ELISA spécifique des anticorps antiphase 2 n'étaient pas détectés par une ELISA antiphase 1/antiphase 2 (Böttcher et al., 2011). Ces résultats sont probablement en lien avec les profils différents observés lors d'infections aiguës ou chroniques. Cette étude laisserait penser à un manque de sensibilité des ELISA antiphase 1 et 2 à détecter des animaux uniquement porteurs d'anticorps antiphase 2 du fait par exemple de peu d'antigènes antiphase 2 disponibles sur les plaques ELISA en comparaison aux antigènes antiphase 1. Les ELISA phases spécifiques utilisées dans cette étude n'étant pas validées, ces hypothèses restent à confirmer. Enfin, l'ELISA ne permet d'identifier que la réponse humorale alors que *Coxiella burnetii* est une bactérie intracellulaire ; ainsi l'utilisation de techniques diagnostiques permettant d'identifier la réponse cellulaire aurait pu améliorer la définition des statuts vis-à-vis de l'infection par *Coxiella burnetii*.

Les bornes choisies pour définir les classes de charge mesurée par PCR temps réel n'ont pas été les mêmes à l'échelle individuelle (chapitre 3) et à l'échelle du troupeau (chapitre 4). Rappelons que les résultats dans le mucus vaginal étaient exprimés en 4 classes : négatif (0 bactérie par mL de mucus vaginal), faible positif (0 à 100 bactéries par mL de mucus vaginal), positif (plus de 100 à 10000 bactéries par mL de mucus vaginal) et fortement positif (plus de 10000 bactéries par mL de mucus vaginal). Les résultats dans le lait de tank, dans le lait de mélange de primipares et dans les prélèvements d'environnement étaient exprimés en 3 catégories : négatif (0 bactérie par unité de prélèvement), faible positif (0 à 100 bactéries par unité de prélèvement) et positifs (plus de 100 bactéries par unité de prélèvement). Ce choix était justifié par des raisons biologiques et statistiques (pour garantir des effectifs minimum par classe). Des charges élevées de bactéries ont été en effet mesurées dans le mucus vaginal au vêlage (période à risque élevé de pic d'excrétion) contrairement au lait de tank, notamment, où moins de 3% des prélèvements avaient une charge supérieure à 10000 bactéries par mL. Ce faible pourcentage de prélèvement de lait de tank avec un très haut

niveau de charge mesurée se retrouve dans la littérature (van den Brom et al., 2012) et peut s'expliquer par le fait qu'à l'échelle du troupeau les prélèvements sont soumis à un effet de dilution (mélange du lait d'animaux non excréteurs et excréteurs). La littérature rapporte que les séroprévalences intra-troupeau observées entre les élevages avec un lait de tank très positif et un lait de tank faiblement positif sont significativement différentes, ces 2 catégories ne pouvaient donc pas être regroupées (van den Brom et al., 2012). La différence entre des séroprévalences intra-troupeau associées à un lait de tank faiblement positif et à un lait de tank négatif n'étant pas significative, la question du sens biologique de la catégorie « faiblement positive » demeure.

Sur le troupeau adulte, nos résultats ont permis de montrer que l'utilisation de l'oxytétracycline au tarissement pouvait prévenir l'excrétion mesurée au vêlage dans le mucus vaginal (chapitre 3). Une deuxième injection d'antibiotique apparaissait inutile (chapitre 3) et l'absence d'effet sur l'excrétion mesurée à l'échelle du troupeau (chapitre 4) souligne l'importance d'une stratégie à établir au cas par cas pour éviter un effet contre-productif, à savoir l'absence d'effet de l'oxytétracycline sur le niveau de charge bactérienne globale mais un risque de développement d'antibiorésistance. Cependant, en considérant les séroprévalences plus élevées dans les troupeaux pratiquant le regroupement des vêlages (chapitre 2), et l'effet préventif d'une injection de tétracycline au tarissement sur l'excrétion au vêlage (chapitre 4), l'utilisation de l'oxytétracycline pourrait apparaître utile pour limiter la pression infectieuse dans les troupeaux présentant un fort niveau d'infection et pratiquant le regroupement des vêlages. Cet antibiotique apparaît donc comme un outil à utiliser à court terme dans un cadre bien précis et nos résultats fournissent des bases pour une utilisation raisonnée des antibiotiques.

En ce qui concerne la vaccination, l'évaluation de l'efficacité de la vaccination des génisses n'était pas un de nos objectifs. Les données disponibles dans la littérature montraient déjà le caractère souvent sensible des génisses et l'efficacité du vaccin sur ces animaux (Guatteo et al., 2008). Nos résultats ont néanmoins confirmé l'efficacité de la vaccination des génisses pour prévenir l'excrétion (chapitre 3). De plus la diminution globale de la charge mesurée dans le temps dans les prélèvements de lait de mélange de primipares et d'environnement pourrait être due en partie à la vaccination des génisses réalisée dans tous les troupeaux. Mais

l'absence de troupeaux témoins (avec des génisses non vaccinées) ne nous permet pas d'affirmer qu'il y ait effectivement un lien entre la vaccination des génisses et la diminution globale de la charge mesurée. Des analyses menées sur des troupeaux témoins pourraient permettre dans un futur proche de déterminer si l'évolution de l'excrétion dans le lait de mélange de primipares observée dans notre étude suit la même évolution (en direction et dynamique) que lors d'infection naturelle sans mise en place de mesure de maîtrise médicale de l'infection. A cette fin, 15 élevages naturellement infectés sur lesquels aucune stratégie de maîtrise médicale de la fièvre Q n'a été mise en oeuvre ont été recrutés aux Pays Bas et sont actuellement soumis aux mêmes prélèvements et analyses.

La vaccination du troupeau adulte apparaît associée à la diminution de la charge mesurée à la fois à l'échelle de l'individu (chapitre 3) et à l'échelle du troupeau (chapitre 4). Dans notre étude, le fait de vacciner les vaches avant ou après insémination artificielle (IA) ne semble pas avoir d'impact sur l'efficacité du vaccin alors que chez les génisses, un effet préventif plus marqué du vaccin administré avant IA est noté sur l'excrétion au vêlage (chapitre 3). En revanche, l'importance de la couverture vaccinale du troupeau influence l'efficacité du vaccin (chapitre 4). Ainsi, la vaccination simultanée de la totalité du troupeau le plus tôt possible suite à l'infection serait une stratégie de choix pour limiter le risque d'infection des animaux (en conférant une protection vaccinale) au sein de troupeaux infectés. Cependant, nos résultats ne portent que sur l'effet des traitements dans les 12 premiers mois suite à leur mise en place. Nos résultats ne correspondent donc, dans le cas de la vaccination, qu'à l'effet de la primo-vaccination. La question du temps nécessaire de mise en place de la vaccination demeure. Une étude observationnelle à grande échelle portant sur le temps nécessaire pour arriver à une forte diminution de l'infection paraît irréalisable, ne serait-ce que parce que le temps de suivi qui serait nécessaire est inconnu. Dans ce but, l'utilisation de la modélisation, avec des modèles alimentés par des études observationnelles les plus précises possible en termes d'impact des stratégies médicales sur les charges excrétées, est d'intérêt (Courcoul et al., 2011).

Les résultats de nos travaux sont, notamment dans le cas de l'antibiothérapie, restreints par le fait qu'ils ne portent que sur l'efficacité des mesures de maîtrise médicale sur l'excrétion. Il aurait été intéressant de disposer de données sur l'impact de l'infection et des stratégies sur les

avortements, les autres signes cliniques attribuables à la fièvre Q et les performances de production et reproduction. Sur ces dernières la littérature rapporte en effet des résultats contradictoires quant au rôle de *Coxiella burnetii*, par exemple dans l'infertilité et sur les métrites (To et al., 1998; Muskens et al., in press). Or, ces connaissances sont indispensables pour évaluer le rapport coût/bénéfice des différentes stratégies de maîtrise. Il est prévu de mener de telles analyses dans un futur proche.

Références

- ACERSA, 2007. Proposition de plan de maîtrise de la fièvre Q dans les élevages cliniquement atteints.
- AFSSA, 2004. Fièvre Q : Rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion en élevage. AFSSA, p. 42.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A., 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., Garcia-Perez, A.L., 2011. Four-Year Evaluation of the Effect of Vaccination against *Coxiella burnetii* on Reduction of Animal Infection and Environmental Contamination in a Naturally Infected Dairy Sheep Flock. *Applied and environmental microbiology* 77, 7405-7407.
- Beaudeau, F., Assié, S., Seegers, H., Belloc, C., Sellal, E., Joly, A., 2001. Assessing the within-herd prevalence of cows antibody-positive to bovine viral diarrhoea virus with a blocking ELISA on bulk tank milk *Vet. Rec.* 149, 236-240.
- Boden, K., Wagner-Wiening, C., Seidel, T., Baier, M., Bischof, W., Straube, E., Kimmig, P., 2010. Diagnosis of acute Q fever with emphasis on enzyme-linked immunosorbent assay and nested polymerase chain reaction regarding the time of serum collection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 68, 110-116.
- Böttcher, J., Vossen, A., Janowetz, B., Alex, M., Gangl, A., Randt, A., Meier, N., 2011. Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd. *Veterinary Microbiology* In Press, Corrected Proof.
- Courcoul, A., Hogerwerf, L., Klinkenberg, D., Nielen, M., Vergu, E., Beaudeau, F., 2011. Modelling effectiveness of herd level vaccination against Q fever in dairy cattle. *Veterinary research* 42, 9.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David, V., Pape, M., 2011. Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS immunology and medical microbiology*.
- DGAL, 2011. Mise en place d'une surveillance de la fièvre Q dans des départements pilotes.
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010. Scientific Opinion on Q Fever. *EFSA Journal*. p. 114.
- Emery, M.P., Ostlund, E.N., Schmitt, B.J., 2012. Comparison of Q fever serology methods in cattle, goats, and sheep. *J Vet Diagn Invest* 24, 379-382.
- Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2005. Maladies abortives en élevage laitier. Fièvre Q : quels prélèvements, chez quelles vaches? *Point Vet.* 36, 40-42.

- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328.
- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.-F., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Veterinary Microbiology* 149, 1-16.
- Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H.I.J., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D., Nielen, M., 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of Goats and Sheep, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 379-386.
- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R., Pritchard, G.C., 2011. Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 924-931.
- Kantso, B., Svendsen, C.B., Jorgensen, C.S., Krogfelt, K.A., 2012. Comparison of two commercially available ELISA antibody test kits for detection of human antibodies against *Coxiella burnetii*. *Scandinavian journal of infectious diseases* In press.
- Kittelberger, R., Mars, J., Wibberley, G., Sting, R., Henning, K., Horner, G.W., Garnett, K.M., Hannah, M.J., Jenner, J.A., Piggott, C.J., O'Keefe, J.S., 2009. Comparison of the Q-fever complement fixation test and two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of serum antibodies against *Coxiella burnetii* (Q-fever) in ruminants : recommendations for use of serological tests on imported animals in New Zealand. *New Zealand veterinary journal* 57, 262-268.
- Maltezou, H.C., Raoult, D., 2002. Q fever in children. *Lancet Infect Dis* 2, 686-691.
- Muskens, J., Wouda, W., von Bannisseht-Wijsmuller, T., van Maanen, C., In Press. Prevalence of *Coxiella burnetii* infections in aborted fetuses and stillborn calves. *Vet Rec* 170, 260.
- Peter, O., Dupuis, G., Peacock, M.G., Burgdorfer, W., 1987. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of *Coxiella burnetii* antibody. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1063-1067.
- Porter, S.R., Czaplicki, G., Mainil, J., Guatteo, R., Saegerman, C., 2011. Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *International journal of microbiology* 2011, 248418.
- Raoult, D., Marrie, T.J., Mege, J.L., 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. *The Lancet Infectious Diseases* 5, 219-226.
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M., Gasnier, T., Duquesne, V., Thiery, R., Aubert, M.F., 2009. Efficiency of a phase I vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 2, 188-189.

Sanford, S.E., Josephson, G.K., MacDonald, A., 1994. *Coxiella burnetii* (Q fever) abortion storms in goat herds after attendance at an annual fair. The Canadian veterinary journal 35, 376-378.

Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Henning, K., Ziller, M., Niemczuck, K., Roest, H.I.J., Thiéry, R., 2010. Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA, p. 111.

Terheggen, U., Leggat, P.A., 2007. Clinical manifestations of Q fever in adults and children. Travel medicine and infectious disease 5, 159-164.

Tissot-Dupont, H., Vaillant, V., Rey, S., Raoult, D., 2007. Role of sex, age, previous valve lesion, and pregnancy in the clinical expression and outcome of Q fever after a large outbreak. Clin Infect Dis 44, 232-237.

To, H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1998. Prevalence of *Coxiella burnetii* Infection in Dairy Cattle with Reproductive Disorders. J. Vet. Med. Sci. 60, 859-861.

van den Brom, R., van Engelen, E., Luttikholt, S., Moll, L., van Maanen, K., Vellema, P., 2012. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from dairy goat and dairy sheep farms in The Netherlands in 2008. Vet Rec.

Woldehiwet, Z., 2004. Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. Research in Veterinary Science 77, 93-100.

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse était d'évaluer des mesures de maîtrise médicale de l'infection par *Coxiella burnetii* en troupeau bovin laitier naturellement infecté. Nos résultats ont permis de montrer que la vaccination est associée à une diminution de la charge bactérienne mesurée à la fois à l'échelle de l'individu et à l'échelle du troupeau. De plus, ils ont permis de démontrer l'efficacité de l'administration d'une injection sous-cutanée d'oxytétracycline (20mg/kg) au tarissement pour prévenir l'excrétion au vêlage dans le mucus vaginal chez les vaches. Enfin, ils permettent de considérer une situation (troupeau présentant une forte prévalence d'excréteurs et des vêlages groupés) pour laquelle cet effet pourrait être observé à l'échelle du troupeau.

Au-delà des mesures de maîtrise médicale, nos travaux ont permis d'évaluer l'intérêt du lait de tank comme outil de mesure du statut sérologique des troupeaux vis-à-vis de la Fièvre Q. De plus, les travaux effectués ont mis en évidence l'influence de mesures de maîtrise non médicale pour limiter la diffusion de l'infection dans un troupeau infecté, notamment l'importance du respect des mesures d'hygiène dans les élevages.

En termes de répercussions opérationnelles, les résultats produits fournissent des outils pour la détection et le suivi d'élevages infectés et des éléments pour la formulation de protocoles de maîtrise de l'infection par *Coxiella burnetii* chez les bovins. Ils ouvrent également la voie vers des pistes de recherche qu'il serait intéressant d'explorer afin de répondre aux préoccupations des éleveurs concernant les conditions de mise en œuvre des mesures de maîtrise dans leurs troupeaux en cas d'infection. Enfin, face au risque zoonotique et à la difficulté à court terme de diminuer fortement la prévalence de l'infection dans un troupeau, ils mettent en évidence les besoins de connaissances restant encore à produire pour définir les stratégies les plus adaptées pour prévenir l'infection dans des troupeaux encore indemnes.

Annexes

Annexe 1 : 'Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: a critical review'

Veterinary Microbiology 149 (2011) 1–16



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Review

Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review

Raphaël Guatteo^{a,b,c,*}, Henri Seegers^{a,b,c}, Anne-Frieda Taurel^{a,b,c},
Alain Joly^{a,b,c}, François Beaudeau^{a,b,c}

^a INRA, UMR 1300 «Bio-Agression, Epidémiologie et Analyse de Risque», Nantes F-44307, France

^b ONIRIS, Nantes F-44307, France

^c Université Nantes Angers Le Mans, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2010

Received in revised form 26 August 2010

Accepted 8 October 2010

Keywords:

Ruminants

Coxiella burnetii

Q fever

Prevalence

Review

ABSTRACT

Reliable detection of *Coxiella burnetii* is a critical point for the control of the spread of this zoonotic disease (Q fever), ruminants being considered as the main source for human infection as confirmed by the recent human outbreak in the Netherlands since 2007. Considering both public and animal health, providing consolidated prevalence data could be relevant within the decision process of public policy makers or producers organizations. The objective of this study was to conduct a critical review of the literature focused on the prevalence of *C. burnetii* infection at animal, herd and within-herd levels in cattle, goat and sheep. A qualitative assessment of the 69 selected publications, based on the analysis of the sampling frame and testing procedures, was also performed. While the number of publications increased recently, major methodological issues were still evidenced. These critical issues were related to (i) the absence of description of the sampling strategy and (ii) the lack of sensitivity of the testing procedure. The lack of well designed studies makes not possible to estimate accurately the current prevalence of the infection. Nevertheless, the literature review reported the detection of *C. burnetii* infection in the all 5 continents with a wide range whatever the species. The apparent prevalence was slightly higher in cattle (20.0% and 37.7% of mean apparent prevalence at animal and herd level respectively) than in small ruminants (around 15.0% and 25% respectively for animal and herd level in sheep and goat). The present conclusions and the current situation support the persistent need of conducting well designed studies, aiming at estimating the true prevalence of *C. burnetii* infection in the three main domestic ruminant species.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Materials and methods	2
2.1. Selection of papers dealing with prevalence data in peer-reviewed journals	2
2.2. Data processing	2
2.3. Quality assessment	3
3. Results	4
3.1. Result of the literature search	4

* Corresponding author at: ONIRIS & INRA, UMR 1300 Bio-Agression, Epidémiologie et Analyse de Risque, BP 40706, 44307 Nantes Cedex 03, France.
Tel.: +33 240 682 800; fax: +33 240 687 768.

E-mail address: raphael.guatteo@oniris-nantes.fr (R. Guatteo).

3.2.	Apparent prevalence of Q fever in cattle at animal, herd and within-herd levels	4
3.3.	Apparent prevalence of Q fever in sheep at animal, herd and within-herd levels	6
3.4.	Apparent prevalence of Q fever in goats at animal, herd and within-herd levels	6
4.	Discussion	13
5.	Conclusion	14
	References	14

1. Introduction

Q fever is a zoonotic disease caused by an obligatorily intracellular bacterium, *Coxiella burnetii* (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). This disease, described for the first time among abattoir workers in Australia seems now recognised as being endemic worldwide (Maurin and Raoult, 1999). Both public health and animal health issues are closely related to Q fever.

In humans, Q fever can lead to an acute disease (self-limited febrile illness, pneumonia, or hepatitis) or to a chronic disease, mainly endocarditis in patients immunocompromised or suffering from valvulopathy, or abortions and stillbirth in pregnant women (Angelakis and Raoult, 2010). Humans become infected mainly by inhalation of contaminated aerosols or dusts containing *C. burnetii* shed by infected animals (Tissot-Dupont et al., 1999, 2004). Oral transmission of the bacteria (via contaminated dairy products), although considered as negligible is also reported in the literature (Benson et al., 1963; Fishbein and Raoult, 1992), as well as the possibility of vertical and sexual transmission (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanska, 1997; Milazzo et al., 2001). In the Netherlands, since 2007, Q fever has become a public health problem with 2357 human cases notified in the year 2009, human cases still being notified in 2010. Epidemiological research conducted reports that abortion waves on dairy goat flocks were likely to be the source of human infection, affecting primarily people living near to these dairy goat flocks (van der Hoek et al., 2010).

In livestock, considered as the main source of human contamination, *C. burnetii* infection leads mainly to reproductive disorders like abortions, stillbirth, weak calf delivery, metritis and infertility, with associated economic impact for the herd (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). Therefore, Q fever is also an animal health issue. *C. burnetii* is shed mainly via birth products (birth fluids, placenta), but may also be shed by ruminants via vaginal mucus, milk, faeces (Berri et al., 2002; Guatteo et al. 2007a), urine (Heinzen et al., 1999) and semen (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanska, 1997).

Put together, these public and animal health issues make Q fever a disease of interest for public policy makers and food industries (especially dairy production). The knowledge of the true prevalence of the infection can lead to a better risk assessment, which could impact on to the decision to implement or not a control program. This information could also help policy makers and veterinarians to determine (i) at which level (i.e. herd, local, regional level) this control program has to be implemented and (ii) the nature of the control actions (i.e. vaccination, trade restriction, etc.).

The recent increase of interest for *C. burnetii* infection concomitant to the fast and drastic improvement of

diagnosis techniques (ELISA and PCR) (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005) lead (i) to an increase of scientific publication related to Q fever, and (ii) to a better understanding of the epidemiology of Q fever in ruminants (Berri et al., 2002; Arricau Bouvery et al., 2003; Guatteo et al., 2007a; Rodolakis et al., 2007). Apart from specific Q fever prevalence studies, other studies provide information from which prevalence value can be derived. To assess the reliability of prevalence value obtained in a survey, information dealing with the sampling procedure frame (e.g. determination of the target population, determination of the epidemiological unit of interest, representativeness of the study population, process of sampling) and the testing process (e.g. test used, sensitivities and specificities of the tests, type of biological sample) are required.

Then, the objective of this study was to conduct a literature review (including a qualitative assessment of the methodology used in the selected publications) on the apparent prevalence of *C. burnetii* infection at animal, herd and within-herd levels for the three main domestic ruminant species: cattle, sheep and goats.

2. Materials and methods

2.1. Selection of papers dealing with prevalence data in peer-reviewed journals

In a first step, we defined the target condition for “*C. burnetii* infection”. Due to the fact that the shedding of *C. burnetii* can occur in both seronegative and seropositive ruminants (Arricau Bouvery et al., 2003; Berri et al., 2002; Guatteo et al., 2007a), the knowledge of both antibody carriers and shedder apparent prevalence were considered relevant to describe in terms of both animal and public health. At this step, we defined as infected an animal (or a herd) detected either seropositive and/or shedder (regardless the method used).

The search of prevalence studies in peer reviewed journal was carried out in April 2010 using the following databases: Medline through Pubmed (January 1960 to April 2010), CAB abstracts through Webspirs (January 1973 to April 2010). The search terms used were: [Q fever or *C. burnetii*] combined with [prevalence or incidence or occurrence or seroprevalence or shedding].

2.2. Data processing

In a first step we excluded the studies where the target livestock ruminants (i.e. cattle, sheep and goats) were not in the study population. In a second step we defined for each publication, if it provided data on prevalence at

Table 1
Description of the qualitative assessment performed for selected publications.

Scoring for elementary items	
Assessment of the sampling frame procedure	
At animal and herd levels	
Definition of target population (representativeness of the study population)	Yes: ● vs No: ○
Random sampling among study population	Yes: ● vs No: ○
Sum for assessment of the sampling frame procedure	○○ or ●○ or ○● or ●●
At within herd level	
Exhaustive sampling within herd	Yes: ● vs No: ○
Large number of tested herds	>20 herds: ● vs <20 herds: ○
Sum for assessment of the sampling frame procedure	○○ or ●○ or ○● or ●●
Assessment of the test used (including relevance of the sample)	
Seroprevalence studies	
Sensitivity of the serological method	ELISA, IIF: ● vs Agglutination, FCT: ○
Cut-off value of the serological test	Cut-off reported: ● vs Cut-off not reported: ○
Sum for assessment of the test used	○○ or ●○ or ○● or ●●
Shedding studies	
Sensitivity of the method	Real time PCR, Nested PCR: ● vs PCR: ○
Probability to detect <i>Coxiella</i> shedding	Concomitant sampling of milk, faeces and vaginal mucus: ● vs only one sample: ○
Sum for assessment of the test used	○○ or ●○ or ○● or ●●
Final qualitative assessment = sum for assessment of sampling frame procedure & sum for assessment of the test used	e.g. ○○○○, ●○○○, ●●○○, ●●●○

animal, herd or within-herd level. In a third step, among selected publications, we excluded those which included vaccinated herds/flocks, due to the lack of DIVA tests allowing the distinction between infected and vaccinated animals. However, if prior to the implementation of the vaccination, the status of either the animal or the herd was determined, as frequently performed within vaccination efficacy studies for example, the publication was retained.

Then, we gathered the data contained in the selected publications in a formal database including the following items: reference (first author and year of publication), country (or area in the country), study period, ruminant species, test(s) used for infection status determination, cut-off value of the test(s) used and finally the type of sample for analysis. Lastly, depending on the level of analysis (animal, herd or within-herd), we extracted from the publications:

- for animal level analysis: the inclusion criteria to select the sampled animals, the number of sampled animals and the number of positive tested animals;
- for herd level analysis, the inclusion criteria to select the sampled herds, the number of sampled herds and the number of tested positive herds. A herd was considered as positive in case of positive test (ELISA or PCR) applied on bulk tank milk, or when containing at least one seropositive/shedder animal;
- for within-herd prevalence, the inclusion criteria to select the sampled animals within each herd, the number of tested positive animals. When several herds were included in the study, an overall mean was calculated but the minimum and maximum were also reported in the database. When one herd was subject to a longitudinal follow-up, the mean overt time was reported.

Regardless the level of analysis, in case of doubtful result, the [animal–herd] was considered as not infected. When two different tests were used within the same study

on the same study sample, the results obtained with the two tests were reported. Lastly, when two different populations were tested within a same publication, the results concerning these two populations were reported separately.

2.3. Quality assessment

The objective of our study being to describe as much widely as possible the prevalence data collected in the literature, we decided to attribute to each publication a “qualitative quality assessment” rather than excluding the study which have lead to lose too much information. The qualitative assessment method used in our review is described in Table 1.

Therefore, we assessed for each publication the critical issues dealing with:

- the sampling frame used to obtain the study sample to have an overall estimate of the representativeness of the apparent prevalence, and especially the definition of the target population and the implementation of a random sampling;
- the test used to determine the infection status which could lead to a putative under-estimation of the prevalence due to the lack of sensitivity of some diagnosis tests. Indeed, ELISA and Indirect Immunofluorescence (IIF) are recognized to be more sensitive than the Fixation Complement Test (FCT) or the agglutination (Maurin and Raoult, 1999).

However, the sensitivity and specificity of the test being not known, we reported only apparent prevalence.

Then, for each ruminants species (cattle, sheep and goats), at each level of interest (animal, herd and within-herd), besides the apparent prevalence value, the score of qualitative assessment was assigned for each selected paper and was included in the table of results.

3. Results

3.1. Result of the literature search

Finally, 69 publications were selected from the literature search. Among these 69 publications dealing with apparent prevalence of *C. burnetii* infection:

- 51 were publications on cattle: 31 were dealing with prevalence at animal level, 25 at herd level and 5 at within-herd level;
- 31 were publications on sheep: 23 were dealing with prevalence at animal level, 11 at herd level and 5 at within-herd level;
- 25 were publications on goats: 20 were dealing with prevalence at animal level, 6 at herd level and 1 at within-herd level.

Fig. 1 displays the number of selected publications according to the year of publication for the three considered ruminant species. While very few studies were available before 1990 and concerned quite exclusively cattle in the USA, we observed a constant rate of one or two publications per year during the 1990s equally distributed between the three species and among the 5 continents. However, since 2002, an increase of the publications was noticed, especially in Europe, mainly focused on small ruminants and especially on goats rather than on cattle.

3.2. Apparent prevalence of *Q* fever in cattle at animal, herd and within-herd levels

The apparent prevalence of *C. burnetii* infection in cattle reported in the literature at animal, herd and within-herd

levels are displayed respectively in Tables 2A–2C. Regardless the considered level, the prevalence data collected among all the different studies focused on cattle varied a lot:

- From 0% to 100% for animal level (first quartile: 6.6%; median: 19.4%; third quartile: 39.3%; $n = 36$).
- From 4.4% to 100% for herd level (first quartile: 19.3%; median: 37.7%; third quartile: 69.7%; $n = 27$).
- From 0% to 48.7 for within-herd level (first quartile: 21.7%; median: 26.3%; third quartile: 38.2%; $n = 7$).

From this review, we can conclude that infected animals are detected in all the 5 continents (Africa, America, Asia, Europe, Oceania), New Zealand being the only country with a reported apparent prevalence of zero. The qualitative assessment of the methodology of the selected publications revealed that only 5 studies among the 51 selected had the maximum score for both sampling frame and testing procedure assessments which could lead to consider the prevalence data as reliable as possible (Czaplicki et al., 2009; Khalili and Sakhaee, 2009; Scolamacchia et al., 2010; McCaughey et al., 2010; Ruiz-Fons et al., 2010). Regarding the sampling frame procedure, most of the publication failed to describe their target population and the study sample was scarcely randomly taken. As an example, we can notice that at animal level, at least 6 studies among the 31 were designed primarily to investigate the role of *C. burnetii* in reproductive disorders, leading to an over-representation of cattle with reproductive problems. As a consequence, the representativeness of the study population remained unknown. Contrarily, concerning the assessment of the testing procedure, the

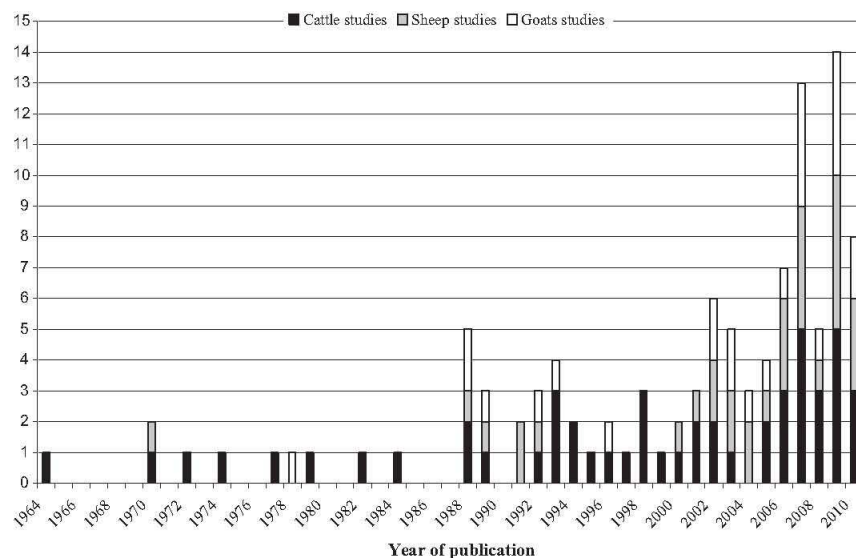


Fig. 1. Distribution of the year of publication of selected papers by ruminant species.

Table 2A
Animal level prevalences of *Coxiella burnetii* infection in cattle.

Country (area)	Reference	Study period	Animal sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested animals	Prevalence (%)	Qualitative assessment
<i>Africa</i>									
Chad	Schelling et al. (2003)	1999–2000	10 ruminants sampled by nomadic camp, 15 nomadic camp visited	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	195	4.0	●●●●
<i>Nigeria</i>									
Nigeria	Adesiyun et al. (1984)	1983–1984	–	Agglutination	–	Serum	305	59.8	●●●●
Sudan	Reithaler et al. (1988)	1983	–	Agglutination	> 1/4	Serum	52	40.4	●●●●
Zimbabwe	Kelly et al. (1993)	–	–	IF phase II	> 1/40	Serum	180	39.0	●●●●
Zimbabwe	Rhode et al. (1993)	–	–	IF phase II	> 1/40	Serum	274	41.0	●●●●
<i>America</i>									
Canada	Lang (1989)	1982–1983	–	IF phase I	> 1/8	Serum	214	24.2	●●●●
Canada	Lang (1989)	1982–1983	–	IF phase II	> 1/8	Serum	214	23.8	●●●●
Canada	Hatchette et al. (2002)	2000–2001	–	IF	> 1/8	Serum	75	33.0	●●●●
Colombia	Lofbacher de Ruiz (1977)	–	–	FCT	> 1/20	Serum	357	25.0	●●●●
Mexico	Salinas-Melendez et al. (2002)	–	–	ELISA Nine Mile	–	Serum	450	28.0	●●●●
Trinidad	Adesiyun and Gazabon (1996)	1992–1995	At slaughterhouse	Agglutination	–	Serum	255	4.3	●●●●
USA (California)	Biberstein et al. (1974)	1972–1973	–	Agglutination	> 1/4	Serum	1052	82.0	●●●●
<i>Asia</i>									
India	Vaidya et al. (2010)	–	Reproductive disorders	IF phi and phi	–	Serum	88	14.7	●●●●
Iran	Khalili and Sakhaee (2009)	–	–	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	93	10.8	●●●●
Japan	Htwe et al. (1992)	1982–1991	Sera from brucellosis monitoring program	IF phase I	> 1/16	Serum	562	40.2	●●●●
Japan	Htwe et al. (1992)	1982–1991	Sera from brucellosis monitoring program	IF phase II	> 1/17	Serum	562	46.6	●●●●
Japan	To et al. (1998)	1995	Reproductive disorders	IF Ag phase I	> 1/32	Serum	207	58.9	●●●●
Japan	To et al. (1998)	1995	Reproductive disorders	IF Ag phase II	> 1/32	Serum	207	60.4	●●●●
Turkey	Cetinakaya et al. (2000)	1998	–	IF	–	Serum	415	6.0	●●●●
<i>Europe</i>									
Albania	Cekani et al. (2008)	1995–1999	–	ELISA Nine Mile	–	Serum	571	7.9	●●●●
Cyprus	Psaroulaki et al. (2006)	–	–	IF phase II	> 1/8	Serum	214	23.8	●●●●
Czech Republic	Literak and Kcoupa (1998)	1991–1992	–	FCT	> 1/8	Serum	1397	11.7	●●●●
Ireland (Northern)	McCaughy et al. (2010)	–	Stratified systematic random sample of herds	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	5182	6.2	●●●●
Italy	Martini et al. (1994)	–	–	FCT	> 1/8	Serum	711	4.4	●●●●
Italy	Capuano et al. (2001)	1998	Randomly sampling	IF	> 1/8	Serum	1188	14.4	●●●●
Italy	Parisi et al. (2006)	2001–2005	Previous abortion	PCR	–	Aborted calf	138	11.6	●●●●
Italy	Cabassi et al. (2005)	–	Random sampling in healthy cows	ELISA Nine Mile	–	Serum	600	22.0	●●●●
Italy	Cabassi et al. (2005)	–	Cows experiencing an abortion	ELISA Nine Mile	–	Serum	650	44.9	●●●●
Scotland	Moffat et al. (1970)	1968–1996	–	FCT	> 1/8 or 1/16	Serum	4880	1.0	●●●●
Spain	Ruiz-Fons et al. (2008)	2004–2005	–	IF phi I et II	> 1/16	Serum	79	39.0	●●●●
Spain (Northern)	Ruiz-Fons et al. (2010)	2007–2008	Random Sampling	ELISA (Cb01 strain)	OD > 0.4	Serum	625	6.7	●●●●
Switzerland	Hässig and Uttsen (1998)	1986–1996	Dairy cows experiencing an abortion within the last 3 months	FCT	> 1/10	Serum	287	16.7	●●●●

Table 2A (Continued)

Country (area)	Reference	Study period	Animal sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested animals	Prevalence (%)	Qualitative assessment
Switzerland	Hässig and Lubsen (1998)	1986–1996	Dairy cows with no historic of abortion during the previous year	FCT	≥1/10	Serum	1318	16.8	○○○
Oceania									
Australia (Victoria)	Hore and Kowesdy (1972)	1970	–	FCT	≥1/10	Serum	1576	0.5	○○○
Australia (Western)	Banazis et al. (2009)	–	–	ELISA	OD > 0.4	Serum	329	0.6	○○○
New Zealand	Hilbink et al. (1993)	1990–1992	Cattle with abortions	FCT	≥1/4	Serum	2181	0.0	○○○

major default of seroprevalence studies was the use of the fixation complement test (or agglutination) instead of a more sensitive one as ELISA or IIF, these three methods being equally distributed among selected publications. However, such studies using the fixation complement test were frequently performed when ELISA methods were not available yet. For shedding studies (based mainly on real-time PCR), sometimes performed at herd or within-herd levels, the main observed limit was the sampling of only one type of biological sample (i.e. milk) instead of the concomitant sampling of the different main shedding routes (i.e. milk, vaginal mucus and faeces) leading to a putative underestimation of shedder animals/herds prevalence. However, the literature review reported apparent prevalence values comprised between [10.8% and 84%] and [0% and 45%] respectively for shedder herds prevalence and within-herd shedder animals prevalence.

3.3. Apparent prevalence of *Q* fever in sheep at animal, herd and within-herd levels

The apparent prevalence of *C. burnetii* infection in sheep reported in the literature at animal, herd and within-herd levels are displayed respectively in Tables 3A–3C. Regardless the considered level, the prevalence data collected among the different studies focused on sheep varied a lot:

- From 0% to 62.5% for animal level (first quartile: 4.0%; median: 10.5%; third quartile: 19.7%; $n = 26$).
- From 0% to 89% for herd level (first quartile: 14.0%; median: 25.0%; third quartile: 52.0%; $n = 12$).
- From 6.2% to 94% for within-herd level (first quartile: 18.3%; median: 30.4%; third quartile: 46.1%; $n = 6$).

As for cattle, *C. burnetii* infection was detected in the 5 continents. At animal level, 6 out of the 22 selected publications came from 2 countries (Canada and Turkey). The same limits as for cattle were observed for the qualitative assessments. The sampling strategy was either not described or not elaborated to define the prevalence but rather to investigate the putative implication of *C. burnetii* in reproductive disorders. Regarding the testing procedure, the fixation complement test was scarcely used in comparison to cattle. Sheep studies were carried out more recently when ELISA methods were already available. Additionally, few data were available about the prevalence of shedders in sheep.

3.4. Apparent prevalence of *Q* fever in goats at animal, herd and within-herd levels

The apparent prevalence of *C. burnetii* infection in goats reported in the literature at animal, herd and within-herd levels are displayed respectively in Tables 4A–4C. Regardless the considered level, the prevalence data collected among the different studies focused on goat varied a lot:

- From 0% to 75% for animal level (first quartile: 26.7%; median: 16.8%; third quartile: 48.2%; $n = 25$).
- From 0% to 100% for herd level (first quartile: 12.5%; median: 26.0%; third quartile: 45.0%; $n = 7$), only 2 studies being available for within-herd level (23.0% and 30.8%).

Table 2B
Herd level prevalences of *Coxiella burnetii* infection in cattle.

Country	Reference	Study period	Herd sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested herds	Prevalence (%)	Qualitative assessment
<i>Africa</i>									
Cameroon	Scoiannachia et al. (2010)	2000	Random sampling	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	146	68.1	◆◆◆
<i>America</i>									
Canada	Lang (1988a)	1984	–	ELISA	–	Serum	200	67.0	◆◆◆
Mexico	Rice and Knoke (1979)	–	–	FCT	–	Serum	33	82.0	◆◆◆◆
USA (Alabama)	Miller (1964)	–	–	Bulk tank milk	–	Bulk tank milk	1511	38.6	◆◆◆◆
USA (California)	Biberstein et al. (1974)	1972–1973	–	Agglutination	> 1/4	Serum	20	100.0	◆◆◆◆
USA (Illinois)	Martin et al. (1982)	1963–1967	–	Agglutination	–	Bulk tank milk	2277	37.7	◆◆◆◆
USA	McQuiston et al. (2005)	–	–	IIF phase I	> 1/16	Bulk tank milk	24	92.0	◆◆◆◆
USA	McQuiston et al. (2005)	–	–	IIF phase II	> 1/256	Bulk tank milk	24	38.0	◆◆◆◆
USA	Kim et al. (2005)	2001–2003	–	PCR	–	Bulk tank milk	316	94.3	◆◆◆◆
<i>Asia</i>									
Iran	Khalili and Sakhaee (2008)	–	Random sampling	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	12	16.7	◆◆◆◆
Iran	Rahimi et al. (2009)	–	Random sampling	Nested PCR	–	Bulk tank milk	28	17.9	◆◆◆◆
Turkey	Cetinakaya et al. (2000)	1988	–	IIF	–	Serum	48	35.4	◆◆◆◆
<i>Europe</i>									
Belgium (Wallony)	Czaplicki et al. (2009)	2008	Random sampling	ELISA (Cb01 strain)	S/P ratio > C3	Bulk tank milk	1137	71.2	◆◆◆◆
Belgium (Wallony)	Czaplicki et al. (2009)	2008	Random sampling	PCR	Ct value < 40	Bulk tank milk	150	30.0	◆◆◆◆
Czech republic	Linerak and Kroupa (1998)	1991–1992	–	FCT	> 1/8	Serum	14	100.0	◆◆◆◆
Denmark	Agger et al. (2010)	2009	Random sampling	ELISA Nine Mile	–	Bulk tank milk	100	59.0	◆◆◆◆
France (Britanny)	Guatteo et al. (2006)	2005–2006	Historic of Q fever	Real time PCR	Ct value < 40	Bulk tank milk	37	84.0	◆◆◆◆
Germany	Wittenbrink et al. (1994)	–	–	FCT	–	Serum	500	7.6	◆◆◆◆
Ireland (Northern)	McCaughy et al. (2010)	–	Stratified systematic random sample of herds	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	273	48.4	◆◆◆◆
<i>Italia</i>									
Italia	Martini et al. (1994)	–	–	FCT	> 1/8	Serum	711	4.4	◆◆◆
Italia	Parisi et al. (2006)	2001–2005	Herds with abortions	PCR	–	Aborted calf	102	10.8	◆◆◆◆
Scotland	Moffat et al. 1970	–	–	FCT	> 1/8 or 1/15	Serum	303	10.0	◆◆◆◆
Spain (Northern)	Ruiz-Fons et al. (2010)	2007–2008	Random sampling	ELISA (Cb01 strain)	–	Serum	OD > 0.4	29.0	◆◆◆◆
Switzerland	Fretz et al. (2007)	2005–2006	Dairy farms from 2 Cheese dairies	Nested PCR	–	Bulk tank milk	27	29.6	◆◆◆◆
UK	Paiba et al. (1999)	–	–	ELISA Nine Mile	> 70EU/ml	Bulk tank milk	373	21.2	◆◆◆
<i>Oceania</i>									
Australia (Victoria)	Hore and Kowesdy (1972)	1970	–	FCT	> 1/10	Serum	49	12.2	◆◆◆◆
Australia	Durham and Paine (1997)	1991–1992	–	FCT	–	Serum	10	10.0	◆◆◆◆

Table 2C
Within-herd level prevalences of *Coxiella burnetii* infection in infected cattle herds.

Country	Reference	Study period	Within-herd sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested herds	Prevalence	Qualitative assessment
Africa Cameroon	Scolamacchia et al. (2010)	2000	5 animals > 24 months & 5 (3–24 months) per herd	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	146	39.3%	●●●
Europe Czech republic	Literák (1995)	1987–1989	–	PCT	–	Serum	1 herd followed-up 2 years	4.2%	○○○○
France (Britanny)	Guatteo et al. (2007a)	2005–2006	Exhaustive sampling of lactating cows	Real time PCR	Ct value < 40	Concomitant sampling of Milk, vaginal mucus and fecal sample	5	26.3% [8.8–35.5]	●●●●
France (Britanny)	Guatteo et al. (2007b)	2005–2006	Exhaustive sampling of lactating cows	Real time PCR	Ct value < 40	Concomitant sampling of Milk, vaginal mucus and fecal sample	37	18.5% [0–45]	●●●●
France	Redolakis et al. (2007)	2006	30 cows within each herd	PCR	–	Milk vaginal mucus and faeces	3	38.9%	●●●●
France (Britanny)	Guatteo et al. (2008)	2007	Exhaustive sampling of all animals > 12 months	Real time PCR	Ct value < 40	Milk (lactating cows), vaginal mucus and fecal sample	6	24.8% [11.1–44.4]	●●●●
France (Britanny)	Guatteo et al. (2008)	2007	Exhaustive sampling of all animals > 12 months	ELISA (Cb01 strain)	OD > 0.4	Serum	6	37.5% [26.4–48.7]	●●●●

Table 3A
Animal prevalences of *Coxiella burnetii* infection in sheep.

Country (area)	Reference	Study period	Animal sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested animals	Prevalence (%)	Qualitative assessment
<i>Africa</i>									
Chad	Schelling et al. (2003)	1999–2000	10 ruminants sampled by nomadic camp, 15 nomadic camp visited	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	142	11.0	●●●
<i>Egypt</i>	Mazwad and Hafez (2007)	2006	–	IIF	–	Serum	89	22.5	●●●
<i>Sudan</i>	Reinthal et al. (1988)	1983	–	Agglutination	>1/4	Serum	32	62.5	●●●
<i>America</i>									
Canada	Lang (1988)	1982–1983	–	IIF phase I	>1/8	Serum	329	0.0	●●●
Canada	Lang (1988)	1982–1983	–	IIF phase II	>1/8	Serum	329	6.7	●●●
Canada	Hatchette et al. (2002)	1999–2000	–	IIF	>1/8	Serum	293	3.1	●●●
Canada	Dolcè et al. (2003)	1998	–	FCT	>1/8	Serum	334	41.0	●●●
Mexico	Salinas-Meléndez et al. (2002)	–	–	ELISA Nine Mile	–	Serum	90	40.0	●●●
Trinidad	Adesiyun and Carabon (1996)	1992–1995	At the slaughter house	Agglutination	–	Serum	16	0.0	●●●
<i>Asia</i>									
India	Vaidya et al. (2010)	–	Flocks with reproductive disorders	IIF ph. I et II	–	Serum	43	11.6	●●●
India	Vaidya et al. (2010)	–	Flocks with reproductive disorders	ELISA Nine Mile	–	Serum	43	9.3	●●●
Japan	Yoshie et al. (1991)	–	–	IIF ph. I et II	–	Serum	329	29.2	●●●
Turkey	Cemilewa et al. (2000)	1998	Flocks with repeated abortions	IIF	–	Serum	411	10.5	●●●
Turkey	Ongör et al. (2004)	–	Flock with no historic of repeated abortions	PCR	–	Milk	214	6.5	●●●
Turkey	Ongör et al. (2004)	–	Flock with no historic of repeated abortions	PCR	–	Milk	186	0.0	●●●
Turkey	Kennerman et al. (2010)	2001–2004	–	ELISA Nine Mile	OD > 0.2	Serum	743	20.0	●●●
<i>Europe</i>									
Albania	Cekani et al. (2008)	1997	–	ELISA Nine Mile	–	Serum	293	3.1	●●●
Cyprus	Psaroulaki et al. (2006)	–	–	IIF	–	Serum	–	18.9	●●●
Greece	Pape et al. (2009)	–	Random sampling in the north of Greece	IIF	>1/32	Serum	615	10.4	●●●
Ireland (Northern)	McCaughy et al. (2010)	–	Samples collected during routine surveillance activities	IIF	>1/80	Serum	1022	12.3	●●●
Italy	Masala et al. (2004)	1999–2002	Flocks with abortions	ELISA Nine Mile	OD > 0.5	Serum	7194	9.0	●●●
Scotland	Moffat et al. (1970)	–	1 flock with outbreak of human Q fever	FCT	>1/16	Serum	–	30.0	●●●
Spain	García-Pérez et al. (2009)	2005–2006	24 Herds in a control program for border diseases	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	1011	8.9	●●●
Spain (Northern)	Ruiz-fons et al. (2010)	2007–2008	Random sampling	ELISA (CFO1 strain)	OD > 0.4	Serum	1379	11.8	●●●
<i>Oceania</i>									
Australia (Western)	Banazs et al. (2009)	–	–	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	50	0.0	●●●
New Zealand	Hilbink et al. (1993)	1990–1992	4 flocks Based on serological survey on dogs	ELISA Nine Mile	0.2	Serum	30	0.0	●●●

Table 3B
Herd level prevalences of *Coxiella burnetii* infection in sheep.

Country	Reference	Study period	Herd sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested herds	Prevalence (%)	Qualitative assessment
America									
Canada	Lang et al. (1991)	1988	Random sampling	ELISA Nine Mile	–	Serum	103	21.0	●●●●
Canada	Dolice et al. (2003)	1998	–	FCT	> 1/8	Serum	46	89.0	●●●●
Asia									
Iran	Rahimi et al. (2009)	–	Random sampling	Nested PCR	–	Bulk tank milk	31	0.0	●●●●
Japan	Htwe et al. (1992)	1982–1991	–	IF phase I	> 1/16	Serum	256	17.6	●●●●
Japan	Htwe et al. (1992)	1982–1991	–	IF phase II	> 1/16	Serum	256	28.1	●●●●
Turkey	Cetinokaya et al. (2000)	1998	–	IF	–	Serum	47	44.7	●●●●
Turkey	Kennerman et al. (2010)	2001–2004	–	ELISA Nine Mile	OD > 0.2	Serum	42	83.0	●●●●
Europe									
Italy	Masala et al. (2004)	1995–2002	Flocks with abortions	ELISA Nine Mile	OD > 0.5	Serum	675	38.0	●●●●
Spain	Cposito et al. (2006)	1995–2003	Flocks with abortions	FCT	> 1/32	Serum	148	3.0	●●●●
Spain	García-Pérez et al. (2009)	2005	Flocks included in a border disease control plan	PCR	–	Bulk tank milk	154	22.0	●●●●
Spain (Northern)	Ruiz-Fons et al. (2010)	2007–2008	Random sampling	ELISA (C501 strain)	OD > 0.4	Serum	42	74.0	●●●●
Switzerland	Pretz et al. (2007)	2005–2006	20 km around a sheep cheese dairy	Nested PCR	–	Bulk tank milk	13	0.0	●●●●

Table 3C
Within-herd level prevalences of *Coxiella burnetii* infection in infected sheep flocks.

Country	Reference	Study period	Within-herd sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested herds	Prevalence	Qualitative assessment
America									
Canada	Lang et al. (1991)	1988	–	ELISA Nine Mile	–	Serum	7 of at least 40 ewes	12.5% [6.2–50]	●●●●
Canada	Webster et al. (2009)	2008	Exhaustive sampling in one herd related to human outbreak	IF phase I and II	> 1/8	Serum	1	50%	●●●●
USA (California)	DeJonge and Cons (2006)	1992–1999	–	FCT	> 1/20	Serum	1	15.6%	●●●●
Europe									
France	Berti et al. (2001)	–	–	ELISA Nine Mile	OD > 0.5	Serum	1	26.50%	●●●●
France	Berti et al. (2005)	1998	–	ELISA Nine Mile	OD > 0.5	Serum	9 flocks	34.2% [18–58]	●●●●
France	Rodolakis et al. (2007)	2005	30 ewes within each flock	PCR	–	Milk vaginal mucus and faeces	3	94%	●●●●

Table 4A
Animal prevalences of *Coxiella burnetii* infection in goat.

Country (area)	Reference	Study period	Animal sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested animals	Prevalence (%)	Qualitative assessment
<i>Africa</i>									
Chad	Schelling et al. (2003)	1999–2000	10 ruminants sampled by nomadic camp, 15 nomadic camp visited	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	134	13.0	●●●
<i>Egypt</i>	Mazyad and Hafez (2007)	2005	–	IF	–	Serum	71	16.8	●●●
<i>Sudan</i>	Reinthal et al. (1988)	1983	–	Agglutination	>1/4	Serum	42	53.0	●●●
<i>Zimbabwe</i>	Kelly et al. (1993)	–	–	IF phase II	>1/40	Serum	180	10.0	●●●
<i>America</i>									
Canada	Lang (1989)	1982–1983	–	IF phase I	>1/8	Serum	29	3.5	●●●
Canada	Lang (1989)	1982–1983	–	IF phase II	>1/8	Serum	29	7.0	●●●
Canada	Hatchette et al. (2002)	2000	From a dairy cooperative Q fever historic	IF	>1/8	Serum	64	19.0	●●●
Mexico	Salinas-Meléndez et al. (2002)	–	–	ELISA Nine Mile	–	Serum	60	35.0	●●●
Trinidad	Adeygun and Cazaben (1996)	1992–1995	–	Agglutination	–	Serum	7	0.0	●●●
USA (California)	Ruppner et al. (1978)	1974–1977	–	Agglutination	–	Serum	1054	24.0	●●●
<i>Asia</i>									
India	Vaidya et al. (2010)	–	Flocks with reproductive disorders	IF ph I and II	–	Serum	53	7.5	●●●
India	Vaidya et al. (2010)	–	Flocks with reproductive disorders	ELISA Nine Mile	–	Serum	53	5.7	●●●
Iran	Khalili and Sakhaee (2005)	–	–	ELISA Nine Mile	OD > 0.4	Serum	75	65.8	●●●
Japan	Htve et al. (1992)	1982–1991	–	IF phase I	>1/16	Serum	85	11.8	●●●
Japan	Htve et al. (1992)	1982–1991	–	IF phase II	>1/16	Serum	85	23.5	●●●
Oman	Sringgeour et al. (2003)	2001	–	IF phase I et II	>1/25	Serum	54	56.0	●●●
<i>Europe</i>									
Albania	Cekani et al. (2008)	2000	–	ELISA Nine Mile	–	Serum	64	18.7	●●●
Cyprus	Psaroulaki et al. (2006)	–	–	IF	–	Serum	–	48.2	●●●
France	Rousset et al. (2009)	–	Shedder goats	IF	>1/80	Serum	72	73.0	●●●
France	Rousset et al. (2009)	–	Shedder goats	ELISA Nine Mile	>50	Serum	72	75.0	●●●
France	Rousset et al. (2009)	–	Shedder goats	FCT	>1/10	Serum	72	61.0	●●●
Greece	Pape et al. (2009)	–	Goats randomly sampled in the north of Greece	IF	>1/32	Serum	61	6.5	●●●
<i>Ireland (Northern)</i>	McCaughy et al. (2010)	–	Samples collected during routine surveillance activities	IF	>1/80	Serum	54	9.3	●●●
<i>Italy</i>	Masala et al. (2004)	1999–2002	Flocks with abortions	ELISA Nine Mile	OD > 0.5	Serum	2155	13.0	●●●
<i>Spain (Northern)</i>	Ruiz-Pons et al. (2010)	2007–2008	Random sampling	ELISA (CB01 strain)	OD > 0.4	Serum	115	8.7	●●●

Table 4B
Herd level prevalences of *Coxiella burnetii* infection in goat.

Country	Reference	Study period	Herd sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested herds	Prevalence (%)	Qualitative assessment
America	Lang (1988b)	1984	Random sampling	ELISA	OD > 0.2	Serum	20	20.0	●●●●
	Ruppenmer et al. (1978)	1974–1977	–	Agglutination	–	Serum	234	26.0	○●●○
Asia	Khalili and Sakhaee (2009)	–	Random sampling	ELISA, Nire Mile	OD > 0.4	Serum	9	100.0	●●●●
	Rahimi et al. (2009)	–	Random sampling	Nested PCR	–	Bulk tank milk	20	5.0	●●●○
Europe	Massala et al. (2004)	1999–2002	Flocks with abortions	ELISA, Nire Mile	OD > 0.5	Serum	82	47.0	○●●●
	Ruiz-Fons et al. (2010)	2007–2008	Random sampling	ELISA (C501 strain)	OD > 0.4	Serum	11	43.0	●●●●
	Fretz et al. (2007)	2005–2006	Random sampling	Nested PCR	–	Bulk tank milk	39	0.0	●●●○

Table 4C
Within-herd prevalences of *Coxiella burnetii* infection in infected goat flocks.

Country	Reference	Study period	Within-herd sampling	Test	Cut-off value	Sample	Number of tested herds	Prevalence (%)	Qualitative assessment
Europe	Berri et al. (2005)	2002	–	PCR	–	Milk	1	23.0	○●●○
	Rodolakis et al. (2007)	2005	–	PCR	–	Milk vaginal mucus and faeces	3	30.8	○●●●

Contrarily to cattle and sheep, no study aiming to detect putative presence of *Coxiella* among goats in Oceania was available. Otherwise, *C. burnetii* infection was detected in goats in Africa, America, Asia and Europe. Fixation complement test was very less frequently used in comparison to the cattle and sheep studies. When using PCR, as for cattle and sheep, milk sample were the most frequently tested with a wide range of reported values at both herd and within-herd levels. The majority of the studies focused on animal level and very few data were available on herd and within-herd level.

4. Discussion

The aim of this review was to summarize the prevalence data of *C. burnetii* infection and to assess their reliability in the three main domestic ruminant species: cattle, goat and sheep at animal, herd and within-herd levels. Finally, 69 publications were selected. Very few studies were considered well-designed to consider as reliable the data obtained. However, this review confirmed the worldwide distribution of *C. burnetii* among domestic ruminants over the 5 continents, except in New-Zealand. However, regarding this apparent absence of *C. burnetii* infection, the study design did not allow to consider this fact as indubitable. An overall mean of all the available data reported between 15% and 30% of prevalence at animal level for cattle, sheep and goats. For each level considered, a wide range of values (0 to 100) was observed and the distribution of the year of publication of the different selected papers did not allow us to consider, for many countries, the reported data as up to date. Very few studies focused on the within-herd level while this information is crucial to optimize the implementation of control schemes, as vaccination for example (Guatteo et al., 2008). The quite high level of within-herd prevalence reported seems to be in accordance with the existence of abortion waves due to *C. burnetii* infection reported for sheep and goats (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Angelakis and Raoult, 2010).

The number of publications dealing with prevalence data on *C. burnetii* infection has increased since 2002, and especially in small ruminants, while only cattle were concerned before 2000. This could be related to the quite systematic implication of small ruminants in recent human outbreaks of Q fever (Armengaud et al., 1997; Wallensten et al., 2010). However, cattle studies remained the more numerous, goat and sheep studies being implemented especially in countries where this production is important (e.g. Cyprus, Greece).

The majority of the published studies dealt with seroprevalence rather than shedding prevalence, while this latter information is crucial to estimate the risk of transmission of the infection between ruminants, between herds and from ruminants to humans. The few studies available, especially at within-herd level reported a wide range of shedder ruminant prevalence [0–58%], established only in milk except for the studies performed in Brittany in western France which did not aim to describe such shedding prevalences (Guatteo et al., 2006, 2007a,b, 2008). However, the implication of *Coxiella* shedding in milk in the transmission of the infection is considered as

negligible (Angelakis and Raoult, 2010). This lack of data about shedding is especially obvious in small ruminants, despite their quite systematic implication in recent human's outbreak as in the Netherlands (van der Hoek et al., 2010).

Additionally, a certain amount of publications provided information that can be used to determine the apparent prevalence of infection (regardless the level of analysis), while it was not the primarily objective of the study. For example, we can quote the determination of the status of the animals within a herd prior to vaccination to assess further the efficacy of the vaccine (Guatteo et al., 2008).

The original approach retained here was to add to the classical review of the literature a qualitative assessment of the selected publication, to estimate if the data collected could be considered as relevant or plausible. Thus, when considering only studies with a qualitative assessment of at least 3 points, the overall mean prevalence decreased from 24% to 11%, 15% to 12% and 27% to 9% respectively for cattle, sheep and goat. However, the number of studies underlying these values was very low (respectively 6, 3 and 4 for cattle, sheep and goat). This is in accordance with the fact that most of the studies did not aim originally to describe prevalence but rather to confirm the existence of *C. burnetii* in an area or to assess the impact of *C. burnetii* infection in terms of reproductive disorders.

In the absence of any information regarding the informative values of the diagnostic tests used, it was not possible to calculate true prevalence on the basis of apparent prevalence, as performed for example by Nielsen for paratuberculosis in farm animals (Nielsen and Toft, 2009). This assessment was based on the estimation of the quality of both sampling frame and testing procedure, because these two areas were considered as the most important to estimate the reliability of a prevalence study.

For the testing procedure assessment, we considered as quality criteria both the test used (in terms of sensitivity) and the information dealing with cut-off value. Regarding the type of strains used in the ELISA, some authors suggest that using a strain recovered from a ruminant (here Cb01 for example) could be more suitable and sensitive for antibodies detection in ruminants than a strain recovered from a tick (Nine Mile) (Rodolakis, 2006). However, in the absence of any published data on the gain in sensitivity obtained using such antigens, we did not consider an ELISA more sensitive than another one, while this information could have provided a more accurate assessment of the reliability of the apparent prevalence. The assessment of the quality of cut-off value information could have been conducted on a quantitative basis, to estimate, for example, the implementation of a standard and recognized cut-off value (or not). However, a wide variety of tests among IIF and ELISA exists, depending on the phase used, I and/or II, the type of strain (Nine Mile vs Cb01), the "in house" vs commercial type of test. Then, the assessment based on the cut-off value for a given type of test (e.g. IIF) was not considered as relevant. Moreover, to our knowledge, there is no consensus about the type of antigens and/or the cut-off value to be used. Studies aiming (i) to investigate the sensitivity of different tests based on different type or combination of antigens and (ii) to

estimate the cut-of value maximising either the sensitivity or the specificity would be deemed of interest. To investigate the sensitivity and the specificity of these tests, owing to the absence of a recognized gold standard, Bayesian methods and software (as Openbugs®) could be used (Berkvens et al., 2006). Additionally, recent publications reported the possibility to conduct concomitantly a prevalence study and the determination of the informative value of the test(s), using latent class mixture models (Nielsen et al., 2007).

Based on the present qualitative assessment, the interpretation of apparent prevalence data need to be made with caution:

- The sampling frame procedure was considered as relevant for a prevalence study only in 13 studies out of the 69 selected.
- The informative values of the test used (i.e. sensitivity and specificity) were not provided in any studies.

Concerning the poor design of the sampling frame procedure, it can be linked to the fact that at least 50% of the studies were not build initially with the aim to describe prevalence, but rather to investigate the putative implication of *C. burnetii* in reproductive disorders (e.g. Vaidya et al., 2010; Cabassi et al., 2006) or to describe the modality of *Coxiella* shedding (e.g. Berri et al., 2002; Guatteo et al., 2007a). Recent studies performed with the clear aimed to assess the prevalence (e.g. McCaughey et al., 2010; Ruiz-Fons et al., 2010) have the maximum score for this qualitative assessment. Such designs could be used for further studies.

Concerning the testing procedure, two major issues were reported. First, we reported the frequent use of methods of “lower” sensitivity as FCT and Agglutination rather than ELISA or IIF recognized to be more sensitive (Maurin and Raoult, 1999). This could be linked to the period when the studies were performed, FCT being mainly used in studies conducted before ELISA methods were available. Thus, the qualitative assessment for FCT would have been considered as better if performed at the time of publication. The second issue was the absence of reporting of cut-off value. This lack of information reflects probably the heterogeneity of cut-off values used, especially with in house tests. For studies aiming to describe shedding prevalence, the major issue was not the choice of the test, but the type and the number of randomly tested sample. Indeed, in majority, only milk samples were tested, probably for financial reason and because of its friendly sampling, while *Coxiella* shedding occurs via several routes (Berri et al., 2002; Arricau Bouvery et al., 2003; Guatteo et al., 2006) with no concomitancy (Guatteo et al., 2007a). Then, to maximise the probability to detect shedder animals, the concomitant sampling of at least, milk, vaginal mucus and faeces should be performed.

Concerning serological methods, an additional issue could raise in the next years, with the recent availability of a phase I vaccine (Coxevac, CEVA Santé Animale) which could lead to an increase of seropositive animals, this vaccine inducing a fast serological response (Arricau Bouvery et al., 2003). Then, to be able to distinguish between infected and vaccinated animals, the develop-

ment of a DIVA method is required to not overestimate the seroprevalence using current ELISA.

Additionally, we cannot exclude that several prevalence studies were carried out but not published in peer review journals. Such data have not been included in our review. For example, frequent updated reports are available on the situation in the Netherlands where human outbreaks are noticed since 2006. As of 18 April 2010, the total number of positive farms (using PCR on bulk tank milk) was 83 out of which 81 dairy goats (22.5% of 360 total dairy goats farms in NL) and 2 dairy sheep (5%) [http://www.vwa.nl/onderwerpen/dierziekten/dossier/4833780/q-koorts_kaart-met-overzicht-van-besmette-bedrijven].

All together, our present findings highlight that very few reliable prevalence data are available, while the knowledge of prevalence, and especially true prevalence, is of primary importance for policy makers in the context of evidence-based decision scheme. The issues found in the selected publications together with the absence of any gold standard method highlight the relevance of Bayesian approach to obtain reliable prevalence data.

5. Conclusion

Finally, very few well-designed studies dealing with the prevalence of *C. burnetii* infection in domestic ruminants were available. This review confirmed that *C. burnetii* infection is worldwide distributed in the three species under study. Animal and herd level seroprevalence, regardless the species, were likely at least 15–20% in many countries, with apparent prevalence values slightly higher in cattle (20.0% and 37.7% of mean apparent prevalence at animal and herd level respectively) than in small ruminants (around 15.0% and 25% respectively for animal and herd level in sheep and goat). In some countries, the reported prevalences were lower, but the information collected in the corresponding publication did not provide enough details to consider these data as reliable. To help policy makers and farmer’s organization, as well as veterinarians, published and well-designed prevalence (of both seropositive and shedder animals) studies are needed. The main critical issues of the selected studies were (i) the absence of any definition of the target and study populations and (ii) the heterogeneity of testing procedures, making not possible the comparison between studies or within a country over time. Therefore, additionally to the improvement of the design of sampling frame procedure, a standardization/harmonization of the testing procedure (test, cut-off) is necessary. Lastly, this review highlights the need that manufacturers provide estimate of the sensitivity and the specificity of their different tests in order to derive true prevalence from apparent prevalence data.

References

- Adesiyun, A.A., Jagun, A.G., Tekdek, L.B., 1984. *Coxiella burnetii* antibodies in some Nigerian dairy cows and their suckling calves. *Int. J. Zoonoses* 11, 155–160.
- Adesiyun, A.A., Cazabon, E.P., 1996. Seroprevalences of brucellosis, Q-fever and toxoplasmosis in slaughter livestock in Trinidad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 49, 28–30.

- Agger, J.F., Christoffersen, A.B., Rattenborg, E., Nielsen, J., Agerholm, J.S., 2010. Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 21, 52–55.
- Angelakis, E., Raoult, D., 2010. Q fever. *Vet. Microbiol.* 140, 297–309.
- Armengaud, A., Kessalis, N., Desenclos, J.C., Maillot, E., Brousse, P., Brouqui, P., Tixier-Dupont, H., Raoult, D., Provencal, P., Obadia, Y., 1997. Urban outbreak of Q fever, Briançon, France, March to June 1996. *Euro Surveill.* 2, 12–13.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327–349.
- Arricau Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2003. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Vet. Res.* 34, 423–433.
- Banazis, M.J., Bestall, A.S., Reid, S.A., Fenwick, S.G., 2009. A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. *Vet. Microbiol.*, doi:10.1016/j.vetmic.2009.12.002.
- Benson, W.W., Brock, D.W., Mather, J., 1963. Serologic analysis of a penitentiary group using raw milk from a q fever infected herd. *Public Health Rep.* 78, 707–710.
- Berkvens, D., Speybroeck, N., Praet, N., Adel, A., Lesaffre, E., 2006. Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology* 17, 145–153.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P., Rodolakis, A., 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet. Rec.* 148, 502–505.
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A., 2002. Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella burnetii* abortion in a sheep flock. *Vet. Microbiol.* 85, 55–60.
- Berri, M., Crochet, D., Santiago, S., Rodolakis, A., 2005. Spread of *Coxiella burnetii* infection in a flock of sheep after an episode of Q fever. *Vet. Rec.* 157, 737–740.
- Biberstein, E.L., Behymer, D.E., Bushnell, R., Crenshaw, G., Riemann, H.P., Franti, C.E., 1974. A survey of Q fever (*Coxiella burnetii*) in California dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 35, 1577–1582.
- Cabassi, C.S., Taddei, S., Donofrio, G., Ghidini, F., Piancastelli, C., Flammini, C.F., Cavarani, S., 2006. Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *New Microbiol.* 29, 211–214.
- Capuano, F., Landolfi, M.C., Monetti, D.M., 2001. Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Vet. Rec.* 149, 669–671.
- Cekani, M., Papa, A., Kota, M., Velo, E., Berxholli, K., 2008. Report of a serological study of *Coxiella burnetii* in domestic animals in Albania. *Vet. J.* 175, 276–278.
- Cetinkaya, B., Kalender, H., Ertas, H.B., Muz, A., Arslan, N., Ongor, H., Gurçay, M., 2000. Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet. Rec.* 146, 131–136.
- Czaplicki, G., Houtain, J.Y., Mullender, C., Manteca, C., Saegerman, C., 2009. Bulk tank milk, reliable tool for diagnosing Q fever in dairy herds? *Epidemiol. Santé Anim.* 56, 117–127.
- DeForge, J.R., Cone, L.A., 2006. The serologic prevalence of Q fever (*Coxiella burnetii*) complement-fixing antibodies in the Peninsular bighorn sheep of Southern California. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 315–317.
- Dolcé, P., Bélanger, M.J., Tumanowicz, K., Gauthier, C.P., Jutras, P., Massé, R., Montpetit, C., Bernatchez, H., McColl, D., Artsob, H., 2003. *Coxiella burnetii* seroprevalence of shepherds and their flocks in the lower Saint-Lawrence River region of Quebec, Canada. *Can. J. Infect. Dis.* 14, 97–102.
- Durham, P.J., Paine, G.D., 1997. Serological survey for antibodies to infectious agents in beef cattle in northern South Australia. *Aust. Vet. J.* 75, 139–140.
- Fishbein, D.B., Raoult, D., 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 35–40.
- Fretz, R., Schaeren, W., Tanner, M., Baumgartner, A., 2007. Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 414–418.
- García-Pérez, A.L., Astobiza, I., Barandika, J.F., Atxaerandio, R., Hurtado, A., Juste, R.A., 2009. Short communication: investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *J. Dairy Sci.* 92, 1581–1584.
- Guatteo, R., Beaudou, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H., 2006. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.* 37, 827–833.
- Guatteo, R., Beaudou, F., Joly, A., Seegers, H., 2007a. Assessing the within-herd prevalence of *Coxiella burnetii* milk-shedder cows using a real-time PCR applied to bulk tank milk. *Zoonoses Public Health* 54, 191–194.
- Guatteo, R., Beaudou, F., Joly, A., Seegers, H., 2007b. *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.* 38, 849–860.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudou, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase 1 *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320–4328.
- Hässig, M., Lubsen, J., 1998. Relationship between abortions and seroprevalences to selected infectious agents in dairy cows. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 45, 435–441.
- Hatchette, T., Campbell, N., Whitney, H., Hudson, R., Marrie, T.J., 2002. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in selected populations of domestic ruminants in Newfoundland. *Can. Vet. J.* 43, 363–364.
- Heinzen, R.A., Hackstadt, T., Samuel, J.E., 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* 7, 149–154.
- Hilbink, F., Penrose, M., Kovacova, E., Kazar, J., 1993. Q fever is absent from New Zealand. *Int. J. Epidemiol.* 22, 945–949.
- Hore, D.E., Kovesdy, L., 1972. A serological survey of dairy cattle in Victoria for antibody to *Coxiella burnetii*. *Aust. Vet. J.* 48, 71.
- Htwe, K.K., Amano, K., Sugiyama, Y., Yagami, K., Minamoto, N., Hashimoto, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1992. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in domestic and companion animals in Japan. *Vet. Rec.* 131, 490.
- Kelly, P.J., Matthewman, L.A., Mason, P.R., Raoult, D., 1993. Q fever in Zimbabwe. A review of the disease and the results of a serosurvey of humans, cattle, goats and dogs. *S. Afr. Med. J.* 83, 21–25.
- Kennerman, E., Rousset, E., Gölcü, E., Dufour, P., 2010. Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (1), 37–45.
- Khalili, M., Sakhaee, E., 2009. An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80, 1031–1032.
- Kim, S.G., Kim, E.H., Lafferty, C.J., Dubovi, E., 2005. *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 619–621.
- Kruszewska, D., Tylewska-Wierzbnowska, S., 1997. Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Res. Vet. Sci.* 62, 299–300.
- Lang, G.H., 1988a. Serosurvey on the occurrence of *Coxiella burnetii* in Ontario cattle. *Can. J. Public Health* 79, 56–59.
- Lang, G.H., 1988b. Serosurvey of *Coxiella burnetii* infection in dairy goat herds in Ontario. A comparison of two methods of enzyme-linked immunosorbent assay. *Can. J. Vet. Res.* 52, 37–41.
- Lang, G.H., 1989. Q fever: an emerging public health concern in Canada. *Can. J. Vet. Res.* 53, 1–6.
- Lang, G., Waltner-Toews, D., Menzies, P., 1991. The seroprevalence of coxiellosis (Q fever) in Ontario sheep flocks. *Can. J. Vet. Res.* 55, 139–142.
- Literák, I., 1995. Occurrence of *Coxiella burnetii* antibodies in cattle, sheep and small terrestrial mammals in the western region of Bohemia. *Vet. Med.* 40, 77–80.
- Literák, I., Kroupa, L., 1998. Herd-level *Coxiella burnetii* seroprevalence was not associated with herd-level breeding performance in Czech dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 33, 261–265.
- Lorbacher de Ruiz, H., 1977. Q Fever in Colombia, S.A. A Serological Survey of Human and Bovine Populations. *Zbl. Vet. Med. B* 24, 287–292.
- Martin, R.J., Schnurtenberger, P.R., Ferris, D.H., Hanger, P.N., Morrissey, R.A., 1982. Decreasing prevalence of Q fever in Illinois. *Public Health Rep.* 97, 170–174.
- Martini, M., Baldelli, R., Paulucci De Calboli, L., 1994. An epidemiological study on Q fever in the Emilia-Romagna Region, Italy. *Zentralbl. Bakteriol.* 280, 416–422.
- Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., Chessa, G., Cillara, G., Chisu, V., Tola, S., 2004. Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. *Vet. Microbiol.* 99, 301–305.
- Maurin, M., Raoult, D., 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 518–553.
- Mazyad, S.A., Hafez, A.O., 2007. Q fever (*Coxiella burnetii*) among man and farm animals in North Sinai. *Egypt. J. Egypt. Soc. Parasitol.* 37, 135–142.
- McCaughy, C., Murray, L.J., McKenna, J.P., Menzies, F.D., McCullough, S.J., O'Neill, H.J., Wyatt, D.E., Cardwell, C.R., Coyle, P.V., 2010. *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol. Infect.* 138, 21–27.
- McQuiston, J.H., Nargund, V.N., Miller, J.D., Priestley, R., Shaw, E.I., Thompson, H.A., 2005. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* among veterinary school dairy herds in the United States, 2003. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 90–91.
- Milazzo, A., Hall, R., Storm, P.A., Harris, R.J., Winslow, W., Marmion, B.P., 2001. Sexually transmitted Q fever. *Clin. Infect. Dis.* 33, 399–402.
- Miller, W.R., 1964. occurrence and geographic distribution of Q fever antibodies in Alabama dairy cattle. *Public Health Rep.* 79, 836–838.
- Moffat, M.A., Massie, A., Laing, A.G., Mackenzie, R.M., Robinson, H.G., 1970. Q fever in North-East Scotland. *Lancet* 2, 1025–1027.
- Nielsen, S.S., Toft, N., 2009. A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Prev. Vet. Med.* 88, 1–14.
- Nielsen, S.S., Toft, N., Jørgensen, E., Bibby, B.M., 2007. Bayesian mixture models for within-herd prevalence estimates of bovine paratubercu-

- lisis based on a continuous ELISA response. *Prev. Vet. Med.* 81, 290–305.
- Ongör, H., Cetinkaya, B., Karahan, M., Açık, M.N., Bulut, H., Muz, A., 2004. Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Vet. Rec.* 154, 570–572.
- Oporto, B., Barandika, J.F., Hurtado, A., Aduriz, G., Moreno, B., Garcia-Perez, A.L., 2006. Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in northern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 498–501.
- Paiba, G.A., Green, L.E., Lloyd, G., Patel, D., Morgan, K.L., 1999. Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk in England and Wales. *Vet. Rec.* 144, 519–522.
- Pape, M., Bouzalas, E.G., Koptopoulos, G.S., Mandraveli, K., Arvanitidou-Vagiona, M., Nikolaidis, P., Alexiou-Daniel, S., 2009. The serological prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and goats in northern Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (Suppl 2), 146–147.
- Parisi, A., Fraccalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Capuano, F., Sottili, R., 2006. Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Vet. Microbiol.* 118, 101–106.
- Psaroulaki, A., Hadjichristodoulou, C., Loukaidis, F., Soteriades, E., Konstantinidis, A., Papastergiou, P., Ioannidou, M.C., Tselentis, Y., 2006. Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.* 25, 576–586.
- Rahimi, E., Doosti, A., Ameri, M., Kabiri, E., Sharifian, B., 2009. Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. *Zoonoses Public Health*, doi:10.1111/j.1863-2378.2009.01289.x.
- Reinthal, F.F., Mascher, F., Sixl, W., Arbesser, C.H., 1988. Incidence of Q fever among cattle, sheep and goats in the Upper Nile province in southern Sudan. *Vet. Rec.* 122, 137.
- Rhode, C., Kelly, P.J., Raoult, D., 1993. Dairy cows as reservoirs of *Coxiella burnetii* in Zimbabwe. *Cent. Afr. J. Med.* 39, 208–210.
- Rice, D.A., Knoke, M.A., 1979. The prevalence of Q-fever antibodies in dairy cows in El Salvador. *Trop. Anim. Health Prod.* 11, 50.
- Rodolakis, A., 2006. Q fever, *State of art*, epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small Rum. Res.* 62, 121–124.
- Rodolakis, A., Berri, M., Héchar, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C.C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natop, J.C., Vadet, J.P., Arricau-Bouvery, N., 2007. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J. Dairy Sci.* 90, 5352–5360.
- Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., 2009. *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 428–433.
- Ruppner, R., Riemann, H.P., Farver, T.B., West, G., Behymer, D.E., Wijayasinghe, C., 1978. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) and *Toxoplasma gondii* among dairy goats in California. *Am. J. Vet. Res.* 39, 867–870.
- Ruiz-Fons, F., Rodríguez, O., Torina, A., Naranjo, V., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2008. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in wild and farmed ungulates. *Vet. Microbiol.* 126, 282–286.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., 2010. Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. *BMC Vet. Res.* 20 (6), 3.
- Salinas-Meléndez, J.A., Avalos-Ramírez, R., Riojas-Valdez, V., Kawas-Garza, J., Fimbres-Durazo, H., Hernández-Vidal, G., 2002. Serologic survey in animals of Q fever in Nuevo Leon. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 44, 75–78.
- Schelling, E., Diguimbaye, C., Daoud, S., Nicolet, J., Boerlin, P., Tanner, M., Zinsstag, J., 2003. Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Prev. Vet. Med.* 61, 279–293.
- Scolamacchia, F., Handel, I.G., Fèvre, E.M., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvoort, B.M., 2010. Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in Bos indicus cattle in Cameroon. *PLoS One* 21, 8623.
- Scrimgeour, E.M., Al-Ismaily, S.I., Rolain, J.M., Al-Dhahry, S.H., El-Khatim, H.S., Raoult, D., 2003. Q Fever in human and livestock populations in Oman. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 221–225.
- Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezir, M., Raoult, D., 1999. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *Am. J. Epidemiol.* 150, 67–74.
- Tissot-Dupont, H., Amadei, M.A., Nezir, M., Raoult, D., 2004. Wind in November. Q fever in December. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1264–1269.
- To, H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K., 1998. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 859–861.
- Vaidya, V.M., Malik, S.V.S., Bhilegaonkar, K.N., Rathore, R.S., Kaur, S., Barbudde, S.B., 2010. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, doi:10.1016/j.cimid.2008.10.006.
- van der Hoek, W., Dijkstra, F., Schimmer, B., Schneeberger, P.M., Vellema, P., Wijkman, C., ter Schegget, R., Hackert, V., van Duynhoven, Y., 2010. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill.* 25, 12.
- Wallensten, A., Moore, P., Webster, H., Johnson, C., van der Burgt, G., Pritchard, G., Ellis-Iversen, J., Oliver, I., 2010. Q fever outbreak in Cheltenham, United Kingdom, in 2007 and the use of dispersion modelling to investigate the possibility of airborne spread. *Euro Surveill.* 25, 15.
- Webster, D., Haase, D., Marrie, T.J., Campbell, N., Pettipas, J., Davidson, R., Hatchette, T.F., 2009. Ovine-associated Q fever. *Epidemiol. Infect.* 137, 744–751.
- Wittenbrink, M.M., Gefäller, S., Failing, K., Bisping, W., 1994. The effect of herd and animal factors on the detection of complement-binding antibodies against *Coxiella burnetii* in cattle. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 107, 185–191.
- Yoshiie, K., Oda, H., Nagano, N., Matayoshi, S., 1991. Serological evidence that the Q fever agent (*Coxiella burnetii*) has spread widely among dairy cattle of Japan. *Microbiol. Immunol.* 35, 577–581.

Annexe 2 : ‘Q fever within-herd seroprevalence in infected dairy herds : assessment using an ELISA applied to bulk tank milk’ Poster SVEPM, Mars 2010, Nantes

Q fever within-herd seroprevalence in infected dairy herds: assessment using an ELISA applied to bulk tank milk



AF. Taurel^{1,2}, R. Guatteo¹, A. Joly^{1,2}, H. Seeegers¹, F. Beaudreau¹



1. UMR ONIRIS-INRA 1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de risque, Nantes

2. Union Bretonne des GDS



INTRODUCTION

- Q fever: worldwide distributed zoonosis due to *Coxiella burnetii*
- Ruminants shedders are considered as main source of human infection
- To limit the infection of humans or animals, decrease the exposure to shedders animals is crucial
- Vaccination using a phase 1 vaccine has been shown to be efficient on susceptible animals
- In routine practice vaccination is implemented in infected herds: to ensure its efficacy, its use should be restricted to animals which are still susceptible (herds with a low within-herd prevalence)
- Within-herd seroprevalence is usually estimated using an ELISA applied to individual blood samples: time-consuming and costly method
- ELISA applied to the bulk tank milk: alternative time-saving and cheaper option

Aim of the study: to describe the distribution of the within-herd seroprevalence and to assess the interest of an ELISA applied to the bulk tank milk to estimate the within-herd seroprevalence.

MATERIAL AND METHODS

Data

- 56 naturally infected dairy herds with repeated recent abortions due to Q fever (positive PCR on placenta)
- Concomitant blood sampling of all lactating cows, dry cows, heifers of at least 12 months and Bulk Tank Milk (BTM)

ELISA test

- All samples sent to the same laboratory (IDAC-44, Nantes, France), and tested using the Q fever LSI ELISA kit (LSI, Lissieu, France) according to manufacturer's instructions

- Samples were considered positive as follow:

- cow seropositive if S/P ratio (S/P * 100) > 40
- BTM in 4 levels, positive if S/P ratio > 30:
 - 30 < S/P ratio < 100: low positive
 - 100 < S/P ratio ≤ 200: positive
 - S/P ratio > 200: high positive

Strategy of analysis

- Distribution of the within-herd seroprevalence at the herd, cows (multiparous, primiparous) and heifers levels
- Distribution of the within-herd seroprevalence according to S/P level in BTM

RESULTS

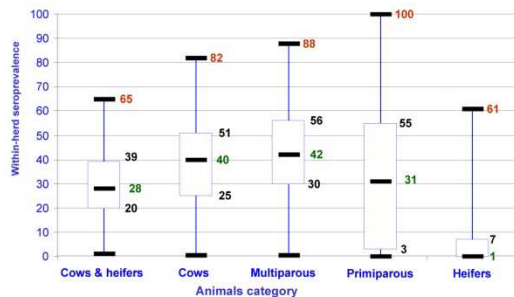


Figure 1. Within-herd seroprevalence in 56 infected dairy herds

- Within-herd seroprevalence highly variable (Figure 1)
- infected herds comprise 1 to 65% of seropositive animals
- Within-herd seroprevalence is higher in cows than in heifers
- No differences between primiparous and multiparous
- The within-herd seroprevalence in heifers is low to null
- Positive relationship between the within-herd seroprevalence in lactating cows and the BTM S/P ratio (Figure 2)
- 3 herds out of 4 (75%) with a BTM S/P ratio < 100 show a within-herd seroprevalence in lactating cows < 20%
- In herds with a BTM S/P ratio > 100, at least 10% of lactating cows are seropositive to Q Fever

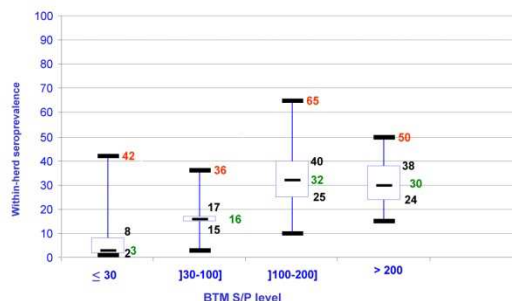


Figure 2. BTM S/P ratio (S/P*100) level and within-herd seroprevalence in lactating cows

CONCLUSIONS

- Among infected herds, the within-herd seroprevalence is highly variable but heifers are quite all still susceptible
- The within-herd seroprevalence increases with increased S/P ratio in BTM: ELISA applied to BTM seems to be a relevant tool to assess the within-herd seroprevalence in dairy herds
- Vaccination with a phase 1 vaccine targeting herds comprising susceptible animals could be implemented in herds with a BTM S/P ratio < 100, where a high proportion of still susceptible lactating cows is expected

Annexe 3 : 'Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds and implications for within-herd control' Poster One Health, Février 2011, Melbourne

Seroprevalence of Q Fever in naturally infected dairy cattle herds and implications for within-herd control



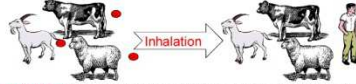
AF. Taurel^{1*}, R. Guatteo¹, A. Joly¹, H. Seegers¹, F. Beaudeau¹
1. UMR ONIRIS-INRA 1300 Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de risque, Nantes, France



INTRODUCTION



Coxiella burnetii is the causative agent of Q fever, a world wide distributed zoonosis. Humans and animals mainly get infected by inhaling infected aerosols. Ruminants shedders are considered as main source of human infection.



In infected herds to limit the spread of the infection between animals and from animals to human, it is crucial:

- To decrease the bacterial shedding from animals in the environment : previous studies showed that vaccination with a phase 1 vaccine is effective to prevent shedding on susceptible animals



- To decrease the bacterial spread/survival in the environment : hygienic measured focus on parturition and livestock waste are recommended but their efficiency remained unknown



Aim of the study, in order to improve medical and non-medical scheme in naturally and clinically infected dairy herds:

- to describe the distribution of the within-herd apparent prevalence rates of seropositive animals among cows and nulliparous females
- to explore the association between management practices and herd characteristics, on the one hand, and these seroprevalences on the other

MATERIAL AND METHODS

Herds

- 100 naturally infected dairy herds with repeated recent abortions due to Q fever (positive PCR on placenta) recruited between 2008 and 2009 in western France
- No implementation of vaccination directed against *C. burnetii* in the past 5 years, no antibiotic treatment of reproductive tract disorders within the past 6 months

Data collection

- Blood sampling of all dairy cows and nulliparous females (>12 months) sent to the same laboratory (IDAC-44, Nantes, France), and tested with the Q fever LSI ELISA kit (LSI, Lissieu, France) according to manufacturer's instructions. Samples were considered positive if S/P ratio (S/P * 100) > 40, seronegative otherwise
- Questionnaire filled in by each farmer concerning: herd characteristics, culling and calving practices, management of livestock waste, animals movement and mixing, and neighbouring contact

Strategy of analysis

- Statistical unit was the herd
- Description of the distribution of the within-herd seroprevalence in cows of the herd (P_c), and in nulliparous of the herd (P_n)
- Assessment of the impact on seroprevalences of herd characteristics and management practices (CMP) with variables built on classes ranked by increasing risk (a priori no risk to maximum risk):
 - Relation between P_c and CMP assessed through a GLM procedure,
 - CMP associated with the risk for a herd to comprise at least one seropositive nulliparous identified through a logistic regression

RESULTS

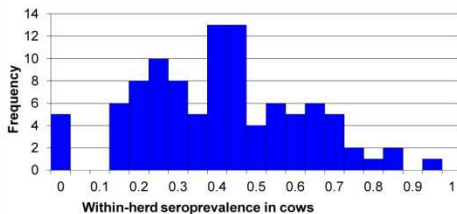


Figure 1. Within-herd seroprevalence of *C. burnetii* infection in cows of 100 naturally infected dairy herds

- 1st quartile at 28%, median at 42%, third quartile at 56%

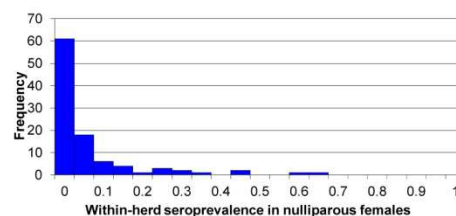


Figure 2. Within-herd seroprevalence of *C. burnetii* infection in nulliparous females of 100 naturally infected dairy herds

- 50% of herds with no seropositive nulliparous females, median at 10%

Table 1. Herd characteristics and management practices (CMP) significantly ($p < 0.10$) associated with cows within-herd seroprevalence of *C. burnetii* infection

CMP	Level	Seroprevalence Δ	90% CI
Number of cows	< 46	+ 0.11	(0.04 ; 0.19)
	≥ 46	-	
Seasonal calving	-No	-0.08	(-0.15 ; -0.003)
	-Yes	-	
Grazing or contact through the fence with other ruminants herds	-No	-0.10	(-0.16 ; -0.03)
	-Yes	-	

Table 2. Herd characteristics and management practices (CMP) significantly ($p < 0.10$) associated with the herd status (herds with no seropositive nulliparous females vs. herds with at least one seropositive nulliparous females) to *C. burnetii* infection

CMP	Level	OR	95% CI
Seasonal calving	-Yes	2.73	1.02 – 7.32
	-No		
Systematic removal of the foetus and placenta of aborted cow	-Other	2.96	1.11 – 7.87
	-Yes		

DISCUSSION

- First description of the within-herd seroprevalence of all cows and nulliparous females in clinically infected herds at such a scale using ELISA
- Quite systematic low to null within-herd seroprevalence in nulliparous females, consistent with other studies \rightarrow target population for vaccination
- High level and variability in cows within-herd seroprevalence \rightarrow determination of within-herd seroprevalence necessary prior to vaccination to assess its relevance
- Herds characteristics and management practices associated with higher seroprevalence, thus bacterial diffusion, are consistent with biological assumption:
 - higher probability of contact with *Coxiella burnetii*
 - higher exposition to contaminated products

CONCLUSION

- Only few characteristics and management practices are associated with variation in seroprevalence, strengthening the pivotal role of vaccination to decrease exposure of humans and cows to *Coxiella burnetii*
- As vaccination is effective to prevent shedding only when applied to susceptible animals, in infected herd the recommended vaccination scheme could be :
 - systematic vaccination of nulliparous females due to their quite systematic low to null within-herd seroprevalence
 - vaccination of cows based on previous estimation of within-herd seroprevalence

REFERENCES: Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? Vet. Res. 36, 327-349; EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010. Scientific Opinion on Q Fever. EFSA Journal. p. 114.; Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., 2008. Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase 1 *C. burnetii* inactivated vaccine. Vaccine 26, 4320-4328.; Welsh, H.H., Lennette, E.H., Abinanti, F.R., Winn, J.F., 1958. Air-borne transmission of Q fever: the role of parturition in the generation of infective aerosols. Ann. NY. Acad. Sci. 70, 528-540.

*Contact: anne-frieda.taurel@oniris-nantes.fr

Annexe 4 : ‘Effectiveness of medical strategies combining antibiotics and vaccination to prevent *Coxiella burnetii* Shedding in infected dairy cows’ Oral Communication, Mars 2012, Glasgow

EFFECTIVENESS OF MEDICAL STRATEGIES COMBINING ANTIBIOTICS AND
VACCINATION TO PREVENT *COXIELLA BURNETII* SHEDDING
IN INFECTED DAIRY COWS

A.-F. TAUREL*, R. GUATTEO, A. JOLY AND F. BEAUDEAU

SUMMARY

The effectiveness of strategies combining vaccination and/or antibiotherapy to prevent vaginal shedding of *Coxiella burnetii* at parturition in dairy cows was assessed through a 13 months follow-up in 22 dairy herds. Four medical strategies were compared: vaccination, antibiotherapy, both, and none. Two hierarchical, logistic regression analyses were performed, considering vaccination in 2 (yes/no) or 3 modalities (no/before insemination/after insemination), respectively. Antibiotherapy (*i.e.* oxytetracycline, 20 mg/kg at each injection) was considered in 3 modalities (no/once at drying off/twice at drying off). The models were adjusted for serologic status at inclusion time, age at calving, and herd was included as a random effect. Among the 883 cows, 18.3% were detected as shedders. Antibiotherapy and initial serologic status were associated with shedding ($P < 0.05$), whereas vaccination and age at calving were not ($P > 0.05$). Two injections at drying off did not provide any additional benefit to one. This study provides first results for rational use of antibiotics in *Coxiella burnetii* infected herds.

INTRODUCTION

Coxiella burnetii is the infectious agent responsible for Q fever, a world wide spread zoonosis. The apparent prevalence of *C. burnetii* infection is quite important in domestic ruminants, with estimated mean value at animal and herd level of 20% and 37.7% in cattle and 15% and 25% in sheep and goat (Guatteo et al., 2011). In those species, Q fever can induce abortion and metritis (Tainturier, 1987). Moreover, domestic ruminants are recognized as the main source of human infection (Marrie and Raoult, 1997), which occurred after inhalation of infectious aerosols. Infected animals shed the bacteria mainly through birth products (e.g., placenta), but also through semen (Kruszewska and Tylewska-Wierzbanska, 1997), vaginal mucus, urine, milk and faeces (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005; Guatteo et al., 2007). Additionally, parturition period is considered as a period at risk, as ruminants have been reported to shed the highest bacterial load at that time (Berri et al., 2002). Therefore, any measure which aims to control *Coxiella burnetii* shedding in ruminants will improve animal health status and result in reducing the zoonotic risk.

Vaccination using a phase 1 vaccine was recognized to be effective in goats in an experimental study (Arricau-Bouvery et al., 2005) and in cattle when applied to susceptible

(i.e. seronegative and non-shedder) animals before service (Guatteo et al., 2008). In cattle, nulliparous heifers, which were reported as quite systematically non infected even in infected herds (Taurel et al., 2011), are considered as a target population for vaccination. In contrast, a wide distribution of within-herd prevalence of antibody-carrier cows is observed in infected herds, making the use of vaccination questionable in adults, as vaccination does not prevent shedding when applied to infected animals.

In routine practice, antibiotics (mainly tetracycline) are classically used by practitioners to prevent shedding in infected animals. They are used at different regimens, at calving time to limit the shedding peak (Berri et al., 2001; Arricau-Bouvery et al., 2003) and/or at drying off to prevent late abortion. Few studies aiming at assessing its effectiveness have been performed up until now, in cows (Behymer et al., 1977) and in sheep (Astobiza et al., 2010a). These studies, which both included few numbers of animals subjected to a unique regimen, reported contradictory results.

The aim of this study was to compare the effectiveness of different medical strategies combining vaccination using a phase 1 vaccine and/or antibiotics (tetracycline) at drying off, to prevent *Coxiella burnetii* vaginal shedding at calving time in cows from commercial dairy herds clinically affected with *Coxiella burnetii*.

MATERIALS AND METHODS

Herds and animals

This work was conducted in compliance with the STROBE statement for cohort studies (von Elm et al., 2007). From February 2008 to May 2010, 22 dairy herds clinically affected by *Coxiella burnetii* were recruited. All dairy herds that fulfilled the following requirements were included in the study: detection of *Coxiella burnetii* by PCR on the placenta or in a vaginal swab of at least one aborting cow within the month before the possible inclusion and 50% of seropositive results in ELISA of at least 6 sampled cows (in line with the EFSA report (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010); no implementation of vaccination directed against *Coxiella burnetii* within the previous five years; no tetracycline treatment for reproductive tract disorders, such as metritis or abortion, within the previous six months. Farmers had to sign a consent form and to give their agreement for cows to be vaccinated during gestation.

All dairy females older than 12 months expected to experience a calving in the 13 months following inclusion time were included in the follow-up.

Experimental design

Nature and allocation of treatments: At inclusion time, medical strategies were randomly allocated to each herd. Due to ethics concerns, and given the effectiveness of vaccination on susceptible animals (Guatteo et al., 2008) and the susceptible status of nulliparous heifers (Taurel et al., 2011), the vaccination of nulliparous heifers was systematically performed regardless the strategy for cows. Dairy cows were randomly assigned to 4 different strategies: (i) vaccination, (ii) vaccination and antibiotherapy, (iii) antibiotherapy without vaccination, or (iv) no intervention. Vaccination consisted in 2 injections 3 weeks apart and an annual booster injection, clustered in time with the vaccination of new eligible animals after one year follow-up (heifers of 12 months and more at booster time injection). The vaccine used was the phase 1 inactivated vaccine (Coxevac®, CEVA Santé Animale, ZI de la Ballastière, Libourne, France). The antibiotic used was oxytetracycline (Ténaline LA, CEVA Santé Animale, ZI de

la Ballastière, Libourne, France). Within herds allocated to medical strategies including antibiotics, cows were randomly assigned to 5 different individual antibiotic regimens (20 mg/kg at each injection): antibiotic at (i) drying off, at (ii) calving, at (iii) drying off and calving, at (iv) drying off and 15 days later, or (v) drying off and 15 days later and calving.

In order to help farmers improving the compliance of the antibiotic strategies, the farmers received a reminder text message on their cell phone on the expected day of intervention (based on estimated date of drying off and calving provided by the milk recording scheme).

Sample and laboratory analysis: At inclusion time, in each selected herd, blood samples were collected by the practitioner from all animals older than 12 months, to determine their antibody carrier status. Samples were immediately sent to the laboratory (Institut Départemental d'Analyses et de Conseil, Nantes, France) to be tested using the Q fever LSI ELISA kit (LSI, Lissieu, France) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed in an optical density Sample/Positive control (S/P) ratio. A serum sample was considered to be positive when the S/P ratio in serum was >40, and seronegative otherwise.

A vaginal swab was performed within 4 days after each calving on each included animals by the practitioner. The vaginal swabs were immediately sent to the laboratory (IDHESA Bretagne Océane, Quimper) to be tested using the real time PCR LSI TAQVET *Coxiella burnetii* kit (LSI, Lissieu, France) to detect putative *Coxiella burnetii* shedding. The results were expressed in number of bacteria per mL of vaginal mucus.

Strategy of analysis

The statistical unit was the cow. In a first model, vaccination was considered in 2 modalities, not vaccinated and vaccinated. As pregnancy status of animals have been reported to impact the vaccination effectiveness (Guatteo et al., 2008), in a second model the variable describing vaccination took into account the time of injections with regards to the presumed conceiving artificial insemination (AI), with 3 modalities: not vaccinated, vaccinated after AI, vaccinated before AI. In both models, only antibiotic injections at drying off were considered. It was assumed that there was not enough time between injection at calving and vaginal mucus sampling to observe a putative effect of antibiotics at calving on shedding. Antibiotic strategies were described through one variable with 3 modalities taking into account the number of injections: received antibiotic at drying off: no vs. at drying off vs. at drying off and 15 days later. Cows receiving antibiotic at calving were then considered as not treated, those receiving antibiotic at drying off and calving were considered as treated at drying off only.

The data structure was hierarchical (with cows clustered within herds). To assess the effectiveness of medical strategies to prevent *Coxiella burnetii* shedding at calving, we modelled the probability of being shedder for a j cow from an i herd through a hierarchical, logistic model regression (Proc Glimmix, SAS[®] v. 9.2) with herd as the random factor, and taking account of individual adjustment variables (initial serologic status and age), as follows (Eq. (1)):

$$P(Y=0/1)_{ij} = \beta_1 * \text{vaccination} + \beta_2 * AB + \beta_3 * \text{age} + \beta_4 * \text{serostatus} + \mu * \text{herd} + \varepsilon \quad (1)$$

where $P(Y=0/1)_{ij}$ is the probability for a j cow of being shedder or not (yes =1, no=0) in an i herd, β s are parameter estimates of the fixed part of the model, μ the random herd effect, and ε the error term. The term *vaccination* represents the vaccination strategy (in 2 or 3 modalities depending of the model, 1 or 2 respectively), *AB* represents the antibiotic strategy,

and *serostatus* represents the cow serological status at inclusion time. A binomial distribution and a logit link were used for the model. Two-order interaction terms among the variables describing the medical strategies (vaccination, antibiotics at drying-off) and with the initial serological status were tested. All variables with a *P*-value <0.05 were considered significantly associated with the shedding status at calving.

RESULTS

A sample of 883 calving cows with complete demographic data from 22 herds was considered for analyses. There were 57.8% of seronegative cows at inclusion time and 18.3% were detected shedders at calving time through the follow up. Herd characteristics are displayed in Table 1.

Table 1. Characteristics of the 22 herds clinically affected by *Coxiella burnetii* according to the implemented herd medical strategy

Variable	Herd medical strategy				Total
	Vaccination	Vaccination and antibiotherapy	Antibiotherapy	No treatment	
N. of herds	6	5	5	6	22
No. of cows/herd					
1 st quartile	32	39	28	27	28
2 nd quartile	40	51	34	31	35
3 rd quartile	67	58	35	39	51
% of initially seropositive cows / herd					
1 st quartile	32.3	17.9	21.4	46.4	21.7
2 nd quartile	50.4	48.3	42.4	48.6	48.6
3 rd quartile	54.3	71.4	39.4	50.0	55.6
% of shedder cows / herd					
1 st quartile	13.4	5.1	14.3	5.7	5.7
2 nd quartile	25.8	10.3	32.0	9.9	16.6
3 rd quartile	29.6	19.0	35.7	21.4	29.6

The risk of being detected shedder at calving time associated with the medical strategies, considering vaccination in 2 modalities (not vaccinated vs. vaccinated) is displayed in Table 2. Neither vaccination, nor age at calving was significantly associated with shedding status in cows. Antibiotics, especially once at drying off (OR 0.40, CI 95% [0.21-0.75]), and seronegative initial status were associated with a lower risk of being detected shedder at calving. No interactions between medical strategies, and between medical strategies and serological status at inclusion time, were found to be significant ($P > 0.05$).

Table 2. Risk of being detected shedder at calving time associated with cow characteristics and the medical strategy the cow received (883 dairy cows located in 22 herds clinically affected by *Coxiella burnetii*, mixed logistic regression)

Variable	N. Of cows	% shedder cows	Risk of shedding		
			OR	CI 95%	P-value
Total	883	18.3			
Vaccination					0.83
No	448	17.0	1		
Yes	435	19.8	0.94	0.53-1.67	
Antibiotic					0.02
No	687	18.9	1		
At drying off	129	16.3	0.40	0.21-0.75	
At drying off and 15 days later	67	16.4	0.51	0.22-1.15	
Initial serologic status					<0.0001
Seropositive	373	26.0	1		
Seronegative	510	12.7	0.39	0.26-0.59	
Age at calving			0.93	0.84-1.04	0.21

When considering vaccination in 3 modalities (not vaccinated vs. vaccinated after artificial insemination vs. vaccinated before artificial insemination), vaccination was once again not significantly associated with the risk of being detected shedder at calving time (vaccinated after AI OR 1.03, IC 95% 0.59-1.82; vaccinated before AI OR 0.63, IC 95% 0.28-1.40). Direction and magnitude of effects associated with the other variables did not change.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study that aimed at comparing the effectiveness of medical strategies, using vaccination and/or antibiotics at different regimens, to prevent *Coxiella burnetii* shedding at calving in dairy cows from clinically affected herds.

The originality of this study lies on its ambitious design. This study was performed under field conditions on a large number of herds and animals contrary to previous studies (Behymer et al., 1977; Woernle et al., 1985; Arricau-Bouvery et al., 2005; Guatteo et al., 2008; Rousset et al., 2009; Astobiza et al., 2010b; Cremoux et al., 2011). Additionally, the evaluated strategies (including up to 3 different antibiotic regimens) were applied within each herd to the whole population of cows, in contrast to recent studies based on split design and unique regimen (Guatteo et al., 2008), possibly leading to bias in estimating of medical strategies effectiveness. Lastly, contrary to previous studies conducted in cattle aiming to assess the effectiveness of antibiotics (Behymer et al., 1977; Woernle et al., 1985), the choice made here to sample vaginal mucus at calving time (instead of milk) and to use real time PCR (instead of serological methods), led to a more accurate description of the dynamics of *Coxiella burnetii* infection.

In the present study, in contrast to previous recent findings in goats and cattle (Guatteo et al., 2008; Hogerwerf et al., 2011) vaccination does not appear to prevent significantly individual shedding at calving time, although the estimated ORs were lower than unity when the cows were vaccinated before AI (Table 2). A possible explanation for this dissimilarity

could rely on the less strict definition of the infectious status of cows in our study. In Guatteo et al (2008), given the putative *Coxiella burnetii* shedding patterns previously reported (Guatteo et al., 2007) (*i.e.*, no concomitancy in shedding routes, intermittent shedding), and the existence of seronegative shedders, the infectious status of cows was determined based on PCR results on 3 shedding routes (individual milk, vaginal mucus and faeces) explored concomitantly and ELISA responses on individual blood, all samplings being performed twice 15-days apart. In our study, the shedding status of cows was not tested, possibly leading to the existence of seronegative cows (considered as non-infected) but in fact shedders. A lack of sensitivity of ELISA result cannot be also excluded, although we used an ELISA based on ovine antigen recognized as the most sensitive ELISA (Horigan et al., 2011). Additionally, the unknown delay between the exposition to potential infectious aerosols and the determination of initial serological status, together with the delay (2 to 5 weeks) between the determination of the initial serological status and effective immunization of animals by vaccination, can have allowed the occurrence of undetected infection. This hypothesis about the lack of accuracy in the definition of the infectious status of cows was strengthened by the fact that we did not evidence any significant interaction between initial serologic status and vaccination, whereas it evidenced in previous studies (Guatteo et al., 2008; Cremoux et al., 2011). Thus the accurate determination of the infectious status of animals (towards shedding and antibody carriage) seems to be important to assess the effectiveness of vaccination. Moreover, a cow was considered to be shedder at calving time when the PCR was positive regardless the estimated bacterial load, while the reproducibility and the biological significance (infectiousness and viability) of very high Ct value (corresponding to <100 bacteria) are still debated (EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010).

Antibiotic, when used once at drying off (Table 1), was found to significantly prevent shedding at calving time, as reported in other study (Behymer et al., 1977). A second injection done 15 days later did not improve this preventive effect. In sheep (Astobiza et al., 2010a), antibiotic was reported to have no effect neither on prevention or duration of shedding. In this latter study, only one antibiotic regimen was applied, and few animals were tested (50-60 sheep per sampling time). Given the need for a decreased use of antibiotics to limit the risk of antibiostance, our results provide evidence for a reasoned use to avoid massive implementation of repeated and useless injection of tetracycline at drying off. Moreover, slight differences were observed in the overall proportions of animal detected shedders among the 3 antibiotic modalities: 18.9% in cows without antibiotics, and respectively 16.3% and 16.4% in cows with 1 or 2 injections at drying off. However, despite this slight difference on average, large variability existed between farms: the proportions of cows detected as shedders ranged from 3% to 38% depending on the herds. Thus, herd characteristics should be further investigated to identify and target herds where use of antibiotic could be of interest.

Moreover, as Q fever in ruminants is also described to be associated with clinical signs, such as metritis and abortion, studies are needed to highlight the impact of antibiotherapy on those clinical signs.

In this study, the focus is on shedding occurrence at calving as it is known as the period of higher risk of shedding. As *Coxiella burnetii* can be shed over the whole lactation period through different shedding routes (Berri et al., 2000; Guatteo et al., 2006), further field studies would be relevant to evaluate the effectiveness of medical strategies under study to control shedding over a longer period, especially through routes (faeces, urine and vaginal mucus) which mainly contribute to generate infective aerosols. Moreover, as a wide range can be observed in bacterial load shed (Guatteo et al., 2007), with possible implications in terms of environmental contamination and human and animal exposure (Courcoul et al., 2011), it would be interesting to assess the impact of medical strategies on shedding reduction, as it has

been reported in small ruminants whatever the infectious status (Rousset et al., 2009; Cremoux et al., 2011; Hogerwerf et al., 2011). The identification of animals in which vaccination reduce shedding could reinforce the interest of vaccination in infected herds.

This study, conducted under field condition in naturally and clinically affected dairy herds, is the first aiming at assessing the efficacy of vaccination combined with antibiotherapy to prevent *Coxiella burnetii* shedding at calving. This study provides first results for the rational use of antibiotic in infected herds.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank all farmers, veterinarians and staff involved in this study (especially Jean-Yves Audiart), CEVA Santé Animale, the Groupements de Défense Sanitaire of Western France and the Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) for their financial support.

References

- Arricau-Bouvery, N. and Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet. Res.* 36, 327-349
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E. and Rodolakis, A. (2005). Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine* 23, 4392-4402
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Lechopier, P. and Rodolakis, A. (2003). Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats : excretion routes. *Vet. Res.* 34, 423-433
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., Juste, R.A. and García-Pérez, A.L. (2010a). Kinetics of *Coxiella burnetii* excretion in a commercial dairy sheep flock after treatment with oxytetracycline. *The Veterinary Journal* 184, 172-175
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A. and Garcia-Perez, A.L. (2010b). *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Res. Vet. Sci.* 91, e58-63
- Behymer, D., Ruppenar, R., Riemann, H.P., Biberstein, E.L. and Franti, C.E. (1977). Observation on chemotherapy in cows chronically infected with *Coxiella burnetii* (Q fever). *Folia Vet. Lat.* 7, 64-70
- Berri, M., Laroucau, K. and Rodolakis, A. (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 72, 285-293
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Crochet, D., Lechopier, P. and Rodolakis, A. (2001). Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. *Vet. Rec.* 148, 502-505
- Berri, M., Souriau, A., Crosby, M. and Rodolakis, A. (2002). Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. *Veterinary Microbiology* 85, 55-60
- Courcoul, A., Monod, H., Nielen, M., Klinkenberg, D., Hogerwerf, L., Beaudeau, F. and Vergu, E. (2011). Modelling the effect of heterogeneity of shedding on the within herd *Coxiella burnetii* spread and identification of key parameters by sensitivity analysis. *J. Theor. Biol.* 284, 130-141
- Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., Ribaud, D., David and V., Pape, M. (2011). Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 64, 104-106
- EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) (2010). Scientific Opinion on Q Fever. *EFSA Journal*. p. 114
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A. and Seegers, H. (2006). Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet. Res.* 37, 827-833

- Guatteo, R., Beaudéau, F., Joly, A. and Seegers, H. (2007). *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet. Res.* 38, 849-860
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A. and Beaudéau, F. (2008). Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine* 26, 4320-4328
- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.-F., Joly, A. and Beaudéau, F. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Veterinary Microbiology* 149, 1-16
- Hogerwerf, L., van den Brom, R., Roest, H.I.J., Bouma, A., Vellema, P., Pieterse, M., Dercksen, D. and Nielen, M. (2011). Reduction of *Coxiella burnetii* Prevalence by Vaccination of Goats and Sheep, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 379-386
- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R. and Pritchard, G.C. (2011). Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 924-931
- Kruszewska, D. and Tylewska-Wierzbanowska, S. (1997). Isolation of *Coxiella burnetii* from bull semen. *Research in Veterinary Science* 62, 299-300
- Marrie, T.J. and Raoult, D. (1997). Q fever - a review and issues for the next century. *Int. J. Antimicrobial Agents* 8, 145-161
- Rousset, E., Durand, B., Champion, J.L., Prigent, M., Dufour, P., Forfait, C., Marois, M., Gasnier, T., Duquesne, V., Thiery, R. and Aubert, M.F. (2009). Efficiency of a phase 1 vaccine for the reduction of vaginal *Coxiella burnetii* shedding in a clinically affected goat herd. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 Suppl 2, 188-189
- Tainturier, D. (1987). Recurrent metritis due to Q fever in cows. *Recl. Med. Vet.* 163, 195-198
- Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H. and Beaudéau, F. (2011). Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine* 101, 51-57
- von Elm, E., Altman, D.G., Egger, M., Pocock, S.J., Gãtzsche, P.C. and Vandenbroucke, J.P. (2007). The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) Statement: Guidelines for reporting observational studies. *Preventive Medicine* 45, 247-251
- Woernle, H., Limouzin, C., Muler, K. and Durand, M.P. (1985). La fièvre Q bovine - effets de la vaccination et de l'antibiothérapie sur l'évolution clinique et l'excrétion de *coxiella* dans le lait et les sécrétions utérines. *Bull. Acad. Vet. De France* 58, 91-100

Liste des publications

Articles dans périodiques à comité de lecture internationaux

Publiés

Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2011. Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine* 101, 51-57.

Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A.-F., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review. *Veterinary Microbiology* 149, 1-16.

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. *Epidemiology and Infection*, 1-4. DOI: 10.1017/S0950268811002275

Soumis

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F. Effectiveness of vaccination and antibiotics to control *Coxiella burnetii* shedding around calving in dairy cows. *Veterinary Microbiology* soumis le 09 Février 2012.

En préparation

Taurel, A.F., Lehebel A., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F. Effect of vaccination and antibiotics on *Coxiella burnetii* load in pooled milk and environmental samples in Q fever affected dairy cattle herds, en préparation

Communications orales avec actes dans un congrès ou un symposium national ou International

Acceptées

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Effectiveness of medical strategies combining antibiotics and vaccination to prevent *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy cows. In, Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine Congress, 28-30 March, Glasgow.

Soumises

Taurel, A.F., Lehebel, A., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Reduction of *Coxiella burnetii* load in Bulk Tank Milk using vaccination in Q fever affected dairy cattle herds. In, ISVEE, 20-24 August, Maastricht.

Communications orales sans actes dans un congrès international ou national

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2009. Le protocole fièvre Q Grand Ouest. In, Journées des GDS Grand Ouest, 09 June, Puy du Fou.

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2009. Within-herd *Coxiella burnetii* seroprevalence in naturally infected dairy herds: description and estimation using an ELISA applied to the bulk tank milk. In European Buiatrics Forum, 01-03 December, Marseille.

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2010. Distribution de la Séroprévalence intra-troupeau de la fièvre Q en troupeaux bovins laitiers infectés et pratiques d'élevage associées. In, Journée Bovine Nantaise, 30 September, Nantes.

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Le Protocole Fièvre Q Grand Ouest : Pourquoi et Comment? In, Journée Fièvre Q Grand Ouest, 15 December, Rennes

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2011. Distribution de la Séroprévalence intra-troupeau en élevage bovin laitier infecté et pratiques d'élevage associées. In, Journée Fièvre Q Grand Ouest, 15 December, Rennes.

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2011. Intérêt de la vaccination des vaches laitières. In, Journée Fièvre Q Grand Ouest, 15 December, Rennes.

Taurel, A., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F., 2012. Effectiveness of antibiotics and vaccination to prevent *Coxiella burnetii* shedding at calving in infected dairy cows. In, World Buiatrics Conference, 03-08 June, Lisbonne.

Communications par affiche dans un congrès international ou national

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2010. Q fever within-herd seroprevalence in infected dairy herds: assessment using an ELISA applied to bulk tank milk. In, Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine Congress, 24-26 March, Nantes.

Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H., Beaudeau, F., 2011. Seroprevalence of Q Fever in Naturally Infected Dairy Cattle Herds and Implications for Within-Herd Control. In One Health Congress, 14-16 February, Melbourne

Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales (DRED)

RESUMÉ et MOTS CLÉS

EVALUATION DE L'EFFICACITE DE MESURES DE MAITRISE MEDICALE POUR LA MAITRISE DE L'INFECTION PAR *COXIELLA BURNETII* EN TROUPEAUX BOVINS LAITIERS

L'objectif de la thèse était d'évaluer l'efficacité de mesures de maîtrise médicale de l'infection par *Coxiella burnetii* en troupeaux bovins laitiers naturellement infectés. Pour ce faire, un essai multicentrique dans 120 troupeaux bovins cliniquement atteints de Fièvre Q a été mené. A l'inclusion, chaque troupeau se voyait attribuer une stratégie médicale correspondant (en plus de la vaccination des génisses) à : (i) la vaccination du troupeau adulte, (ii) l'antibiothérapie chez les vaches laitières, (iii) la combinaison de la vaccination et de l'antibiothérapie et (iv) aucune mesure sur le troupeau adulte. Après avoir mis en évidence des niveaux de séroprévalence très variables chez les vaches *a contrario* des génisses le plus souvent séronégatives et confirmé l'intérêt d'un test ELISA appliqué au lait de tank pour estimer la séroprévalence chez les vaches laitières, l'efficacité des différentes stratégies a été évaluée au travers du suivi durant 13 mois de l'excrétion de *Coxiella burnetii* chez les vaches laitières à l'échelle individuelle et du troupeau. La vaccination du troupeau adulte en plus de celle des génisses est associée à une diminution de la charge bactérienne mesurée à la fois à l'échelle individuelle dans le mucus vaginal au vêlage et à l'échelle du troupeau dans le lait de mélange et dans des prélèvements d'environnement. Une efficacité préventive, vis-à-vis de l'excrétion au vêlage, d'une injection unique de tétracycline au tarissement est également rapportée. Les résultats de cette thèse fournissent des bases pour la mise en œuvre raisonnée de mesures de maîtrise de la Fièvre Q chez les bovins laitiers.

Mots-clés : bovin laitier, fièvre Q, *Coxiella burnetii*, épidémiologie, mesures de maîtrise, excrétion, séroprévalence

ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF MEDICAL MEASURES TO CONTROL *COXIELLA BURNETII* INFECTION IN DAIRY CATTLE HERDS

The aim of the PhD thesis was to assess the effectiveness of different medical measures to control *Coxiella burnetii* (*Cb*) infection in clinically affected dairy herds. To reach that goal, a multicentric trial was conducted in 120 commercial affected dairy herds. At inclusion time, one strategy among four was randomly assigned to each herd corresponding to (in addition to the systematic vaccination of heifers): (i) vaccination of dairy cows, (ii) use of antibiotics at drying off, (iii) the combination of vaccination and antibiotics and (iv) no action on dairy cows. After having evidenced very wide levels of seroprevalence in dairy cows, contrary to heifers which were quite systematically seronegative and having confirmed the informative value of an ELISA applied on bulk tank milk to assess the seroprevalence of Q fever in dairy cows, the effectiveness of the 4 medical strategies was assessed through a 13 months follow-up of *Coxiella burnetii* shedding at both individual and herd levels. Vaccination of dairy cows, in addition to that of heifers, was associated with a reduction of *Cb* bacterial load measured at individual level (in vaginal mucus at calving time) and at herd level (in bulk milk and environmental samples). Tetracycline injection once at drying off was associated with a lower risk of *Cb* shedding in vaginal mucus at calving time. The present results provide useful knowledge to elaborate evidence based control scheme towards Q fever control in dairy cattle.

Key-words : cattle, Q fever, *Coxiella burnetii*, epidemiology, control measures, shedding seroprevalence