

République Algérienne Démocratique  
et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et la Recherche Scientifique  
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
المدرسة الوطنية العليا للطب



## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences  
En Sciences Vétérinaires

### Thème :

**Étude de la Coxiellose bovine dans la région de Sétif**

Présentée par : **MENADI Salah Eddine**

Soutenue le : **01-07-2020**

Les membres du jury :

	<b>Nom &amp;Prénom</b>	<b>Grade</b>	<b>Institution</b>
<b>Présidente</b>	<b>BOUKHORS Karima Thamina</b>	<b>Professeur</b>	<b>ENSV Alger</b>
<b>Directrice de thèse</b>	<b>HAFSI Fella</b>	<b>Professeur</b>	<b>ENSV Alger</b>
<b>Examinatrice</b>	<b>AZZAG Naouelle</b>	<b>MCA</b>	<b>ENSV Alger</b>
<b>Examineur</b>	<b>MENOUERI Mohamed Nabil</b>	<b>Professeur</b>	<b>ISV Blida</b>
<b>Examineur</b>	<b>KARDJADJ Moustafa</b>	<b>MCA</b>	<b>ESSAIA Alger</b>
<b>Examineur</b>	<b>LAATAMNA Abdelkarim</b>	<b>MCA</b>	<b>Université de Djelfa</b>
<b>Invitée</b>	<b>GHALMI Farida</b>	<b>Professeur</b>	<b>ENSV Alger</b>

**Année Universitaire : 2019/2020**

## *REMERCIEMENTS*

*Au seuil de cette thèse de doctorat, qu'il nous soit permis d'adresser nos sincères remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont participé à la réalisation de ce travail, particulièrement:*

*À ma directrice de thèse **Pr. HAFSI Fella**, je lui exprime mes vifs remerciements pour toutes les informations qu'elle nous a données, ses efforts, sa disponibilité, ses précieux conseils, ses qualités humaines et surtout sa gentillesse.*

*Au **Pr. GHALMI Farida** Je lui suis reconnaissant pour sa patience, sa disponibilité, ses encouragements et sa bienveillance qui m'ont permis de surmonter les difficultés rencontrées au cours de cette thèse. Je lui suis également reconnaissant pour sa rigueur, ses conseils, ses commentaires, son esprit critique et ses qualités scientifiques. Rien ne sera suffisant pour lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.*

*Au Mr **CHINA Bernard** Docteur en Biologie Moléculaire, Expert pour Sciensano, l'Institut Belge de Santé, Bruxelles, Belgique. Je lui adresse toute ma gratitude pour son soutien, ses conseils et son aide précieuse quand j'en ai eu besoin. Malgré son emploi du temps surchargé, merci d'avoir toujours trouvé un moment pour discuter avec moi quand je frappais à sa porte. Que cette thèse soit l'occasion de vous exprimer mon respect, ma reconnaissance et ma gratitude pour m'avoir tant appris.*

*Ce travail est le résultat d'une collaboration avec le laboratoire de Zoonose, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italie. Je suis particulièrement redevable au **Dr. MASALA Giovanna** qui m'a accueilli au sein de son unité de recherche. Je tiens à la remercier pour sa gentillesse et ses conseils qui m'ont permis de me sentir à l'aise dans ce laboratoire. Je remercie chaleureusement tous les membres de son équipe pour leur grande disponibilité et l'ambiance décontractée qui m'a facilité le travail, et tout particulièrement **Dr. MURA Alessandra, Dr. SANTUCCIU Cinzia et Dr. CHISU Valentina** pour leurs conseils avisés et pour leurs suivis qu'elles m'ont apportés tout au long de mon stage.*

## *REMERCIEMENTS*

*Je tiens également à exprimer ma gratitude envers l'équipe de laboratoire de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo, Italie et plus spécialement le Dr Marco Di Domenico pour m'avoir permis de réaliser les analyses de génotypage au sein de son unité de recherche.*

*Je tiens aussi à exprimer mes remerciements les plus sincères au :*

***Pr. BOUKHORS Karima Thamina** de nous faire l'honneur de présider le jury.*

***Dr. AZZAG Nawel** qui nous a fait l'honneur d'accepter de participer à notre jury.*

***Pr. MENOUIRI MOHAMED NABIL** qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.*

***Dr. KARDJADJ Moustafa** qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.*

***Dr. LAATAMNA Abdelkarim** pour l'honneur qu'il nous fait d'examiner ce travail.*

*J'aimerais remercier également tous:*

*Les vétérinaires qui m'ont aidé à réaliser l'échantillonnage, mes plus sincères salutations.*

*Les éleveurs bovins pour leur volonté de participer et de fournir des informations sur leurs fermes et leurs animaux.*

*Le personnel de la bibliothèque, du service de post-graduation et des laboratoires de l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger.*

*Enfin, il est impossible de citer tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin, je voudrais qu'ils soient assurés de ma reconnaissance.*

*A toutes et à tous, Merci...*

## *Dédicaces*

*Au nom de Dieu le tout puissant et le très miséricordieux par la grâce duquel j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à :  
Ceux auxquels je dois ma réussite. Aux personnes les plus chères dans ce monde, à mes parents, pour leur amour, leur dévouement et leur soutien tout au long de ces longues années d'étude. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude, je ne les ai jamais assez remerciés.*

*Que Dieu me les préserve « inchallah ».*

*À mes très chers frères et sœurs.*

*À toute la famille : Menadi.*

*À tous mes amis.*

*À tous mes enseignants depuis ma scolarisation primaire.*

*À tous mes collègues de la direction des services agricoles de la wilaya de Sétif.*

## Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Table des matières	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des annexes	
Liste des abréviations	
Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Introduction générale .....	1

### **PREMIERE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **LA COXIÉLLOSE BOVINE**

1	Histoire de la fièvre Q.....	4
2	Etiologie.....	5
2.1	Taxonomie.....	5
2.2	Morphologie .....	5
2.3	Génétique.....	7
2.4	Variation de phase .....	7
2.5	Résistance et survie .....	8
2.6	Cycle de développement.....	9
3	Pouvoir immunogène .....	10
4	Pathogénie et signes cliniques .....	14
5	Epidémiologie.....	15
5.1	Reservoir et espèces affectées .....	15
5.2	Répartition géographique et fréquence de l'infection .....	16
5.3	Facteurs de risque .....	16
5.4	Mode de transmission.....	17
5.4.1	Voies d'excrétion .....	17
5.4.2	Voies de contamination.....	17
5.5	Cycle épidémiologique de la fièvre Q.....	19

6	Diagnostic .....	20
6.1	Diagnostic direct.....	20
6.1.1	Coloration.....	21
6.1.2	Culture bactériologique .....	22
6.1.3	Immunohistochimie (IHC) .....	22
6.1.4	Réaction d’amplification en chaîne par polymérase (PCR) .....	23
6.2	Diagnostic indirect.....	24
6.2.1	Fixation du complément.....	25
6.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	25
6.2.3	Test d’Immunofluorescence indirecte .....	26
6.3	Stratégies diagnostiques .....	26
6.4	Génotypage.....	27
6.4.1	Analyse de répétition en tandem polymorphe (MLVA) .....	28
6.4.2	Multispacer Sequence Typing (MST) .....	29
6.4.3	Polymorphisme d'un seul nucléotide (PSN) (single-nucleotide polymorphism).....	30
6.4.4	Micro-array ADN.....	30
6.4.5	Typage par différenciation PCR de la transposase codé sur l’IS1111 .....	30
6.4.6	Détermination de la méthode de typage la plus discriminante pour <i>Coxiella burnetii</i> .....	30
7	Prophylaxie .....	32
7.1	Prophylaxie sanitaire .....	32
7.1.1	Mesures défensives : .....	32
7.1.2	Mesures offensives : .....	32
7.2	Prophylaxie médicale .....	33
7.2.1	Vaccination.....	33
7.2.2	Antibiothérapie.....	34

## DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE EXPERIMENTALE

### ÉTUDE DE LA COXIELLOSE BOVINE DANS LA RÉGION DE SÉTIF

#### Chapitre I : Enquête épidémiologique sur la coxiellose chez les vaches de la région de Sétif au Nord-Est Algérien

1	Introduction.....	35
2	Objectifs de l’étude .....	36
3	Matériel et méthodes.....	36
3.1	Description de la région d’étude.....	36

3.1.1	Situation géographique.....	36
3.1.2	Caractères Agropédoclimatiques.....	37
3.1.2.1	Relief .....	37
3.1.2.2	Climat .....	38
3.1.3	Description du mode d'élevage bovin.....	38
3.2	Conception de l'étude.....	38
3.2.1	Étude épidémiologique de type transversale (cross-sectional study).....	38
3.2.2	Étude épidémiologique de type cas-témoin (case-control study).....	42
3.3	Échantillonnage .....	42
3.4	Questionnaire épidémiologique .....	42
3.5	Analyse des échantillons .....	43
3.5.1	Analyse sérologique .....	43
3.5.2	Analyse moléculaire.....	44
3.5.2.1	Extraction d'ADN du sang .....	44
3.5.2.1.1	Principe de kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Allemagne).....	45
3.5.2.1.2	Mode opératoire .....	45
3.5.2.1.2.1	Préparation.....	45
3.5.2.1.2.2	Extraction .....	46
3.5.2.1.2.3	Conservation.....	47
3.5.2.1.2.4	Déchets et nettoyage.....	47
3.5.2.2	Réaction en chaîne par polymérase (PCR).....	47
3.5.2.2.1	Préparation du mélange réactionnel.....	47
3.5.2.2.2	Protocole de la PCR .....	48
3.5.2.2.3	Electrophorèse sur gel d'agarose .....	48
3.5.2.2.3.1	Préparation du tampon TAE 1X.....	48
3.5.2.2.3.2	Préparation du gel d'agarose .....	48
3.5.2.2.3.3	Electrophorèse des produits d'amplification .....	49
3.5.2.2.4	Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV.....	49
3.5.2.3	Purification des produits de PCR.....	49
3.5.2.3.1	Principe de la purification des produits de PCR .....	49
3.5.2.3.2	Mode opératoire du kit de purification des produits de PCR.....	50
3.5.2.3.2.1	Préparation.....	50
3.5.2.3.2.2	Purification .....	50
3.5.2.4	Séquençage .....	51

3.5.2.5	Principe du séquençage .....	51
3.5.2.6	PCR séquence .....	51
3.5.2.7	Purification des produits de séquençage.....	52
3.5.2.7.1	Principe de purification des produits de séquençage .....	52
3.5.2.7.2	Mode opératoire de purification des produits de séquençage.....	52
3.5.2.8	Analyse des produits de séquençage .....	53
3.6	Analyses statistiques.....	53
3.6.1	Étude épidémiologique de type transversale (cross-sectional study).....	53
3.6.1.1	Prévalence et Séroprévalence .....	53
3.6.1.2	Analyse des facteurs de risque.....	53
3.6.2	Étude épidémiologique de type cas-témoin (case-control study).....	54
3.6.2.1	Odds ratio (OR) .....	54
3.6.2.2	Fraction attribuable dans la population ou fraction étiologique de risque dans la population.....	55
3.7	Considération éthique .....	55
4	Résultats.....	56
4.1	Séroprévalence de <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches de la wilaya de Sétif .....	56
4.2	Analyse des facteurs de risque potentiellement associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches dans la wilaya de Sétif. ....	59
4.3	Étude cas-témoin entre l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches et la présence de troubles de la reproduction durant l'année précédente .....	62
5	Discussion.....	66
5.1	Séroprévalence vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i> .....	66
5.2	Analyse des facteurs de risque potentiellement associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches dans la wilaya de Sétif .....	68
5.3	Étude cas-témoin entre l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches et la présence de troubles de reproduction au courant de l'année précédente.....	70
6	Conclusion .....	72

**Chapitre II : Enquête transversale sur la coxiellose bovine basée sur l'analyse sérologique et moléculaire du lait de mélange (tank) comme matrice de diagnostic dans la région de Sétif**

1	Introduction.....	73
2	Objectifs de l'étude .....	73



3	Matériel et Méthodes .....	74
3.1	Conception de l'étude .....	74
3.2	Échantillonnage .....	76
3.3	Analyses des échantillons .....	77
3.3.1	Analyse sérologique .....	77
3.3.2	Analyse moléculaire .....	77
3.3.2.1	Extraction d'ADN à partir du lait .....	77
3.3.2.1.1	Préparation .....	77
3.3.2.1.2	Extraction .....	78
3.3.2.2	Réaction en chaîne par Polymérase .....	79
3.4	Analyses statistiques .....	79
3.5	Considération éthique .....	80
4	Résultats .....	80
4.1	Prévalence de la coxiellose chez les troupeaux bovins laitiers .....	80
4.2	Concordance entre la méthode de PCR et la technique ELISA .....	83
5	Discussion .....	83
5.1	Prévalence de la coxiellose chez les troupeaux bovins laitiers de la wilaya de Sétif .....	84
5.2	Concordance entre les méthodes de diagnostic ELISA et PCR .....	86
6	Conclusion .....	86

**Chapitre III : Enquête épidémiologique sur la diversité des tiques bovines et leur taux d'infection par *Coxiella burnetii* dans la région de Sétif**

1	Introduction .....	87
2	Objectifs de l'étude .....	88
3	Matériel et Méthodes .....	88
3.1	Prélèvement des tiques .....	88
3.2	Conservation des tiques .....	90
3.3	Identification et regroupement des tiques .....	90
3.4	Analyse moléculaire .....	91
3.4.1	Extraction d'ADN des tiques .....	91
3.4.1.1	Préparation .....	91
3.4.1.2	Extraction .....	91
3.4.2	Réaction en chaîne par polymérase (PCR) .....	91
3.5	Analyses statistiques .....	92

3.6	Considération éthique .....	93
4	Résultats .....	93
4.1	Prévalence d'infestation des troupeaux bovins par les tiques dures.....	93
4.2	Diversité des tiques bovines présentes dans la wilaya de Sétif .....	95
4.3	Détermination des espèces de tiques porteuses de <i>Coxiella burnetii</i> et évaluation du taux d'infection.....	99
4.4	Prévalence des troupeaux infestés par des tiques porteuses de <i>Coxiella burnetii</i> ...	103
5	Discussion .....	103
5.1	Prévalence d'infestation des bovins par les tiques dures.....	103
5.2	Diversité de tiques récoltées chez les bovins de la wilaya de Sétif.....	104
5.3	Détermination des espèces de tiques porteuses de <i>Coxiella burnetii</i> et évaluation du taux d'infection.....	107
5.4	Prévalence des troupeaux infestés par des tiques porteuses de <i>Coxiella burnetii</i> ...	109
6	Conclusion .....	109

**Chapitre IV : Étude de la diversité génotypique de *Coxiella burnetii* infectant les bovins de la région de Sétif**

1	Introduction.....	110
2	Objectifs de l'étude .....	110
3	Matériel et méthodes : .....	111
3.1	PCR quantitative en temps réel .....	111
3.2	Génotypage par Multispacer Sequence Typing (MST) .....	111
3.2.1	Préparation du mélange réactionnel .....	113
3.2.2	Protocole de la PCR .....	113
3.2.3	Séquençage.....	114
4	Résultats .....	114
5	Discussion .....	116
6	Conclusion .....	118
	Conclusion générale.....	119

**Références bibliographiques**

**Annexes**

**Publication scientifique**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b>	Aperçu des principales techniques de génotypage publiées (Boarbi et al., 2016).....	31
<b>Tableau 2 :</b>	Distribution de vaches prélevées par troupeau et par commune.....	41-42
<b>Tableau 3 :</b>	Composition de mélange réactionnel de PCR.....	47
<b>Tableau 4 :</b>	Distribution des vaches séropositives vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i> par troupeau et par commune.....	58-59
<b>Tableau 5 :</b>	Analyse univariable des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches dans la wilaya de Sétif....	60-61
<b>Tableau 6 :</b>	Analyse de régression logistique multivariable des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches dans la wilaya de Sétif.....	61
<b>Tableau 7 :</b>	Association entre l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches et la présence des antécédents d'avortement et/ou de mortalité néonatale et/ou d'infertilité durant l'année précédente.....	65
<b>Tableau 8 :</b>	Distribution des troupeaux échantillonnés par commune.....	76
<b>Tableau 9 :</b>	Distribution des troupeaux positifs vis-à-vis de <i>Coxiella burnetii</i> en utilisant le lait bovin de tank comme matrice de diagnostic par commune.....	82
<b>Tableau 10 :</b>	Concordance entre les méthodes ELISA et PCR pour la détection de l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> sur du lait bovin de tank.....	83
<b>Tableau 11 :</b>	Répartition des troupeaux échantillonnés en fonction de la commune...	90
<b>Tableau 12 :</b>	Répartition géographique des troupeaux infestés par les tiques dures en fonction de la commune.....	94
<b>Tableau 13 :</b>	Répartition des espèces de tiques collectées chez les bovins dans la wilaya de Sétif en fonction de leur stade de développement, leur sexe et leur statut de gorgement.....	98
<b>Tableau 14 :</b>	Taux d'infection des tiques bovines par <i>Coxiella burnetii</i> .....	101
<b>Tableau 15 :</b>	Répartition des espèces de tiques porteuse de <i>Coxiella burnetii</i> dans la wilaya de Sétif en fonction de leur stade de développement, leur sexe et leur statut de gorgement. ....	102
<b>Tableau 16 :</b>	Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage des	

	espaceurs intergéniques du génome de <i>Coxiella burnetii</i> (Glazunova et.,2005 ; Di Domenico et al., 2014).....	112
<b>Tableau 17 :</b>	Composition du mélange réactionnel de la PCR.....	113
<b>Tableau 18 :</b>	Résultats de la quantification par qPCR et du génotypage par MST de l'ADN de <i>Coxiella burnetii</i> chez les bovins de la région de Sétif.....	115

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Images obtenues par microscopie électronique. (a) cellules SCV (Small Cell Variant) avec chromatine condensée; (b) cellules LCV (Large Cell Variant) avec chromatine dispersée; (c) Cellules LCV avec cellules SLP (Spore-Like Particle). Les cellules SLP ou SDC (small dense cell) sont marquées par des flèches. (Heinzen et al., 1999).....	06
<b>Figure 2 :</b>	Cycle de développement de <i>Coxiella burnetii</i> selon Mboussou (2017)....	10
<b>Figure 3 :</b>	Pathogénèse de l'infection du à <i>Coxiella burnetii</i> (Delaloye et Greub, 2013).....	11
<b>Figure 4 :</b>	Cycle épidémiologique de la fièvre Q (Centre national de référence Rickettsies, Marseille).....	20
<b>Figure 5 :</b>	Coloration de la <i>Coxiella burnetii</i> (Yohannes et Mekonen, 2018).....	21
<b>Figure 6 :</b>	Exemple de variation du nombre de répétitions en tandem VNTR dans plusieurs loci de deux souches différentes (Sobral et al., 2012).....	28
<b>Figure 7 :</b>	Localisation géographique de la wilaya de Sétif.....	36
<b>Figure 8 :</b>	Relief de la wilaya de Sétif.....	37
<b>Figure 9 :</b>	Carte de la région de Sétif au Nord-Est de l'Algérie, illustrant les communes (zone grise) où des échantillons de sang ont été prélevés pour la détection de l'infection à <i>Coxiella burnetii</i> chez les vaches.....	40
<b>Figure 10 :</b>	Les étapes de l'extraction d'ADN.....	45
<b>Figure 11 :</b>	Principe de purification de l'ADN.....	50
<b>Figure 12 :</b>	Carte de la région de Sétif au Nord-Est de l'Algérie, illustrant les communes qui contiennent des troupeaux séropositifs (zone bleu).....	57
<b>Figure 13 :</b>	Variation de la séroprévalence de <i>Coxiella burnetii</i> en fonction de la présence ou de l'absence de contact avec d'autre troupeau (A), de l'origine de la vache (B) et de l'utilisation ou non de désinfectants (C)...	62
<b>Figure 14 :</b>	Photographie de la migration sur gel d'agarose d'un fragment de l'élément d'insertion du <i>Coxiella burnetii</i> (IS1111) d'une taille de 154 pb (B) issue d'un échantillon du sang total. Le marqueur d'ADN (A), le contrôle positif (C) et le contrôle négatif (D).....	63
<b>Figure 15 :</b>	Séquence nucléotidique obtenu d'un fragment de gène IS1111 de <i>Coxiella burnetii</i> amplifié à partir du sang total provenant de vaches laitières de la wilaya de Sétif.....	63

---

<b>Figure 16 :</b>	Prévalence de <i>Coxiella burnetii</i> chez les vache infertiles, ayant avorté, et celles produisant des mort-nés.....	64
<b>Figure 17 :</b>	Carte de la région de Sétif illustrant les communes (zone grise) où des échantillons du lait de tank ont été collectés pour la détection de l'infection par <i>Coxiella burnetii</i> chez les troupeaux bovins laitiers.....	75
<b>Figure 18 :</b>	Photographie du résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'IS1111 issus des échantillons de lait de mélange (B). (Marqueur d'ADN (A), contrôle positif (C) et contrôle négatif (D)).....	80
<b>Figure 19 :</b>	Carte de la région de Sétif au Nord-Est de l'Algérie, illustrant les communes qui contiennent des troupeaux positifs.....	81
<b>Figure 20 :</b>	Carte de la région de Sétif, reprenant les communes (zone grise) échantillonnées pour la collecte de tiques sur des troupeaux bovins.....	89
<b>Figure 21 :</b>	Carte de la région de Sétif illustrant les communes qui renferment des troupeaux infestés.....	94
<b>Figure 22 :</b>	Fréquence des espèces de tiques infestant les bovins de la région de Sétif.....	96
<b>Figure 23 :</b>	Diversité des tiques bovines dans la wilaya de Sétif.....	97
<b>Figure 24 :</b>	Photographie du résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments de la séquence d'insertion IS1111 issue des échantillons de tiques collectées chez les bovins de la wilaya de Sétif (B) (marqueur d'ADN (A), contrôle positif (C) et contrôle négatif (D)).....	99
<b>Figure 25 :</b>	Photographie du résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du gène codant la protéine SOD de <i>Coxiella burnetii</i> provenant des échantillons de tiques (B). (marqueur d'ADN (A), contrôle positif (C) et contrôle négatif (D)).....	100

## Liste des annexes

- Annexe 1 :** Matériel utilisé lors de l'échantillonnage.
- Annexe 2 :** Matériel utilisé dans les tests sérologiques ELISA.
- Annexe 3 :** Matériels, équipements, consommables et réactifs des tests moléculaires.
- Annexe 4 :** ID Screen Q Fever Indirect Multi-species Kit (ID.vet Innovative Diagnostics, Grabels, France).
- Annexe 5 :** PrioCHECK<sup>TM</sup> Ruminant QFever Ab Plate Kit (LSI, Lissieu, France).
- Annexe 6 :** kit de PCR en temps réel (Applied Biosystems<sup>TM</sup> VetMAX<sup>TM</sup> *Coxiella burnetii* Absolute Quant Kit, Qiagen, Allemagne).

## Liste des abréviations

<b>A:</b>	Adénosine
<b>ADN :</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ARN :</b>	acide ribonucléique
<b>ARNr 16s :</b>	acide ribonucléique ribosomique de la petite sous-unité 16S.
<b>B :</b>	coefficient de régression logistique
<b>BLA :</b>	bovin laitier amélioré
<b>BLAST :</b>	Basic Local Alignment Search Tools
<b>BLL :</b>	bovin laitier local
<b>BLM :</b>	bovin laitier moderne
<b>°C :</b>	<i>Degré Celsius</i>
<b><i>C. burnetii</i> :</b>	<i>Coxiella burnetii</i>
<b>C3b :</b>	fraction C3b du complément
<b>CbMip :</b>	<i>Coxiella burnetii</i> macrophage infectivity potentiator
<b>com1 :</b>	<i>Coxiella</i> outer membrane protein 1
<b>CR3 :</b>	récepteur du complément de type 3.
<b>Ct :</b>	cycle seuil
<b>ddl :</b>	degrés de liberté
<b>ddNTP :</b>	didéoxynucléotide
<b>dNTP:</b>	déoxynucléotide
<b>DO :</b>	densité optique
<b>DSAWS :</b>	Direction des services agricoles de la willaya de Sétif
<b>EDTA :</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EFSA :</b>	Autorité européenne de sécurité des aliments
<b>ELISA :</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>EMV :</b>	estimateur du maximum de vraisemblance
<b>ES :</b>	écart type
<b>g :</b>	gramme
<b>h :</b>	heure
<b>H2O2 :</b>	Peroxyde d'hydrogène
<b><i>Hae. punctata</i> :</b>	<i>Haemaphysalis punctate</i>
<b>HGDI :</b>	index de diversité de Hunter et Gaston
<b><i>Hy. detritum detritum</i> :</b>	<i>Hyalomma detritum detritum</i>



<b><i>Hy. lusitanicum</i></b> :	<i>Hyalomma lusitanicum</i>
<b><i>Hy. marginatum</i></b> :	<i>Hyalomma marginatum</i>
<b>IC</b> :	intervalle de confiance
<b>icd</b> :	isocitrate déshydrogénase
<b>IFI</b> :	Immunofluorescence indirecte
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> :	Interferon gamma
<b>Ig</b> :	immunoglobulines
<b>IHC</b> :	immunohistochimique
<b>IL</b> :	interleukine
<b>IS1111</b> :	séquence d'insertion
<b>K</b> :	Coefficient Kappa de cohen
<b>Kb</b> :	kilobase
<b>kDa</b> :	kilodalton
<b>Km</b> :	Kilomètre
<b>Km<sup>2</sup></b> :	Kilomètre carré
<b>LCV</b> :	large-cell variant
<b>LPS</b> :	lipopolysachharide (LPS).
<b>LTH1</b> :	lymphocyte auxiliaire de la réponse immune cellulaire
<b>LTH2</b> :	lymphocyte auxiliaire de la réponse immune humorale
<b>m</b> :	mètre
<b>Mb</b> :	Mégabase
<b>ml</b> :	millilitre
<b>MLVA</b> :	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
<b>mm</b> :	millimètre
<b>min</b> :	minute
<b>MST</b> :	Multispacer Sequence Typing
<b>nm</b> :	nanomètre
<b>No.</b> :	nombre
<b>NCBI</b> :	National Center for Biotechnology Information
<b>OIE</b> :	office international des épizooties
<b>OR</b> :	odds ratio
<b>ORF</b> :	open reading frame
<b>PAF</b> :	fraction attribuable dans la population

<b>pb :</b>	paire de bases
<b>PBS :</b>	Phosphate-Buffered Saline
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PFGE :</b>	Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>Ph :</b>	Potentiel hydrogène
<b>Pmol :</b>	picomole
<b>qPCR :</b>	PCR quantitative en temps réel
<b>RAPD :</b>	random amplified polymorphic DNA
<b>RFLP :</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b><i>Rh. annulatus</i> :</b>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i>
<b><i>Rh. bursa</i> :</b>	<i>Rhipicephalus bursa</i>
<b><i>Rh. sanguineus s.l.</i> :</b>	<i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i>
<b>S :</b>	seconde
<b>SCV :</b>	small cell variant
<b>SDC :</b>	small dense cell
<b>SDS :</b>	Dodécylsulfate de Sodium
<b>SDS-PAGE :</b>	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>SLP :</b>	Spore-Like Particle
<b>SNP :</b>	Single-Nucleotid Polymoprphism
<b>SOD :</b>	superoxydase dismutase
<b>T/min :</b>	tour par minutes
<b>TAE :</b>	Tris-Acetate EDTA
<b>TFC :</b>	test de fixation du complément
<b>TLR :</b>	récepteurs Toll-like
<b>TMB :</b>	Tétraméthylbenzidine
<b>TNF :</b>	facteur de nécrose tumorale (tumor necrosis factor).
<b>Treg :</b>	lymphocyte T régulateur
<b>µm :</b>	micromètre
<b>UP :</b>	ultra pure
<b>UV :</b>	ultraviolet
<b>VNTRs :</b>	Variable Number of Tandem Repeat
<b>x g :</b>	gradient de gravité
<b>χ<sup>2</sup> :</b>	valeur du Khi-deux de Pearson

# RÉSUMÉ

## Résumé

L'épidémiologie de l'infection par *Coxiella burnetii* chez les bovins demeure inconnue en Algérie. Dans ce contexte, nous avons réalisé dans un premier temps une étude transversale dans la wilaya de Sétif entre mars 2016 et avril 2018 pour déterminer la séroprévalence et les facteurs de risque associés à cette infection chez les bovins. Au total, 678 vaches appartenant à 90 troupeaux ont été sélectionnées de façon aléatoire, et leurs sérums ont été testés pour détecter les anticorps dirigés contre *C. burnetii* à l'aide de la technique ELISA indirect. Cette étude a montré une séroprévalence individuelle de 11.36 % (77/678) et au sein du troupeau de 45.56 % (41/90). L'analyse de régression logistique multivariée a identifié certains facteurs de risque tels le contact avec d'autres troupeaux (Odds ratio (OR): 1.95) et l'acquisition de nouvelles vaches (OR: 2.05). Cependant, l'utilisation de désinfectants a été identifiée comme facteur protecteur (OR: 0.32). Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à une étude de type cas-témoin pour vérifier si *C. burnetii* était impliquée dans la survenue d'avortements, d'infertilité et de mortalité néonatale chez les vaches. Pour cela, 186 échantillons de sang total issus de vaches ayant eu des troubles de la reproduction ont été testés par PCR conventionnelle pour détecter *C. burnetii*. Cette étude a mis en évidence un exposé rate de 6.98 % (13/186), avec une association significative entre l'infection des vaches par *C. burnetii* et la présence d'antécédent d'infertilité ( $p=0.006$ , OR=5.62).

Par ailleurs, une enquête transversale basée sur l'analyse d'échantillons de lait de mélange de 200 troupeaux de vaches laitières a été effectuée par les techniques ELISA et PCR. Celle-ci a montré que 37 % (74/200) et 9 % (18/200) des échantillons de lait se sont montrés positifs respectivement. En se basant sur le coefficient kappa de Cohen, une très faible concordance a été observée entre les résultats de la technique ELISA et de la méthode PCR ( $k = 0.0849$ ).

L'enquête épidémiologique portant sur la diversité de tiques bovines et de leur infection par *C. burnetii* a permis de montrer un taux d'infestation par les tiques de 8.25 % (222/2508) au niveau individuel et de 22.80 % (52/228) au niveau du troupeau. Sur un effectif total de 712 tiques prélevées, 7 espèces ont été identifiées, avec une prédominance de *Rh. bursa* (37.92 %), *Hy. marginatum* (29.91 %) et *Hy. detritum detritum* (26.40 %), et une très faible fréquence de *Hy. lusitanicum* (3.93 %), *Rh. Sanguineus s.l.* (1.26 %), *Rh. annulatus* (0.28 %) et *Hae. punctata* (0.28 %). L'analyse moléculaire a montré que 14 des 159 pools de tiques étaient positifs par PCR amplifiant le gène IS1111 et SOD de *C. burnetii* (EMV=2.05 %), dont 7 pools de *Rh. bursa* (EMV=2.71 %), 4 de *Hy. detritum detritum* (EMV=2.23 %) et 3 *Hy. marginatum* (EMV=1.46 %).

Enfin, une dernière étude sur la diversité génotypique de *C. burnetti* infectant les bovins de la région de Sétif a été réalisée. Tous les échantillons positifs par PCR conventionnelle ont été analysés par PCR quantitative en temps réel (qPCR). Tous les échantillons très concentrés en ADN de *C. burnetii* (Ct <35) ont été sélectionnés pour génotypage par la méthode de Multispacer Sequence Typing (MST). Le génotype MST32 et un nouveau génotype MST (profil partiel) ont été identifiés dans les échantillons de sang total et le génotype MST12 dans les échantillons de lait de tank.

En conclusion, les résultats obtenus ont permis de mieux comprendre l'épidémiologie de la coxiellose bovine dans la région de Sétif et d'élaborer des programmes de surveillance et de prévention contre cette maladie.

**Mots clés :** bovins, sérum, sang total, tiques, ELISA, PCR, génotypage, MST, *Coxiella burnetii*, prévalence, Sétif.

## Abstract

The Epidemiology of Coxiellosis in cattle remains unknown in Algeria. In this context, we first carried out a cross-sectional study in the state of Setif between March 2016 and April 2018 to determine the seroprevalence and risk factors associated with *Coxiella burnetii* infection in cattle. A total of 678 cows from 90 herds were randomly selected, and their sera were tested for antibodies against *C. burnetii* using the indirect ELISA technique. This study showed an individual seroprevalence of 11.36% (77/678) and herd seroprevalence of 45.56% (41/90). The multivariable logistic regression analysis was identified some risk factors such as contact with other herds (OR: 1.95) and acquisition of new cows (OR: 2.05). However, the use of disinfectants was identified as a protective factor (OR: 0.32). In a second time, we are interested in case-control study to check if *C. burnetii* was involved in the occurrence of abortions, infertility, and neonatal mortality in cows. To do this, 186 whole blood samples of cows from farms with these disorders were analyzed by molecular tools to detect *C. burnetii*. This study revealed an overall prevalence of 6.98% (13/186), with a significant association between cow infection with *C. burnetii* and the presence of a history of infertility ( $p = 0.006$ , OR = 5.62).

In addition, a cross-sectional survey based on analysis of bulk milk tank samples from 200 dairy cattle herds was carried out using ELISA and PCR techniques. This showed that 37% (74/200) and 9% (18/200) of the milk samples were positive respectively. Based on Cohen's kappa coefficient, a very low agreement between the ELISA and PCR results was found ( $k = 0.0849$ ).

The epidemiological survey on the diversity of bovine ticks and their infection with *C. burnetii* showed a tick infestation rate of 8.25% (222/2508) at the individual level and 22.80% (52/228) at the herd level. Out of a total of 712 ticks collected, 7 species were identified with a predominance of *Rh. Bursa* (37.92%), *Hy. marginatum* (29.91%) and *Hy. detritum detritum* (26.40%), and a very low frequency of *Hy. lusitanicum* (3.93%), *Rh Sanguineus s.l.* (1.26%), *Rh. annulatus* (0.28%) and *Hae. punctata* (0.28%). Molecular analysis showed that 14 of the 159 tick pools were positive by PCR amplifying the IS1111 and SOD gene of *C. burnetii* (EMV = 2.05%), including 7 *Rh. Bursa* pools (EMV = 2.71%), 4 of *Hy. detritum detritum* (EMV = 2.23%) and 3 of *Hy. marginatum* (EMV = 1.46%).

Finally, a last study on the genotypic diversity of *C. burnetii* infecting cattle from the Sétif region was carried out. All positive samples by conventional PCR were analyzed by real-time

quantitative PCR (qPCR). All samples highly concentrated in *C. burnetii* DNA (Ct <35) were selected for genotyping by the Multispacer Sequence Typing (MST) method. The MST32 genotype and a new MST genotype (partial profile) were identified in whole blood samples and the MST12 genotype in tank milk samples.

In conclusion, the results obtained have allowed to better understand the epidemiology of bovine coxiellosis in the region of Setif and to develop surveillance and prevention programs against this disease.

**Key words:** cattle, serum, whole blood, ticks, ELISA, PCR, genotyping, MST, *Coxiella burnetii*, prevalence, Setif

## ملخص

الدراسة الوبائية للحمى المجهولة او الحمى (Q) عند الأبقار لا تزال مجهولة في الجزائر. في هذا السياق، أجرينا أولاً دراسة مقطعية مصلية في ولاية سطيف ما بين مارس 2016 وأبريل 2018 لتحديد الانتشار المصلي تجاه كوكسيلا بيرنتي (*Coxiella burnetii*) عند الأبقار وعوامل الخطر المرتبطة بها. حيث تم اختيار ما مجموعه 678 بقرة تنتمي الى 90 قطيع بشكل عشوائي، و اختبار أمصالهم باستخدام تقنية ELISA غير مباشرة من اجل البحث عن الأجسام المضادة الخاصة بكوكسيلا بيرنتي. أظهرت هذه الدراسة أن نسبة انتشار مرض الحمى المجهولة لدى الأبقار على مستوى الفردي بـ 11.36% (678/77) و على مستوى القطيع بـ 45.56% (90/41). حدد تحليل الانحدار اللوجستي متعدد المتغيرات الاتصال مع قطعان أخرى (نسبة الأرجحية: 1.95) وشراء بقرات جديدة (نسبة الأرجحية: 2.05) كعوامل خطر مرتبطة بالإيجابية المصلية تجاه كوكسيلا بيرنتي، في حين تم تحديد استخدام المطهرات (نسبة الأرجحية: 0.32) على أنها عامل وقاية. بعد ذلك، قمنا بدراسة حالة-شاهد لمعرفة اذا ما كانت كوكسيلا بيرنتي متسببة في حدوث حالات الإجهاض وعدم الاخصاب ونفوق المواليد الجدد عند الأبقار. للقيام بذلك، تم تحليل 186 عينة دم كاملة من الأبقار من المزارع التي تعاني من هذه الاضطرابات بواسطة الأدوات الجزيئية. وقد اظهرت هذه الدراسة نسبة انتشار تقدر بـ 6.98% (186/13) مع وجود ارتباط وثيق بين إصابة الأبقار بهذا الفيروس و عدم الإخصاب (نسبة الأرجحية: 5.62 ،  $p=0.006$ ).

إضافة إلى ذلك، تم إجراء مسح مقطعي يعتمد على تحليل مزيج عينات الحليب من 200 قطيع من الأبقار المدرة للحليب بواسطة تقنيات ELISA و PCR. أظهرت النتائج أن 37% (200/74) و 9% (18/200) من عينات الحليب كانت إيجابية على التوالي. وفقاً لمعامل كوهين كبا تم العثور على اتفاق ضعيف للغاية بين نتائج تقنيات ELISA و PCR (ك = 0.0849).

التحقيق الوبائي حول تنوع قراد أبقار واصابتها بكوكسيلا بيرنتي بين نسبة الإصابة بالقراد بـ 8.25% (2508/222) على المستوى الفردي و 22.80% (228/52) على مستوى القطيع. من بين إجمالي 712 قراد تم جمعها، تم التعرف على 7 أنواع مع غلبة (*Rh.bursa* 37.92%) ، (*Hy. marginatum* 29.91%) و (*Hy. detritum detritum* 26.40%) ، ونسب منخفضة للغاية لـ (*Hy. lusitanicum* 3.93%) ، (*Rh Sanguineus s.l.* 1.26%) ، (*Rh. annulatus* 0.28%) و (*Hae. punctata* 0.28%). أظهر التحليل الجزيئي أن 14 من 159 مجموعة قراد كانت إيجابية بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR الذي يستهدف الجينات IS1111 و SOD لكوكسيلا بيرنتي بنسبة إجمالية تحسب بأقصى تقدير احتمال يساوي (EMV=2.05%)، منها 7 (*Rh. Bursa* 2.71=EMV%) ، و 4 (*Hy. detritum detritum* 2.23=EMV%) و 3 (*Hy. marginatum* 1.46=EMV%).

وأخيراً ، تم إجراء دراسة حول التنوع الوراثي لكوكسيلا بيرنتي التي تصيب الأبقار في منطقة سطيف. جميع العينات الإيجابية بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل التقليدي (PCR) تم تحليلها بتفاعل البوليميراز المتسلسل بالزمن الحقيقي (qPCR). جميع العينات المركزة بدرجة عالية للحمض النووي الخاص بكوكسيلا بيرنتي ( $Ct < 35$ ) تم إختيارها من أجل التتميط الجيني بواسطة طريقة Multispacer Sequence Typing (MST). تم تحديد النمط الجيني MST32 ونمط جيني جديد MST (نمط جزئي) في عينات الدم الكامل والنمط الجيني MST12 في عينات حليب الخزان.

في الختام ، النتائج المتحصل عليها سمحت بفهم أحسن للحمى المجهولة (Q) عند الأبقار في منطقة سطيف من الناحية الوبائية وبتطوير برامج المراقبة والوقاية ضد هذا المرض.

**الكلمات المفتاحية:** أبقار ، مصل ، دم كامل ، قراد ، ELISA ، PCR ، تنميط جيني ، MST ، كوكسيلا بيرنتي ، إنتشار ، سطيف



# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## Introduction générale

La fièvre Q chez l'homme ou coxiellose chez les animaux est une zoonose cosmopolite, qui épargne cependant la Nouvelle-Zélande à l'heure actuelle. L'agent causal est une bactérie intracellulaire nommée *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*). Elle est capable d'infecter de nombreuses espèces d'animaux sauvages ou domestiques, ainsi que l'homme (Parker et al., 2006). Les ruminants domestiques sont les réservoirs principaux pour la transmission de la fièvre Q à l'homme (Woldehiwet et al., 2004). En effet, Cette bactérie est très résistante à la chaleur et au séchage et peut survivre pendant des mois dans l'environnement. Elle est également très infectieuse, un à dix organismes peuvent causer la «fièvre Q» chez l'homme (Maurin et Raoult, 1999).

Sur le plan clinique, l'infection est généralement asymptomatique chez les ruminants. Cependant, elle peut se manifester par des troubles de la reproduction, l'avortement, la mortinatalité, la naissance prématurée et la naissance de nouveaux-nés faibles chez les petits ruminants, et par l'infertilité, la métrite, la mammite et occasionnellement des cas d'avortement chez les bovins (Agerholm, 2013; Porter et al., 2011). En effet, *C. burnetii* serait responsable de 1 à 3 pour cent des avortements bovins (Woldehiwet et al., 2004). Chez l'homme, la fièvre Q peut être asymptomatique ; sous forme aiguë évoquant une forte grippe s'accompagnant d'une fièvre élevée, de frissons de transpiration, une pneumonie et une hépatite, ou évoluer parfois vers une forme chronique avec séquelles à long terme, notamment la fatigue, l'avortement et la cardiopathie dont l'issue peut être fatale en l'absence de traitement adéquat (Vanderburg et al. 2014; Wielders et al. 2014).

Les humains et les animaux contractent l'infection en inhalant des particules infectieuses transportées dans l'aérosol et des poussières contaminées générées à partir d'excréments des animaux infectés tel le liquide amniotique et le placenta lors de l'avortement ou la parturition, mais aussi dans l'urine, les selles, les sécrétions vaginales et le lait (Porter et al., 2011 ; Van Den Brom et al., 2012). Cependant, leur transmission orale et vectorielle par les tiques ont été décrites chez les animaux alors qu'elles restent controversées chez l'homme (Toledo et al., 2009; Pexara et al., 2018; Eldin et al., 2017).

En Algérie, la fièvre Q fait son apparition pour la première fois à Alger en 1948 par Portier (Portier et al., 1948). Des foyers ont été signalés dans l'armée française en 1955 à Batna (Pierrou et al., 1956) et en 1958 à Tlemcen (Rey et al., 2000) qui étaient liés au contact avec de petits ruminants. Des études sérologiques antérieures ont montré une séroprévalence de 15

% chez des ouvriers d'abattoir d'Alger, 20 % chez des enfants de moins de 16 ans dans la région du Hoggar (Dumas, 1984), 15.5 % et 14.19 % chez les habitants de Sétif et d'Aurès respectivement (Lacheheb et Raoult, 2009). Benslimani et al. (2005) ont montré que 2 parmi les 61 patients algériens atteints d'endocardite infectieuse sont séropositifs par le test de micro-immunofluorescence, alors que l'analyse par PCR des valvules cardiaques de ces mêmes patients s'est avérée négative (Benslimani et al., 2005). Angelakis et al. (2014) ont détecté *C. burnetii* chez un des 268 patients fébriles testés par PCR à Oran (0,3 %) (Angelakis et al., 2014). Une enquête récente de type cas-témoin menée sur 725 femmes dont 380 femmes ayant subi un avortement spontané fébrile (cas) et 345 femmes qui ont accouché sans autres infections ou complications (témoins) dans deux hôpitaux à Alger a révélé la présence d'anticorps anti-*C. burnetii* chez 3 patients et de l'ADN de *C. burnetii* dans quatre (04) échantillons de placenta provenant du groupe cas (Ghaoui et al., 2018). Chez les animaux, peu d'études sur la séroprévalence de la coxiellose ont été réalisées chez les petits ruminants (Khaled et al., 2016; Rahal et al., 2011; Yahiaoui et al., 2013), les bovins (Dechicha et al., 2010 ; Abdelhadi et al., 2015 ; Derdour et al., 2017 ; Agag et al., 2017; Djellata et al., 2019) et les camelins (Benaissa et al., 2017). L'ADN de *C. burnetii* a été détecté récemment dans des écouvillons vaginaux provenant des petits ruminants (Khaled et al., 2016), chez des rates de chien et de chat à Alger (Bessas et al., 2016), chez des tiques de chauve-souris à Souk Ahras (Leulmi et al., 2016), chez des tiques récoltées sur des ovins, sur du sang d'origine ovin et caprin à Souk Ahras (Aouadi et al., 2017), chez des tiques collectées sur des bovins et des ovins au Nord-Ouest de l'Algérie (Abdelkadir et al., 2019), chez des tiques prélevées chez les dromadaires au Sud-Est Algérien (Bellabidi et al., 2020) et enfin, à partir de placentas issus de vaches ayant avorté au centre du pays (Rahal et al., 2018). Toutefois, La connaissance de sa réelle prévalence chez les animaux et l'humain ainsi que son impact économique et sanitaire dans notre pays reste inconnue.

Au cours de la dernière décennie, nos connaissances sur la fièvre Q ont augmenté, mais l'incertitude considérable et persistante autour de cette infection appelle de nouvelles recherches. L'avis scientifique de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) sur la fièvre Q (2010) a souligné plusieurs points à clarifier lors de nouvelles enquêtes concernant les méthodes de diagnostic, les facteurs influant sur le maintien de l'infection et les caractéristiques de la bactérie. En outre, la plus grande épidémie de fièvre Q survenue aux Pays-Bas entre 2007 et 2010 qui a affecté une large population de caprins et plus de 4000 humains (Schneeberger *et al.* 2014) et celle qui a sévit en Pologne en 1982 chez les bovins et

environ 1300 humains (Bielawska-Drózd, 2013) rappellent l'importance qu'occupe la connaissance de l'épidémiologie de la coxiellose afin d'intervenir adéquatement sur celle-ci ainsi que d'en prévenir et d'en limiter les conséquences liées à la santé animale et publique.

Ce travail comportera deux grandes parties.

Une première, bibliographique, qui sera consacrée à l'étude bactériologique, immunologique, et pathogénique de *C. burnetii*, les caractéristiques cliniques et épidémiologiques ainsi que les outils diagnostiques et les différentes méthodes de prophylaxie sanitaire et médicale qui existent actuellement.

Une deuxième partie expérimentale dans laquelle nous examinerons les quatre chapitres suivants :

- I. Enquête épidémiologique sur la coxiellose chez les vaches de la région de Sétif au Nord-Est Algérien.
- II. Enquête transversale sur la coxiellose bovine basée sur l'analyse sérologique et moléculaire du lait de mélange (tank) comme matrice de diagnostic dans la région de Sétif.
- III. Enquête épidémiologique sur la diversité des tiques bovines et leur taux d'infection par *Coxiella burnetii* dans la région de Sétif.
- IV. Étude de la diversité génotypique de *Coxiella burnetii* infectant les bovins de la région de Sétif.

**PREMIERE PARTIE :**  
**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE : LA COXIELLOSE BOVINE

### 1 Histoire de la fièvre Q

En 1935, la fièvre Q a été décrite pour la première fois par le docteur Edward Derrick après la survenue d'épisodes fébriles chez des travailleurs d'abattoirs dans la ville de Brisbane, au Queensland en Australie. Il a inoculé le sang et l'urine de patients à des cobayes, ce qui a provoqué l'apparition de la fièvre chez ces animaux. Cependant, il n'arrive pas à isoler l'agent causal, et décrit pour la première fois la maladie, qu'il prénomme fièvre Q pour « Query fever », soit la fièvre qui pose question (Derrick, 1937, 1983). Il croit qu'il s'agit d'un virus et envoie des échantillons contaminés au virologue Fred MacFarlane Burnet de *Walter and Eliza Hall Institute*, Melbourne, Australie (Derrick, 1971, 1983). En 1937, accompagné du docteur Mavis Freeman, ils ont infecté des animaux de laboratoire, et ont utilisé des techniques de coloration pour identifier de micro-organismes semblables à des rickettsies (Burnet et Freeman, 1937). En 1939, Derrick et ses collaborateurs finiront par l'appeler à tort *Rickettsia burnetii* en hommage à leur collègue Fred MacFarlane Burnet (Derrick, 1983).

Au cours de la même période, Gordon Davis travaille sur d'éventuels vecteurs de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses au Rocky Mountain Laboratory, dans le Montana, aux Etats-Unis. Il a observé une maladie fébrile chez certains cochons d'inde mordus par des tiques de *Dermacentor andersoni* collectées près de la crique du bassin Nine Mile. Cependant, les symptômes cliniques ne ressemblent pas à ceux de la fièvre pourprée (Davis et al., 1938). En 1936, Herald Rea Cox rejoint l'équipe de Davis, et ils démontrent ensemble que ce germe possède à la fois des caractéristiques de virus et de rickettsies. Cox réussit à cultiver l'agent en cause dans des œufs embryonnés (Davis et al., 1938) et il décide de le nommer *Rickettsia diaporica* (Cox et Bell, 1939) en raison de sa filtrabilité (Cox et al., 1947).

En 1938, le docteur Rolla Dyer, directeur de l'Institut National de Santé, rendit visite au docteur Cox dans le Montana pour tester la possibilité de cultiver *Rickettsia diaporica* dans des œufs (Wentworth, 1955). Il se contamine accidentellement et il tombe malade avec des douleurs rétro-orbitaires, de la fièvre, des frissons et des sueurs dix jours plus tard. L'injection de son sang à des cobayes les rendit fébriles (Marrie, 1990). Cet incident interpelle Dyer qui avait déjà eu connaissance des études australiennes sur *Rickettsia burnetii*. Il demande alors à Macfarlane Burnett de lui envoyer des échantillons de rates d'animaux infectés par l'agent de la fièvre Q. Une immunité croisée a été trouvée entre les agents isolés de son sang, les cobayes infectés par son sang, et ceux infectés par l'agent de la fièvre Q, ce qui confirme son

hypothèse. *Rickettsia burnetii* et *Rickettsia diaporica* sont en fait le même agent étiologique de la fièvre Q (Mboussou, 2017).

En 1948, Cornelius B. Philips, du Rocky Mountain Laboratory, propose la création du genre *Coxiella* suite à la mise en évidence des différences importantes entre cette bactérie et les autres appartenant au genre rickettsie. En hommage à Macfarlane Burnett et à Herald Cox, il décide d'appeler l'agent infectieux de la fièvre Q *Coxiella burnetii* (Philip, 1948 ; Mboussou, 2017).

Historiquement, l'infection par *C. burnetii* a eu plusieurs noms en fonction des découvertes entourant cette bactérie, y compris fièvre Q, fièvre des abattoirs, fièvre de Queensland, *Nine mile creek fever*, grippe des Balkans, maladie de Derrick-Burnet, coxiellose, et quelques autres.

## 2 Etiologie

### 2.1 Taxonomie

*Coxiella burnetii* a été initialement classé dans l'ordre des rickettsies en raison des similitudes qu'il partageait avec les bactéries du genre *Rickettsia* : bactérie à Gram négatif, de très petite taille dans le monde bactérien, intracellulaire, non cultivable sur milieu axénique et pouvant être véhiculée par les tiques. La bactérie a été reclassifiée grâce aux études phylogénétiques fondées sur la séquence de l'acide ribonucléique (ARN) ribosomal 16S dans la subdivision gamma des protéobactéries avec les genres *Legionella*, *Francisella*, et *Rickettsiella* qui sont ses parents les plus proches (Stein et Raoult, 1993; Maurin et Raoult, 1999 ). Sa classification actuelle est donc la suivante : Phylum des *Proteobacteria*, Classe des *Gammaproteobacteria*, Ordre des *Legionellales*, Famille des *Coxiellaceae*, et Genre *Coxiella* (Arricau-Bouvery and Rodolakis, 2005). En plus de *C. burnetii*, le genre *Coxiella* comprend d'autres membres à savoir *Coxiella cheraxi*, un pathogène retrouvé chez une écrevisse d'eau douce, la *Cherax quadricarinatus*, en Australie (Cooper et al., 2007). Plusieurs organismes présentent une homologie avec *C. burnetii*, les *Coxiella-like*, ont cependant été décrits dans la littérature (van Schaik et Samuel, 2012).

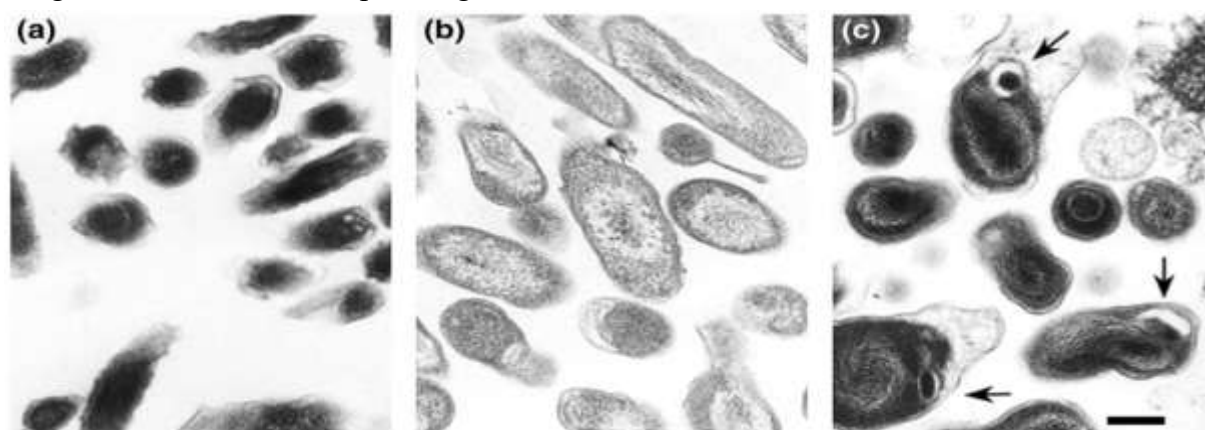
### 2.2 Morphologie

*Coxiella burnetii* est un petit coccobacille (0.2–0.4 µm de largeur, 0.4–1.0 µm de longueur), immobile, pléomorphe, intracellulaire, avec une paroi similaire à celle d'une bactérie à Gram négatif. Bien que sa membrane ne soit pas reconnaissable comme telle par la coloration de gram. Le germe peut se présenter sous trois formes morphologiques aux propriétés

différentes : une forme à grande cellule (large-cell variant), une forme à petite cellule (small cell variant) et SDC (small dense cell) qui correspondent aux stades de développement différents de *C. burnetii* (McCaul et Williams, 1981).

La forme SCV ("small cell variant") est représentée par de petits bacilles de 0.2 à 0.5  $\mu\text{m}$ , denses et compacts à paroi épaisse au microscope électronique. Elle peut être extra ou intracellulaire. Caractérisée par une faible activité métabolique, un faible taux de réplication et une stabilité dans l'environnement et dans le milieu extracellulaire. Elle infecte les cellules eucaryotes par phagocytose, se multiplie puis redonne la forme LCV (McCaul et Williams, 1981; Heinzen et al., 1999). La forme LCV est représentée par de grosses cellules de forme arrondie, mesurant 0.7 x 2  $\mu\text{m}$ , polymorphes, peu denses et exclusivement intracellulaire, et caractérisée par une forte activité métabolique et un taux de réplication intense, mais une faible résistance mécanique (McCaul et Williams, 1981; Heinzen et al., 1999). La forme LCV semble subir un phénomène proche de la sporulation, en se séparant en deux compartiments inégaux contenant chacun un matériel nucléaire complet. Le plus petit des deux compartiments donnerait une endospore à une extrémité du LCV, nommée SDC (small dense cell) (figure 1) (McCaul et Williams, 1981). Le mécanisme de développement des SDC en SCV reste aujourd'hui inconnu (Mboussou, 2017) (figure 1).

Les formes LCV et SCV ont toutes les deux un pouvoir infectieux, tant in vitro qu'in vivo, mais l'absence de résistance des LCV suggère que seules les SCV jouent un rôle dans la transmission, tandis que les LCV sont responsables de la dissémination de la bactérie dans l'organisme infecté et de la pathologie (Mboussou, 2017).



**Figure 1** : Images obtenues par microscopie électronique. (a) cellules SCV (Small Cell Variant) avec chromatine condensée; (b) cellules LCV (Large Cell Variant) avec chromatine dispersée; (c) Cellules LCV avec cellules SLP (Spore-Like Particle). Les cellules SLP ou SDC (small dense cell) sont marquées par des flèches. (Heinzen et al., 1999).



### 2.3 Génétique

La première séquence complète du génome de *Coxiella burnetii* de l'isolât Nine Mile phase I RSA 493 (NMI) a été identifié en 2003 (Seshadri et al., 2003). Le génome semblait être circulaire et était composé d'un chromosome de 1995275 pb et d'un plasmide QpH1 de 37393 pb (Seshadri et al., 2003). En plus de celui-ci, il existe actuellement cinq autres génomes de *C. burnetii* qui ont été séquencés dans leur intégralité ; deux souches provenant de patients atteints d'endocardite humaine CbuG\_Q212 (NC\_011527.1) et CbuK\_Q154 (NC\_011528.1) (Beare et al., 2009), une souche isolée d'un rongeur Dugway 5J108 111 (NC\_009727.1) (Beare et al., 2009), une souche isolée d'un patient en Italie en 1945 RSA 331 (souche Henzerling) (NC\_010117.1), et récemment une souche séquencée aux Pays-Bas Z3055 (NZ\_LK937696.1), liée à la grande épidémie de la fièvre Q en 2007 (Tozer, 2015). Ces séquences montrent une variation génomique d'une longueur d'environ 2,0 à 2,2 Mb, et présentent une homologie génétique considérable entre eux lorsqu'il est examiné avec le séquençage de l'ARNr 16s (Hechemy, 2012). La majorité des isolats de *C. burnetii* séquencés jusqu'ici portent un plasmide à réplication autonome ou intègrent des séquences analogues au plasmide dans leur chromosome. Actuellement, quatre types de plasmides, désignés par QpH1 (37 kb), QpRS (39 kb), QpDG (42 kb) et QpDV (33 kb) ont été identifiés (Jäger et al., 2002). Une région de 16 kb est conservée dans tous les plasmides, y compris dans les séquences plasmidiques intégrées dans le chromosome, ce qui implique une fonction critique de cette région dans la survie bactérienne (Hendrix et al., 1991; Willems et al., 1997)

### 2.4 Variation de phase

L'une des caractéristiques majeures de *Coxiella burnetii* est la variation de phase antigénique du lipopolysaccharide (LPS). Ces deux phases antigéniques distinctes sont nommées I et II.

La phase I est caractérisée par la présence d'un LPS complet et lisse qui masque entièrement les protéines membranaires, bloquant ainsi l'entrée des anticorps. Par ailleurs, elle ne possède pas des récepteurs de la fraction C3b, ce qui renforce sa résistance à l'action du complément. Elle a été isolée chez les ruminants, l'homme et les arthropodes infectés. Il s'agit de la forme virulente de la bactérie (Vishwanath et Hackstadt, 1988; Thompson et al., 2003 ; Malosse, 2008).

La phase II est caractérisée par la présence d'un LPS incomplet et rugueux à cause d'une grande délétion chromosomique du gène à l'origine de leur production (Schramek et Mayer,

1982 ; Vodkin et al., 1986). Le LPS de la phase II est très immunogène, provoquant chez l'animal une réponse humorale plus précoce et plus élevée, par rapport au LPS de la phase I (Rousset, 2001). Cependant, ces anticorps n'ont aucun pouvoir protecteur comparativement à ceux produits contre le LPS de la phase I (Mege et al., 1997). Cette phase est moins virulente et n'est obtenue en laboratoire qu'après passages sur systèmes vivants non immunocompétents (cultures cellulaires ou œufs embryonnés) (Willems et al., 1998). En plus, elle ne peut pas survivre après inoculation à un animal, car elle est très sensible à l'action du complément, et rapidement éliminée par les macrophages (Vishwanath et Hackstadt, 1988).

Cette variation de phase est importante en sérologie et vient en support au diagnostic pour la différenciation entre fièvres Q aiguë et chronique. Lors d'une infection aiguë, des anticorps dirigés contre l'antigène de phase II sont produits, tandis que, lors d'infection chronique, ce sont les anticorps dirigés contre l'antigène de phase I qui sont synthétisés (Hackstadt et Williams, 1981).

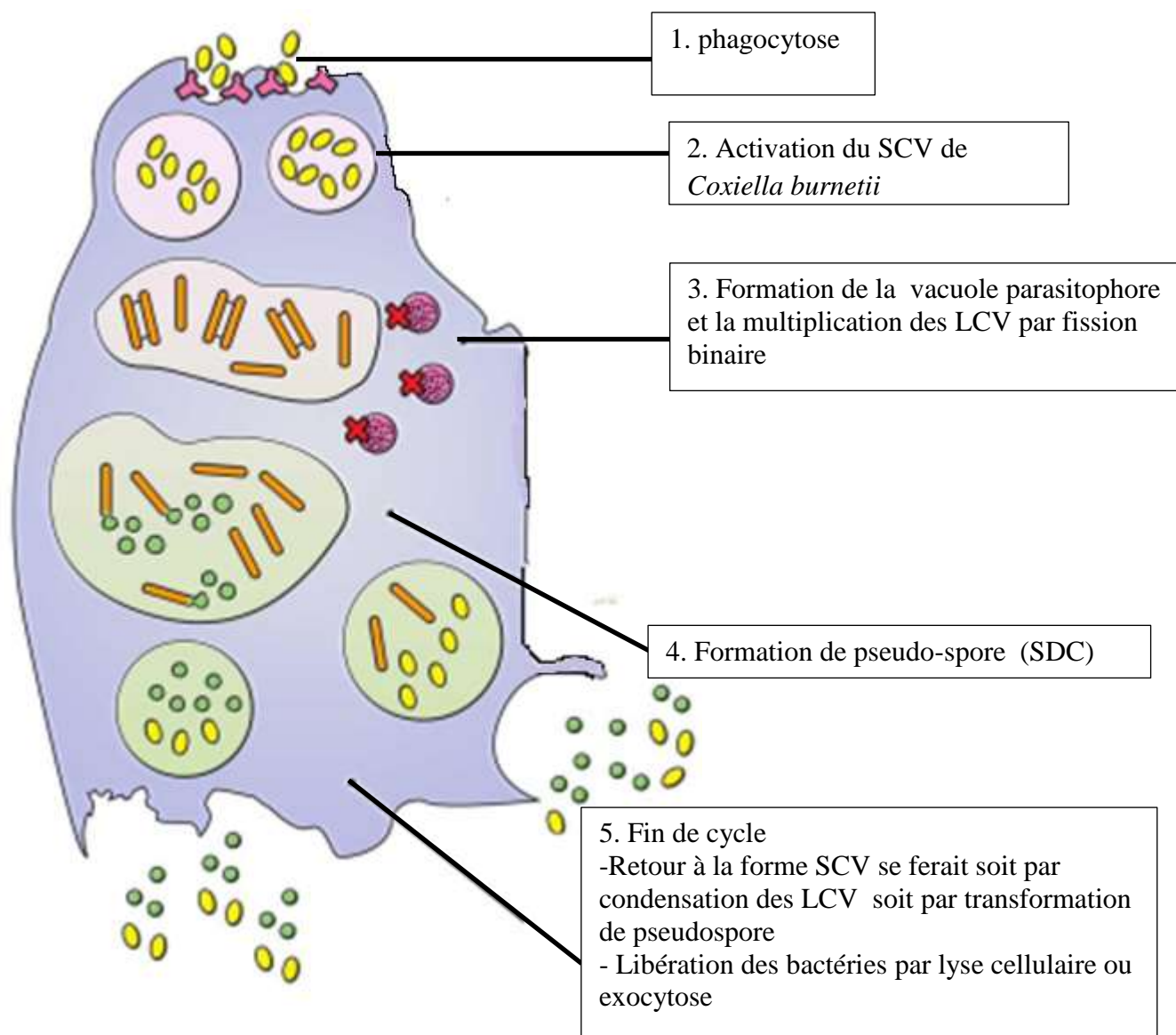
## 2.5 Résistance et survie

*Coxiella burnetii* est capable de survivre longtemps dans l'environnement extérieur et persiste dans les aliments contaminés en raison de ses caractéristiques physiques, notamment leur stabilité vis-à-vis des acides (pH jusqu'à 4.5), de la température (62 °C pendant 30 minutes), des rayons UV et de la pression osmotique (jusqu'à 300 000 kPa)(EFSA, 2010). *C. burnetii* peut survivre jusqu'à 42 mois à une température comprise entre 4 et 6 °C dans le lait, 12 à 16 mois dans la laine, 120 jours dans la poussière, 49 jours dans l'urine séchée, 30 jours dans les expectorations séchées (EFSA, 2010). En outre, ce microorganisme peut survivre pendant plus de 6 mois dans une solution saline à 10 % (Williams, 1991). *C. burnetii* est tué à la suite d'une exposition à 5 % de chloroforme ou de formaldéhyde (dans un environnement humidifié à 80 %) avec une exposition inférieure à 30 minutes, à 5 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à 0.5 % d'hypochlorite et à 70 % d'éthanol (toutes exposées à 30 minutes), et après la pasteurisation (au moins 72 °C pendant 40 secondes) (Angelakis et Raoult, 2010; EFSA 2010). La résistance aux antibiotiques de *C. burnetii* semble variable selon les souches. Cependant, ce germe est sensible aux antibiotiques ayant la capacité de pénétrer dans les cellules, se concentrer dans les phagolysosomes et rester actif à un pH inférieur à 5, tel que les tétracyclines notamment la doxycycline, les quinolones et l'association sulfamide-triméthoprim (Angelakis et Raoult, 2010; EFSA, 2010).

## 2.6 Cycle de développement

*Coxiella burnetii* présente un cycle de développement comportant une forme intracellulaire et une forme extracellulaire. Son cycle intracellulaire commence par l'attachement puis la pénétration passive de la forme extracellulaire de *C. burnetii* (SCV ou SDC) dans la cellule cible préférentiellement les monocytes circulants et les macrophages tissulaires par phagocytose. Lorsque la voie d'entrée est respiratoire, les macrophages alvéolaires des poumons sont vraisemblablement les premières cellules à être infectées (Maurin et Raoult, 1999).

La phagocytose des bactéries en phase II requiert l'engagement des récepteurs intégrine  $\alpha\beta3$  et de CR3 (récepteur du complément de type 3), et sont rapidement détruites par le système phagolysosomal (Mege et al., 1997). Alors que, la phase I de *C. burnetii* adhère aux macrophages seulement par l'intégrine  $\alpha\beta3$ , ce qui déclenche la phagocytose de la bactérie par un mécanisme actine dépendant permettant la formation de pseudopodes (Capo et al., 1999 ; Angelakis et Raoult, 2010). Après pénétration, les SCV de la phase I sont activés métaboliquement dans le phagosome acide (pH à 4.5) et se transforme en LCV (Maurin et Raoult, 1999). L'interaction du LPS des SCV de la phase I avec leurs récepteurs membranaires sur les macrophages inhibe une cascade d'activation enzymatique aboutissant au blocage de la maturation des phagosomes contenant *C. burnetii* au stade endosome tardif et à l'inhibition de fusion des phagosomes aux lysosomes (Mottola et Ghigo, 2013). Ce défaut de formation du phagolysosome permet à la bactérie de survivre dans les macrophages (Mottola et Ghigo, 2013 ; Mboussou, 2017). Les endosomes tardifs fusionnent ensuite, aboutissant à la formation d'une grande vacuole unique appelée « vacuole parasitophore » ou (PV) (Howe et al., 2003 ; Ghigo et al., 2012). Les LCV se divisent par fission binaire (McCaul et Williams, 1981). Et à la fin du cycle, les LCV se condensent en SCV ou bien subissent une différenciation sporogénique (Angelakis et Raoult, 2010). Les spores like particules (SLP) ou SDC produites peuvent ensuite se développer pour devenir des SCV métaboliquement inactifs (Williams et Thompson, 1991). Les SDC et les SCV peuvent ensuite être libérés de la cellule hôte infectée par lyse cellulaire ou exocytose (Maurin et Raoult, 1999) (figure 2).

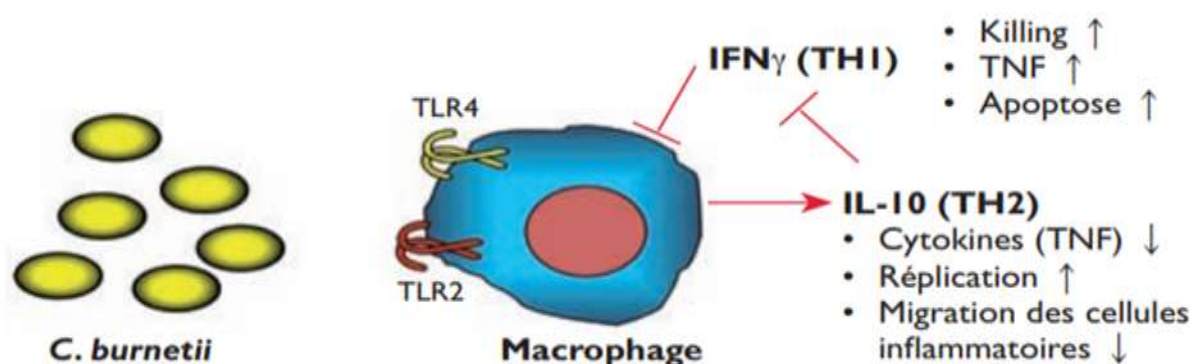


**Figure 2** : Cycle de développement de *Coxiella burnetii* selon Mboussou (2017).

### 3 Pouvoir immunogène

Les monocytes et les macrophages sont les principales cibles de *Coxiella burnetii* et la survie intracellulaire de *C. burnetii* nécessite la subversion des propriétés microbicides de ces cellules (Capo et Mege, 2012). *C. burnetii* induit un fort remodelage du cytosquelette d'actine lorsqu'il interagit avec des monocytes et des macrophages via des intégrines  $\alpha\beta_3$ , avec un effet final de réduction de l'efficacité d'absorption de bactéries (Capo et al., 1999). La détection de *C. burnetii* se fait initialement par les cellules immunitaires innées via les récepteurs Toll-like (TLR). TLR4 reconnaît le LPS de la bactérie et participe en partie à la phagocytose de la bactérie, à la formation des granulomes et à la production des cytokines TNF et d'IFN- $\gamma$ , tandis que TLR2 reconnaît le peptidoglycane et participe également à la formation des granulomes et à la production des cytokines (TNF et d'IFN- $\gamma$ ) (Capo et Mege,

2012). L'immunité cellulaire joue un rôle fondamental dans l'élimination de l'infection grâce à la prédominance de la réponse contrôlée par les lymphocytes LTH1 et de la production d'IFN $\gamma$ , qui participe à la mort de la bactérie par les macrophages, en restaurant la fusion du phagolysosome, en induisant la production du TNF, en favorisant l'apoptose des cellules infectées, et en modulant les récepteurs de la transferrine entraînant ainsi une diminution de l'assimilation du fer des cellules infectées (Capo et Mege, 2012). Le passage à l'infection chronique est marqué par l'évolution vers une réponse immunitaire contrôlée par les lymphocytes LTH2, régulée par l'interleukine 10 (IL10). L'IL10 inhibe la production des cytokines proinflammatoires (TNF), favorise la réplication de la bactérie et bloque la migration des cellules inflammatoires vers les tissu (Amara et al., 2012). L'IL10 est produite en grande quantité dans l'infection chronique. Le risque de passage à la chronicité et le pronostic défavorable de la maladie sont liés à un taux élevé d'IL10 (figure 3). Récemment, des expériences in vitro ont suggéré un rôle potentiel des cellules T «Treg» dans l'évolution vers la fièvre Q chronique (Layez et al., 2012).



**Figure 3** : Pathogénèse de l'infection due à *Coxiella burnetii* (Delaloye et Greub, 2013).

La fièvre Q chronique est caractérisée par une immunité à médiation cellulaire déficiente, soulignant ainsi le rôle majeur de l'immunité à médiation cellulaire dans la protection contre *C. burnetii*. Le rôle de la réponse immunitaire humorale dans l'infection à *C. burnetii* n'a pas encore été complètement clarifié. Le paradigme immunologique actuel suggère que la réponse humorale est plus efficace dans l'infection bactérienne extracellulaire alors que la réponse immunitaire protectrice contre les pathogènes intracellulaires se produit par l'immunité à médiation cellulaire. Une étude de Humphres et Hinrichs (1981) a montré que le traitement des souris athymiques avec des sérums immuns contre *C. burnetii* n'avait aucun effet sur la réplication de la bactérie dans la rate, ce qui suggère que seule l'immunité à médiation cellulaire joue un rôle de contrôle de l'infection (Humphres and Hinrichs, 1981). Par ailleurs,

deux autres études ont démontré que les vaccins produisent des anticorps capables de fournir une protection complète chez des souris immunocompétentes lorsqu'elles étaient infectées par *C. burnetii* (Ghigo et al., 2012; Shannon et al., 2009). Plusieurs études ont analysé la capacité des anticorps anti- *C. burnetii* opsonisants de réduire la survie de la bactérie dans les cellules mononucléées. Ces études suggèrent bien que les anticorps soient capables d'augmenter la capacité des phagocytes à se lier au *C. burnetii* opsonisée. Cependant, ils n'ont pas affecté leur capacité à contrôler la réplication de la bactérie (Zhang et al., 2012). De plus, Desnues et al. (2009) ont montré que les macrophages incubés avec *C. burnetii* opsonisée avec des anticorps IgG spécifiques, libéraient des quantités plus élevées d'IL10 et que l'opsonisation de *C. burnetii* augmentait la réplication bactérienne (Desnues et al., 2009). En résumé, il a été prouvé que des anticorps protégeaient des souris naïves de l'infection par *C. burnetii*, mais leur activité n'est efficace que si elle est soutenue par la réponse cellulaire (Zhang et al., 2012).

De grandes quantités d'anticorps sont produites chez l'homme et les animaux infectés dans les trois à quatre semaines suivant l'apparition de la maladie. Chez l'homme, la majorité des anticorps après la primo-infection sont dirigés contre les antigènes de phase II, tandis qu'une augmentation des niveaux d'anticorps dirigés contre les antigènes de phase I est liée à une infection chronique (Capo et Mege, 2012). Les antigènes dominants sont représentés par le LPS pour la phase I, et par les protéines de la membrane externe pour la phase II (Fournier et al., 1998). Par conséquent, les anticorps anti-phase I reconnaissent l'ensemble LPS-protéines, alors que les anticorps anti-phase II reconnaissent uniquement les protéines de la membrane externe. En phase I, les lymphocytes B produisent des anticorps II précoces, puis des anticorps I tardifs, spécifiques et protecteurs (Rousset et al., 2000). En phase II, les lymphocytes B produisent des anticorps II précoces mais peu protecteurs (Rousset et al., 2000). En effet, les anticorps de classe M réactifs à la phase II de *C. burnetii* apparaissent rapidement, atteignent des titres élevés en 14 jours et persistent pendant 10 à 12 semaines. Alors que ceux réagissant avec les antigènes de phase I présentent généralement un titre beaucoup plus bas au cours d'une infection aiguë (Maurin et Raoult, 1999). Les anticorps de classe G réagissant avec les antigènes de phase II atteignent des titres maximaux environ huit semaines après le début des symptômes, tandis que ceux réagissant avec les antigènes de phase I ne se développent que très lentement et restent à des titres inférieurs aux anticorps anti-antigènes de phase II, même après un an (Maurin et Raoult, 1999). Dans le cas de la fièvre Q chronique, où les bactéries persistent, les titres d'IgG contre les antigènes de phases I

et II peuvent être élevés, et la présence d'anticorps IgA contre l'antigène de phase I est généralement, mais pas exclusivement, associée à une infection chronique (Angelakis et Raoult, 2010).

Peu d'études sur la réponse immunitaire ont été menées chez l'animal et la grande majorité d'entre elles ont étudié uniquement la réponse immunitaire humorale chez les vaches laitières. Böttcher et al. (2011) ont observé dans un troupeau laitier infecté la présence de trois profils d'anticorps différents : négatif en phase I et positif en phase II, positif en phase I et négatif en phase II, positif en phase I et en phase II. La phase I négative et la phase II positive étaient les tendances prédominantes observées lors du premier prélèvement chez les vaches âgées de deux à trois ans, mais un an plus tard, il y aura une augmentation de la prévalence du profil positif de phase I et de phase II. Ce changement dans les schémas sérologiques pourrait démontrer une transition d'une infection aiguë à une infection chronique (Böttcher et al., 2011). Un autre aspect mis en évidence dans cette étude est qu'environ 60 % des vaches âgées de plus de quatre ans sont restées séronégatives en dépit de l'excrétion intensive de *C. burnetii* dans le troupeau et de la séroconversion fréquente chez les vaches primipares. Ce phénomène a été expliqué en supposant qu'au moins certaines de ces vaches multipares aient développé une immunité cellulaire efficace avec des taux d'anticorps faibles ou indétectables (Böttcher et al., 2011). Un autre aspect anormal de réponse immunitaire humorale chez les bovins est la présence de vaches séronégatives, excréant *C. burnetii* (Guatteo et al., 2007a; Rousset et al., 2009 ; Böttcher et al., 2011). Guatteo et al. (2007a) ont constaté que l'excrétion était sporadique ou intermittente chez ces vaches, tandis que les vaches présentant un titre sérologique élevé sont des excrétrices permanentes de *C. burnetii*. Une explication possible de ce comportement est que ces vaches avaient construit une immunité cellulaire efficace contre *C. burnetii*, de sorte que l'excrétion de la bactérie n'est que sporadique. Certains auteurs (Böttcher et al., 2011; Nogareda et al., 2012) ont considéré la gestation comme un événement important dans la détermination de l'issue de l'infection par *C. burnetii* chez les vaches, car pendant la gestation, l'immunité passe à l'activité de la LTH2. Cette dernière dirige la réponse immunitaire vers une direction défavorable pour contrôler un pathogène intracellulaire comme *C. burnetii*, et l'immunodépression induite par l'IL-10 pourrait également activer *C. burnetii* chez les vaches infectées de façon latente pendant la gestation. L'hypothèse selon laquelle la gestation est un facteur déclencheur important chez les génisses non immunisées au moment de la première gestation (Böttcher et al., 2011).

#### 4 Pathogénie et signes cliniques

La pathogénèse de l'infection à *Coxiella burnetii* chez l'homme et les animaux n'est pas clairement comprise. *C. burnetii* se transmet généralement par voie aérienne, et les macrophages alvéolaires sont les premières cellules cibles à être infectées. Après l'entrée initiale, la bactérie se multiplie au niveau des ganglions lymphatiques régionaux et se développe une bactériémie transitoire qui persiste pendant cinq à sept jours (Fournier et al., 2001). Toutefois, à la faveur d'une dissémination par les voies sanguine et lymphatique, différents organes peuvent être infectés à savoir : poumon, rate, foie, mais surtout utérus et les glandes mammaires (Masala et al., 2004). L'infection peut persister très longtemps dans les ganglions, la mamelle et l'utérus. Une réactivation bactérienne est possible lors de la gestation, mais selon les espèces, avec (femme, souris) ou sans (ruminants) avortements associés (Masala et al., 2004).

Les symptômes de la fièvre Q sont polymorphes, peu spécifiques, et généralement inapparents (Rousset, 2001). Chez l'homme, l'infection se manifeste par deux formes cliniques. Une forme aiguë résolue spontanément, caractérisée par des symptômes pseudo-grippaux accompagnés d'une forte fièvre, une hépatite, une pneumonie, et rarement une méningo-encéphalite. Et une forme chronique, qui peut survenir des années après la primo-infection et dont la manifestation principale est une endocardite à pronostic sévère (Raoult et al., 2005).

La coxiellose est généralement enzootique dans les zones d'élevages de ruminants domestiques (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005). Chez les ovins et les caprins, l'infection est caractérisée par des avortements en fin de gestation qui surviennent surtout chez les primipares sans signes cliniques antérieurs, une mortalité néonatale, des mises bas prématurées ou de la naissance des animaux chétifs (Rousset et al., 2002). Plus rarement, des pneumonies, des conjonctivites et des hépatites ont été observées. Chez les bovins, l'infection peut rester latente pendant plusieurs années (Rousset, 2001 ; Rousset et al., 2002). Elle peut occasionnellement être associée à des avortements à partir du sixième mois de gestation, plus souvent semble-t-il à des métrites, des mammites, des rétentions placentaires, et de l'infertilité (To et al., 1998 ; Barlow et al., 2008 ; Porter et al., 2011 ; Muskens et al., 2011 ; López-Gatius et al., 2012 ; Agerholm, 2013). Les métrites qui peuvent malgré tout être chroniques, sont la plupart du temps aiguës, et surviennent aussi bien après une parturition et une délivrance normale qu'après un avortement et une rétention placentaire. Si la délivrance doit être effectuée manuellement, elle s'avère souvent délicate car les cotylédons sont nécrotiques.



(Rousset, 2001). Les veaux nés normalement de mère infectée présentent souvent dès le troisième jour des troubles généraux avec faiblesse, anorexie, dysenterie et déshydratation, puis parfois pneumonie et arthrite. En l'absence de traitement intensif, l'évolution vers la mort est rapide (Coche, 1981).

Les lésions macroscopiques observées chez des ruminants naturellement infectés par *C. burnetii* sont rares. Généralement, il n'y a pas de lésions macroscopiques du fœtus, mais le placenta infecté présente un exsudat décoloré et un épaississement fibreux intercotylédonaire, avec infiltration de stroma chorionique par des cellules mononucléées et nécrose des trophoblastes chorioniques. Une association statistique significative a été révélée entre ces lésions observée en cas d'avortement bovin et la présence de *C. burnetii* mis en évidence par un test immunohistochimique (IHC) (Bildfell et al., 2000). Dans une autre étude de Hansen et al. (2011), l'examen microscopique de sections cotylédonaires de placenta infecté n'a montré que peu de lésions. Les résultats suggèrent que les lésions du placenta bovin qui sont significativement associées à l'infection par *C. burnetii* sont rares. L'absence de lésions graves indique que le dysfonctionnement placentaire n'est pas une caractéristique de la coxiellose bovine, ce qui pourrait expliquer pourquoi il n'y pas une augmentation des taux de mortinatalité dans les troupeaux de bovins infectés par *C. burnetii* (Hansen et al., 2011).

## 5 Epidémiologie

### 5.1 Réservoir et espèces affectées

Le réservoir est vaste mais n'est que relativement peu connu. Il comprend des mammifères domestiques (bovins, ovins, caprins, chevaux, chiens, chats et lapins), sauvages (cervidés, renards et rongeurs), marins, mais également des oiseaux domestiques (poules, dindes, oies et canards) ou sauvages (pigeons). *C. burnetii* ont également été isolée chez diverses espèces de tiques, puces, acariens, mouches et autres arthropodes ainsi que des amibes (Woldehiwet, 2004 ; Raoult et al., 2005 ; Million et al., 2009). Chaque zone géographique possède ses propres réservoirs, principaux et secondaires. Ainsi en Australie, un petit marsupial (*Isodon torosus*) constitue le réservoir principal de la bactérie. Il reste asymptomatique, mais excréteur de *C. burnetii* durant une longue période, ce qui permet la contamination des tiques qui l'infectent (Smith et Derrick, 1940). En Angleterre, ce sont les rats qui sont suspectés d'être le réservoir principal, à l'origine de la contamination des chats domestiques (Webster et al., 1995). Bien que les petits rongeurs sauvages semblent constituer un réservoir important, les sources d'infection humaine les plus couramment identifiées sont les ruminants domestiques tels que les bovins, les caprins et les ovins (Rodolakis, 2006). Les chats et les chiens, se sont

également révélés être à l'origine d'épidémies en milieu urbain (Higgins et Marrie, 1990 ; Morita et al., 1994). Il est probable que la faune sauvage ne soit en cause que dans quelques cas sporadiques (Angelakis and Raoult, 2010).

## 5.2 Répartition géographique et fréquence de l'infection

La fièvre Q est une zoonose ubiquitaire dans le monde. Seule la Nouvelle-Zélande en est exempte jusqu'à présent (Woldehiwet, 2004). L'incidence réelle de l'infection chez l'homme et chez l'animal est sous-estimée dans plusieurs pays en raison de la prépondérance des cas asymptomatiques et du manque d'outils de diagnostic efficaces (EFSA, 2010). Plusieurs études sur la coxiellose chez les ruminants ont été publiées en Afrique (Klaasen et al., 2014), en Asie (Asadi et al., 2013), en Europe (Czaplicki et al., 2012), en Océanie (Cooper et al., 2011), en Amérique du Nord (Hatchette et al., 2002) et en Amérique du Sud (De Ruiz, 1977) . La séroprévalence est souvent plus élevée chez les ruminants que chez l'homme et varie de 1.1 % à 80 % chez les ovins (Lange et Klaus, 1992 ; Dorko et al., 2010), de 6.5 % à 65.8 % chez les caprins (Khalili et Sakhaee, 2009 ; Pape et al., 2009) et de 0.6 % à 46.6 % chez les bovins (Htwe et al., 1992 ; Banazis et al., 2010).

## 5.3 Facteurs de risque

Les facteurs de risque sont des éléments qui favorisent ou préviennent l'introduction ou le maintien de l'infection au sein d'un troupeau, et entre les sujets composant celui-ci (Turcotte, 2015). Les facteurs de risque sont liés soit à l'individu, soit au troupeau.

À l'échelle individuelle, plusieurs études ont montré que la prévalence de l'infection à *C. burnetii* chez les bovins augmentait avec l'âge ou avec le nombre de parités. La prévalence est plus élevée chez les bovins mâles que les femelles (McCaughey et al., 2010 ; Czaplicki et al., 2012 ; Paul et al., 2014), et chez les vaches laitières que chez les bovins de boucherie (McCaughey et al., 2010; Ryan et al., 2011; Alvarez et al., 2012 ; Carbonero et al., 2015). Parmi les races de bovins laitiers, la prévalence serait plus élevée chez la Holstein (McCaughey et al., 2010, Paul et al., 2012).

À l'échelle du troupeau, de nombreuses études chez les bovins montrent que la séroprévalence augmente avec la taille du troupeau (McCaughey et al., 2010, Böttcher et al., 2011 , Alvarez et al., 2012 ; Paul et al., 2012 ; van Engelen et al., 2014). Des facteurs de gestion, tels que l'élevage en stabulation libre (Paul et al., 2012), l'élevage mixte avec les ovins (Ryan et al., 2011 ), l'achat de nouveaux animaux (van Schaik et al., 2002 ; Fèvre et al., 2006 ; van Engelen et al., 2014), le non isolement des animaux nouvellement introduit

(Paul et al., 2012), la présence de tiques (Cantas et al., 2011 ; van Engelen et al., 2014) et la non utilisation de désinfectants (van Engelen et al., 2014 ; Dabaja et al., 2019) peuvent également contribuer à la séroprévalence de la coxiellose chez bovins.

## 5.4 Mode de transmission

### 5.4.1 Voies d'excrétion

Les ruminants domestiques sont considérés comme les principaux réservoirs de *Coxiella burnetii* (Alvarez et al., 2012). Un fois infectés, ils vont excréter la bactérie dans l'environnement par le lait, l'urine, la selle, le mucus vaginal, le sperme et surtout dans le liquide amniotique et le placenta (Van den Brom et al., 2015). Cette excrétion est massive lors d'un avortement, importante pendant la mise-bas et intermittente durant la vie ultérieure de ces animaux (Van den Brom et al., 2015). Le lait est la principale voie d'excrétion chez les chèvres et les vaches, alors que les brebis éliminent les bactéries le plus souvent dans les fèces et le mucus vaginal (Angelakis et Raoult, 2010). Les bactéries excrétées contaminent des objets tels que la laine, les vêtements, la paille, le fumier, etc., qui peuvent servir de vecteurs de transmission (Berri et al., 2000). *C. burnetii* est souvent excrétée chez un même animal par une seule voie. Par ailleurs, elle peut également être excrétée par deux voies, principalement les voies vaginale et fécale (Gardon et al., 2002). L'excrétion par trois voies simultanément est rare (Guatteo et al., 2012). La durée de l'excrétion est très variable d'une espèce à l'autre. La plus longue durée d'excrétion trouvée lors du suivi d'animaux infecté naturellement ou expérimentalement était:

- 28 jours dans le mucus vaginal (Guatteo et al., 2012) , 14 jours dans les fèces (EFSA, 2010), 13 mois dans le lait des vaches (Guatteo et al., 2012).
- 14 jours dans le mucus vaginal, 20 jours dans les fèces (EFSA, 2010), 52 jours dans le lait chez la chèvre (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005).
- 75 jours dans le mucus vaginal (Astobiza et al., 2011), 149 jours les fèces (Astobiza et al., 2011), 109 jours dans le lait des brebis (Astobiza et al., 2011).

La diversité des voies d'excrétion et la persistance de l'excrétion dans le temps expliquent la forte contamination de l'environnement et le maintien de l'infection dans un troupeau (EFSA, 2010).

### 5.4.2 Voies de contamination

La contamination d'autres animaux ou humains survient principalement après l'inhalation de poussières et / ou d'aérosols produits à partir de déchets de mise bas ou d'avortements, des sécrétions génitales, des déjections et de lait contaminés et présents dans l'environnement

(Guatteo et al., 2006, 2007a ; Rousset et al., 2009 ; Angelakis et Raoult, 2010; EFSA, 2010). Cette transmission aérogène est très efficace, car un très petit nombre de bactéries est suffisant pour causer une infection (Brooke et al., 2013). La période d'incubation semble dépendre de la dose inoculée, et elle très courte lors de l'inhalation d'une grande quantité d'aérosols contaminés (Gonder et al., 1979). La bactérie peut être transportée par le vent sur plusieurs kilomètres, si bien que des individus peuvent présenter la maladie sans qu'aucun contact direct avec un animal infecté (Delaloye et Greub, 2013; Nusinovici et al., 2015). Les conditions et les pratiques d'élevage influent directement sur la transmission aérienne de la bactérie. L'épandage de fumiers ou la manipulation de machines agricoles dans les bâtiments d'élevages favorisent sa dissémination dans l'environnement.

La contamination par voie orale peut être possible, suite au léchage ou à l'ingestion de litière, d'aliments et de pâturage souillés par des produits de parturition ou d'avortement chez les ruminants domestiques (Boarbi et al., 2016 ; Rousset, 2001 ; Woldehiwet, 2004). Elle peut être effectuée lors de la consommation de déchets de mise-bas par les carnivores et les oiseaux (Rousset et al., 2001) et l'ingestion de rongeurs infectés par les chats (Webster et al., 1995). En revanche, cette voie alimentaire via des produits laitiers reste encore controversée chez l'homme car la dose infectieuse requise est assez méconnue (Rousset et al., 2009). En effet, *C. burnetii* peut rester viable dans les fromages à pâte dure, fabriqués à partir de lait non pasteurisé (Barandika et al., 2019). D'autres études montrent que l'ingestion de lait cru contaminé n'entraîne qu'une séroconversion mais pas de forme clinique de la maladie (Rousset et al., 2009 ; EFSA, 2010). Une étude japonaise a mis en évidence la présence de *C. burnetii* dans des œufs du commerce, qui se sont avérées infectieuses après inoculation à la souris (Tatsumi et al., 2006). En plus, des études expérimentales récentes confirment la voie orale comme mode de transmission de *C. burnetii* chez la souris (Miller et al., 2020) et le cochon d'inde (Jodelko et al., 2019). Un rapport de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) publié en 2010 a conclu à l'absence de risque sérieux de transmission de la fièvre Q par voie alimentaire. Cependant, cette voie suscite certaines précautions tel que la pasteurisation du lait pour protéger les consommateurs (EFSA, 2010 ; Pexara et al., 2018).

Les tiques peuvent constituer un vecteur potentiel et un réservoir naturel de *C. burnetii* (Spyridaki et al., 2002) et plus de 40 espèces de tiques différentes ont été trouvées naturellement infectées dans le monde (Maurin et Raoult 1999 ; EFSA, 2010). Les tiques s'infectent par *C. burnetii* lors de la prise d'un repas sanguin sur un animal infecté. Ces bactéries se multiplient ensuite dans les cellules de la partie moyenne de leurs intestins, et

excrétée dans leurs salives et leurs fèces (Porter et al., 2011; Kumsa et al., 2015; Ndeereh et al., 2017). *C. burnetii* se transmet par les tiques aux autres animaux au cours d'un autre repas sanguin ou par propagation aérogène de leurs excréments fécaux séchées (Sprong et al., 2012 ;Ogo et al., 2013). De plus, les tiques transmettent l'agent pathogène non seulement horizontalement, Mais, aussi verticalement, c'est-à-dire de manière transstadiale et transovarienne aux générations suivantes (Altay Çapın et al., 2013 ; Eldin et al., 2017). Ce qui permet la maintenance de *C. burnetii* dans l'environnement (Spyridaki et al., 2002 ; Dorko et al., 2012; Kumsa et al., 2015). En général, les tiques sont responsables de la transmission de l'infection à *C. burnetii* par la faune sauvage et occasionnellement aux ruminants domestiques (EFSA, 2010; Porter et al., 2011; Jourdain et al., 2015). Chez l'homme, cette transmission a été démontrée expérimentalement (Koka et al., 2018 ; Duron, 2015a). Cependant, l'infections humaine suite à une morsure de tique n'est pas bien documentée et ne peut se produire que rarement dans la nature (Pacheco et al., 2012), alors qu'elle se produit lors de l'inhalation de matières fécales contaminées provenant de tiques infectés (Hellenbrand et al., 2001).

La transmission vénérienne a été évoquée chez les ruminants domestiques (Piñero et al., 2014), et les coxielles ont été isolées dans le sperme de taureaux infectés (Rousset et al., 2001). Mais elle serait probablement d'importance mineure par rapport à la voie aérienne. Chez l'homme, un rapport de cas fait également état d'une transmission sexuelle (Milazzo et al., 2002).

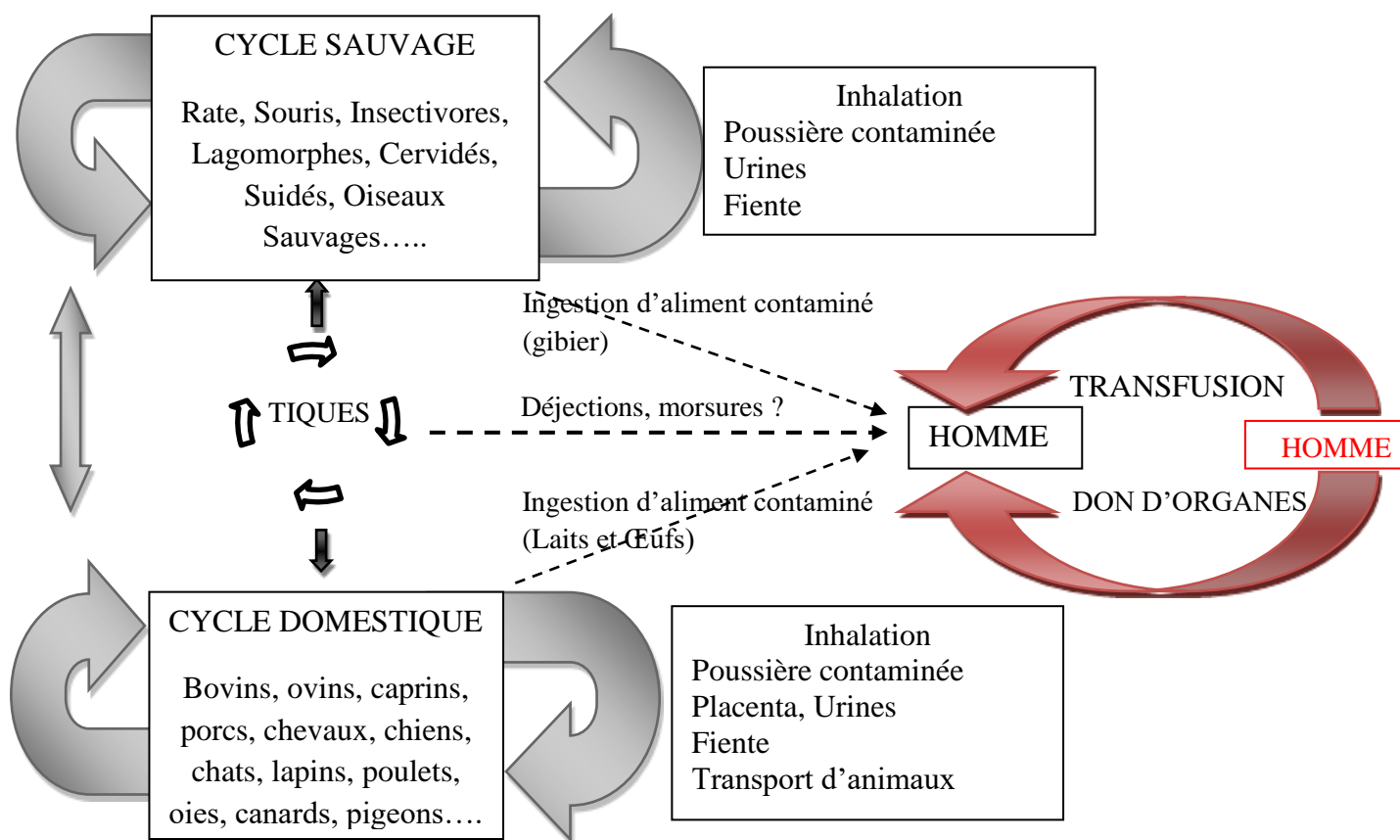
La transmission verticale de la mère-fœtus serait également possible chez ruminants (Piñero et al., 2014). Néanmoins, celle-ci demeure difficile à mettre en évidence puisque les nouveau-nés pourraient rapidement s'infecter par la mère infectée (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005).

De rares cas sporadiques de transmission interhumaine de la fièvre Q ont été observés lors de l'autopsie, à la suite d'un contact avec une femme enceinte, de transfusion ou de don d'organe (Boarbi et al., 2016 ; Yohannes et Mekonen, 2018).

### **5.5 Cycle épidémiologique de la fièvre Q**

Il existe deux cycles différents de transmission de *Coxiella burnetii* : l'un sauvage, associant des animaux sauvages différents, assurant le maintien de *C. burnetii* dans la nature et l'autre, domestique, impliquant les animaux domestiques qui serait à l'origine de la contamination humaine, l'homme constituant un hôte accidentel (Gardon et al., 2002 ; Reusken et al., 2011).

Les tiques seraient des vecteurs communs aux deux cycles jouant un rôle important dans le maintien et la liaison entre ces dernières (Pluta et al., 2010 ;Thompson et al., 2012) (figure 4).



**Figure 4** : Cycle épidémiologique de la fièvre Q (Centre national de référence Rickettsies, Marseille).

## 6 Diagnostic

Le diagnostic de la fièvre Q basé sur des symptômes cliniques ou des examens post mortem est presque impossible en raison de l'absence de symptômes ou de lésions spécifiques causés par la maladie. Par conséquent, le diagnostic de laboratoire est le seul moyen fiable de confirmer la présence de *Coxiella burnetii* chez les animaux domestiques ou sauvages. Plusieurs tests ont été décrits pour le diagnostic de *C. burnetii* chez les animaux, comprenant à la fois une identification directe de l'agent pathogène et des tests sérologiques (OIE, 2018).

### 6.1 Diagnostic direct

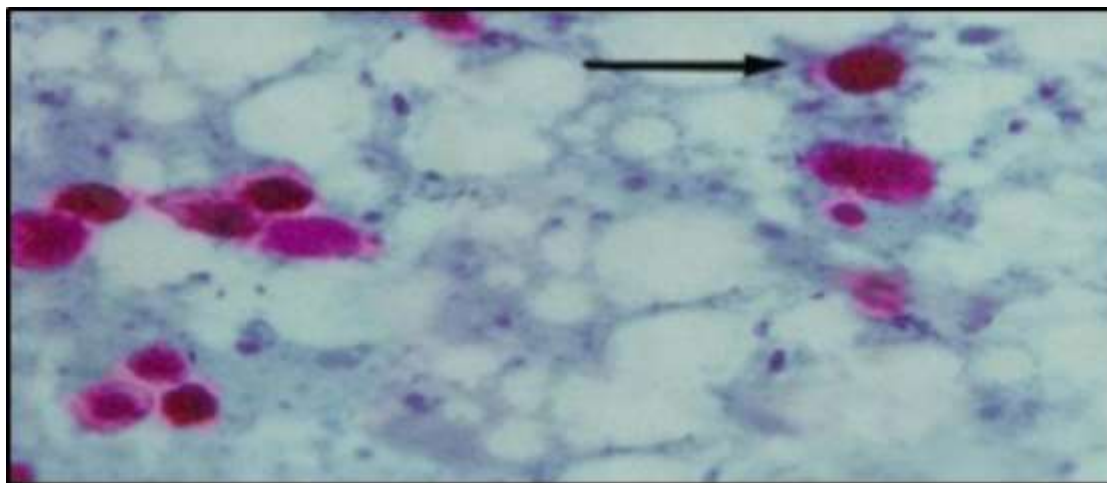
Il repose sur l'isolement de la bactérie, ou la mise en évidence des antigènes de *C. burnetii*, ou de l'ADN bactérien. Pour le diagnostic de laboratoire dans le contexte d'avortements ou de mortalité néonatale répétés au niveau des troupeaux, il convient de prélever des échantillons de

tissu fœtal, de placenta et d'écoulements vaginaux le plus rapidement possible, et plus précisément, dans la semaine qui suit la parturition ou l'avortement afin de limiter le nombre de résultats faussement négatifs car le niveau d'excrétion bactérienne diminue fortement après cette période (Sidi-Boumedine et al., 2010). Le lait de la citerne, le lait individuel ou le colostrum, des échantillons vaginaux et fécaux peuvent être prélevés pour enquêter sur l'excrétion bactérienne, mais ils ne sont pas fiables pour détecter les troupeaux affectés cliniquement (Sidi-Boumedine et al., 2017). Pour un maximum de succès, tous les échantillons destinés aux examens de laboratoire doivent être transportés au froid et conservés à moins 80° C (Woldhiwet, 2004).

*C. burnetii* peut être détectée directement chez les ruminants par microscopie, culture bactériologique, immunohistochimie (IHC) et réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

### 6.1.1 Coloration

La coloration peut être réalisée à partir d'un frottis ou des calques de placenta, plus précisément sur les cotylédons, des organes de l'avorton et des prélèvements vaginaux. Elle peut être de coloration de Machiavello, de Stamp, Ziehl-Neelsen modifiée, de Gimenez, Giemsa ou Koster modifiée (Giménez, 1965 ; Angelakis et Raoult, 2010 ; OIE, 2018). La présence de grandes masses de coccobacilles de couleur rouge indique un fort diagnostic présomptif de *C. burnetii* (figure 5). Ces méthodes de diagnostic sont rapides et faciles à exécuter, cependant peu sensibles et non spécifiques en raison d'une confusion possible avec d'autres agents pathogènes tels que *Brucella spp.* ou *Chlamydia spp.* (Berri et al., 2009 ; EFSA, 2010). Il est donc conseillé de compléter ces méthodes par d'autres techniques de confirmation telles que la PCR.



**Figure 5** : Coloration de la *Coxiella burnetii* (Yohannes et Mekonen, 2018).

### 6.1.2 Culture bactériologique

L'isolement de *C. burnetii* peut être effectué par l'inoculation des prélèvements sur des cultures de cellules conventionnelles et sur des œufs de poule embryonnés. Cet isolement est possible lorsque l'examen microscopique indique un grand nombre de *C. burnetii* et un faible niveau de contamination. Avec des échantillons fortement contaminés, tels que les placentas, les écoulements vaginaux, les matières fécales ou le lait, la mise en évidence de *C. burnetii* nécessite l'inoculation d'un broyat de tissus à des animaux de laboratoire (souris ou cobayes) par voie intra péritonéale (EFSA, 2010). *C. burnetii* est classé comme un agent biologique de niveau 3, pour cette raison, toutes les méthodes impliquant la manipulation et la répllication de bactéries vivantes doivent être effectuées dans un laboratoire de confinement de niveau 3 (Gillespie et Hawkey, 2006). Toutefois, ce type d'installation n'est disponible que dans quelques laboratoires, de sorte que l'isolement n'est généralement pas adopté dans les diagnostics de routine (Berri et al., 2000). Bien que cette technique d'isolement est longue, fastidieuse, et dangereuse pour le manipulateur (Rousset et al., 2000), elle donne un résultat irréfutable de l'infection, et présente l'intérêt de permettre de suivre une souche responsable d'une épidémie, de comparer les caractéristiques des souches isolées chez les animaux, l'homme, et les arthropodes présents dans un même secteur géographique (Rousset et al., 2000), de collecter des souches bactériennes et de tester leur sensibilité aux antibiotiques (Cabassi et al., 2006).

### 6.1.3 Immunohistochimie (IHC)

L'immunohistochimie détecte spécifiquement la présence de *C. burnetii* au moyen de réactions antigène-anticorps spécifiques. L'immunohistochimie est réalisée dans des tissus inclus dans la paraffine ou des frottis fixés à l'acétone (Raoult et al., 2005). Il s'agit d'une analyse d'immunofluorescence ou d'immunoperoxydase directe utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre *C. burnetii*, soit un antiserum bien caractérisé d'origine humaine ou un antiserum spécifique produit chez des lapins ou cobayes (Raoult et al., 1994). Un conjugué anti-IgG (humain, lapin ou cochon d'inde) associé à un enzyme de type peroxydase, ou un fluorochrome est ensuite utilisé pour visualiser les bactéries (EFSA, 2010). L'IHC est un test privilégié pour étayer le diagnostic d'avortement en médecine vétérinaire, car il permet d'identifier définitivement *C. burnetii* dans les tissus infectés, tels que les lésions placentaires (Anderson et al., 2013). Cependant, elle est coûteuse, laborieuse et peu sensible pour détecter l'antigène dans des organes autres que le placenta (Sánchez et al., 2006), et leur anticorps spécifiques ne sont pas disponibles dans la commerce (OIE, 2018).



#### 6.1.4 Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)

Actuellement, la PCR est la technique la plus appropriée pour détecter *C. burnetii* dans tout échantillon biologique et environnemental (Berri et al., 2000). En effet, la PCR est rapide à mettre en œuvre, très sensible, très spécifique et réalisable à partir de n'importe quel type de prélèvement (Berri et al., 2000; Nicollet et Valognes, 2007). Plusieurs types de PCR ont été développés pour détecter l'ADN de *C. burnetii* à savoir PCR classiques (Stein et Raoult, 1993; Edingloh et al., 1999), PCR nichées (Willems et al., 1993 ; Zhang et al., 1998), ou PCR en temps réel avec la chimie LightCycler (Fournier et Raoult, 2003; Boulos et al., 2004), SYBR Green (Brennan and Samuel, 2003) ou TaqMan (Harris et al., 2000). Le développement de la technologie de PCR en temps réel a récemment permis de quantifier *C. burnetii* dans des échantillons à l'aide d'une échelle logarithmique (Pfaffl, 2001). Bien que le seuil pour la PCR quantitative en temps réel (qPCR) ne soit pas officiellement approuvé au niveau international, un groupe d'experts français a suggéré que l'avortement chez les ruminants était causé par *C. burnetii* lorsqu'au moins  $10^4$  bactéries par gramme de placenta ou d'écouvillon vaginal sont détectés (Rousset et al., 2012). Le même groupe a estimé qu'un résultat positif dans les tissus ou le contenu de l'estomac de fœtus avortés par qPCR est suffisant pour diagnostiquer la fièvre Q comme étant à l'origine de l'avortement. Pour les échantillons groupés, le seuil proposé est de  $10^3$  bactéries par pool. Ces seuils sont indicatifs et peuvent être révisés, en particulier si de nouvelles informations scientifiques sont disponibles (SidiBoumedine et al., 2010).

Les séquences les plus communément ciblées pour la détection de l'ADN de *C. burnetii* sont soit des séquences plasmidiques codantes pour des protéines du choc thermique (QpH1 ou QpRS) (Fournier et Raoult, 2003), soit des gènes monocopies telles que l'ARNr 16s (Willems et al., 1994), Icd codante pour l'isocitrate déshydrogénase (Van Nguyen and Hirai, 1999), CbMip codante pour la protéine amplificatrice d'infectivité du macrophage (Zhang et al., 1998), SODB codante pour la superoxydase dismutase (Stein and Raoult, 1992), et Com1 codante pour une protéine externe de membrane (Lockhart et al., 2011; Marushchak et al., 2019), soit un gène multicopie correspondant à la séquence d'insertion IS1111 et ses variantes (IS1111a) ( Berri et al., 2000 ; Hoover et al., 1992). En raison du nombre de copies multiples de l'élément IS1111, la PCR correspondante est la plus sensible. Cependant, l'utilisation de ce gène par la PCR en temps réel pour quantifier *C. burnetii* n'est pas possible, car le nombre d'éléments IS1111 n'est pas connu et pouvait varier de 7 à 110 copies en fonction des isolats (Klee et al., 2006).

La sensibilité de la méthode PCR pour la détection de *C. burnetii* diminue lors de la congélation des échantillons laitiers et de mucus vaginal (Guatteo et al., 2007a). Une différence significative de la sensibilité de la PCR en fonction de la méthode utilisée pour la préparation des échantillons laitiers a été observée (Muramatsu et al., 1996). En plus, les échantillons fécaux peuvent contenir des substances capables d'inhiber l'amplification des acides nucléiques (Wilde et al., 1990 ; Monteiro et al., 1997). Les niveaux de spécificité de différents laboratoires pour la détection de l'ADN de *C. burnetii* dans différents échantillons et de différents protocoles sont comparables (EFSA, 2010). Les limites du diagnostic moléculaire sont dues aux différentes voies d'excrétion et à l'intermittence de l'excrétion de cet agent pathogène (Rodolakis et al., 2007; Guatteo et al., 2007b ; Rousset et al., 2009). Par conséquent, le diagnostic basé sur la PCR au niveau individuel est actuellement un processus coûteux, nécessitant de nombreux tests sur différentes matrices à différentes périodes.

Par ailleurs, plusieurs fabricants ont aujourd'hui développé des kits PCR multiplex ciblant plusieurs agents pathogènes (*C. burnetii*, *Neospora caninum*, *Chlamydia* spp. entre autres). Ces outils simplifient les procédures lors du diagnostic différentiel d'avortement chez les ruminants et réduisent les coûts (Tramuta et al., 2011).

## 6.2 Diagnostic indirect

Les méthodes de diagnostic indirect ont pour but de révéler une infection passée par la détection d'une réponse immunitaire spécifique à un agent pathogène donné (Turcotte, 2015).

Les outils sérologiques utilisés pour détecter les anticorps spécifiques à *C. burnetii* sont la Fixation du complément (TFC), Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) et Immunofluorescence indirecte (IFI) (Herremans et al., 2013). Les tests ELISA et TFC sont largement utilisés chez les animaux, tandis que l'IFI est principalement utilisée en médecine humaine. Les antigènes cibles sont les deux formes antigéniques majeures de *C. burnetii* : la phase I obtenue à partir de rates après inoculation d'animaux de laboratoire, et la phase II obtenues par passages répétés dans des œufs embryonnés ou dans des cultures cellulaires (OIE, 2018). Les tests sérologiques conviennent au dépistage des troupeaux, mais leur interprétation au niveau individuel peut être difficile. En effet, les animaux peuvent rester séropositifs pendant plusieurs années après une infection aiguë, certains animaux peuvent excréter *C. burnetii* et présenter un risque d'infection avant le développement d'anticorps, alors que d'autres animaux infectés ne semblent pas se séroconvertir (EFSA, 2010).

En outre, le test cutané et le test de détection d' IFN- $\gamma$  ont récemment été développés pour détecter l'immunité à médiation cellulaire aux antigènes de *C. burnetii* chez l'homme (Isken et al., 2013 ; Kersh et al., 2013a).

### 6.2.1 Fixation du complément

Le TFC était considéré comme le test de référence pour des raisons historiques (Roest et al., 2011). Il s'agit d'une microméthode de fixation à froid, non spécifique d'espèce, très spécifique, mais peu sensible (Natale et al., 2012 ; Emery et al., 2014). Ce faible niveau de sensibilité est probablement expliqué par le fait que le TFC ne détecte pas les anticorps anti-*C. burnetii* de phase I et les anticorps présents dans les sérums contenant des substances anti-compléments (Rousset et al., 2000). En plus, chez les ruminants, les principaux anticorps fixant le complément sont les IgG1 (Micusan et Borduas, 1977 ; Schmeer, 1985), et la présence d'anticorps IgG2 peut interférer avec la fixation du complément par les anticorps IgG1 (Schmeer, 1985). Cependant, une étude récente a montré que le TFC présente chez les bovins une meilleure corrélation avec le statut excréteur de l'animal que les résultats du test ELISA (Natale et al., 2012). Le TFC ne peut pas mettre en évidence les stades précoces de l'infection car les anticorps fixant le complément (IgG1) n'apparaissent pas chez les individus exposés récemment à l'infection (Peter et al., 1985). Par conséquent, des échantillons de phase convalescente et aiguë sont nécessaires pour diagnostiquer l'infection avec précision.

### 6.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

La technique ELISA est aujourd'hui la méthode de diagnostic indirect la plus sensible et la plus spécifique (Horigan et al., 2011 ; OIE, 2018). Cette méthode est entièrement automatisée, facile à réaliser et à standardiser, permettant d'analyser rapidement et simultanément un grand nombre d'échantillons à faible coût (Sidi-Boumedine et al., 2010). En plus, elle est fiable pour la mise en évidence des anticorps anti-*C. burnetii* chez diverses espèces animales (Ezatkhan et al., 2015), et la plus adaptée à l'évaluation des taux d'infection des troupeaux (OIE, 2015). Toutes ces caractéristiques font du test ELISA la méthode de choix pour le diagnostic vétérinaire et les enquêtes épidémiologiques appliquées sur les animaux (Rodolakis, 2009).

Les tests ELISA commerciaux disponibles à des fins de diagnostic vétérinaire détectent les anticorps totaux à partir des échantillons de lait (individuel ou de réservoir), de plasma ou de sérum et ne différencient pas les anticorps anti-phase I et anti-phase II (OIE, 2015). Les antigènes présentés dans le test ELISA du commerce ont deux origines possibles soit les

antigènes de la souche américaine Nine Mile de *C. burnetii* isolée d'une tique, ou les antigènes d'une souche provenant de ruminants domestiques européens infectés (Boarbi et al., 2016).

### 6.2.3 Test d'Immunofluorescence indirecte

L'IFI est un test spécifique à l'espèce, non automatisé, subjectif et non praticable à grande échelle. C'est la raison pour laquelle il n'est pas souvent utilisé pour le diagnostic de l'infection à *C. burnetii* chez l'animal. Il est fréquemment utilisé pour le diagnostic de l'infection humaine (Nielsen et al., 2013). Cette méthode présente une sensibilité supérieure à celle de la TFC mais comparable avec l'ELISA (Rousset et al., 2007). Elle permet de différencier les infections cliniques aiguës et chroniques chez l'homme, en se basant sur le ratio d'anticorps IgG de phase I et de phase II (Philip et al., 1966). Si le titre de la phase I est supérieur ou égal à la phase II, l'échantillon indique une infection chronique. Si le titre de la phase II est supérieur à la phase I, l'échantillon indique une infection aiguë. Aucun kit commercial d'IFI n'est utilisé dans les enquêtes vétérinaires et les kits destinés à l'homme peuvent être adaptés en remplaçant le conjugué humain par un conjugué adapté à l'espèce animale requise (OIE, 2018).

## 6.3 Stratégies diagnostiques

Chez les ruminants, les tests de diagnostic sont utilisés dans deux contextes distincts soit le diagnostic des cas cliniques suspects de la coxiellose soit le dépistage de l'infection.

Dans le premier cas, le diagnostic de fièvre Q doit être réalisé par les tests de diagnostic direct notamment la PCR (Sidi-Boumedine et al., 2010). L'échantillonnage doit être effectué dans la semaine qui suit l'avortement ou la parturition (dans le cas de mortalité néonatale) car le niveau d'excrétion des bactéries diminue par la suite (Arricau-Bouvery et al., 2003). De plus, il est utile de rechercher la présence d'autres agents à l'origine de l'avortement chez les ruminants, puisque *C. burnetii* serait fréquemment présente dans les échantillons même lorsqu'elle n'est pas la cause de l'avortement (Hazlett et al., 2013). Le diagnostic final reposera donc sur l'anamnèse, le diagnostic clinique, lésionnel et ainsi que la PCR (Hazlett et al., 2013).

Dans le cas du dépistage d'infection, les méthodes de diagnostic direct utilisées pour identifier les individus excréteurs de *C. burnetii*, suggérant une infection active, et/ou par les méthodes de diagnostic indirect utilisées pour identifier les individus séropositifs, peuvent refléter une infection active ou passive. En effet, chez les ruminants, de nombreuses études ont montré un

manque de corrélation entre le statut excrétoire et le statut sérologique (Hässig et Lubsen, 1998 ; Berri et al., 2001; Guatteo et al., 2007b ; de Cremoux et al., 2012 ; Niemczuk et al., 2014) car il existe des individus excréteurs séronégatifs (Guatteo et al., 2012), tout comme des individus séropositifs non-excréteurs (Berri et al., 2002 ; Guatteo et al., 2007b ; Guatteo et al., 2012). Considérant ces faits, il est suggéré que le dépistage d'infection par *C. burnetii* ne soit pas fait en fonction d'une seule méthode diagnostique, mais plutôt idéalement en combinant une méthode diagnostique directe à une méthode indirecte, afin d'augmenter la sensibilité des analyses (Fournier et al., 1998 ; Vardi et al., 2011). De plus, considérant que l'excrétion est intermittente, et n'est pas effectuée par toutes les voies possibles chez les ruminants, il est fortement recommandé de prélever plusieurs types d'échantillons à intervalle de temps régulier à partir d'un même type de prélèvement, afin de maximiser les chances de détecter la bactérie, augmentant ici, encore une fois, la sensibilité des tests (Lorenz et al., 1998).

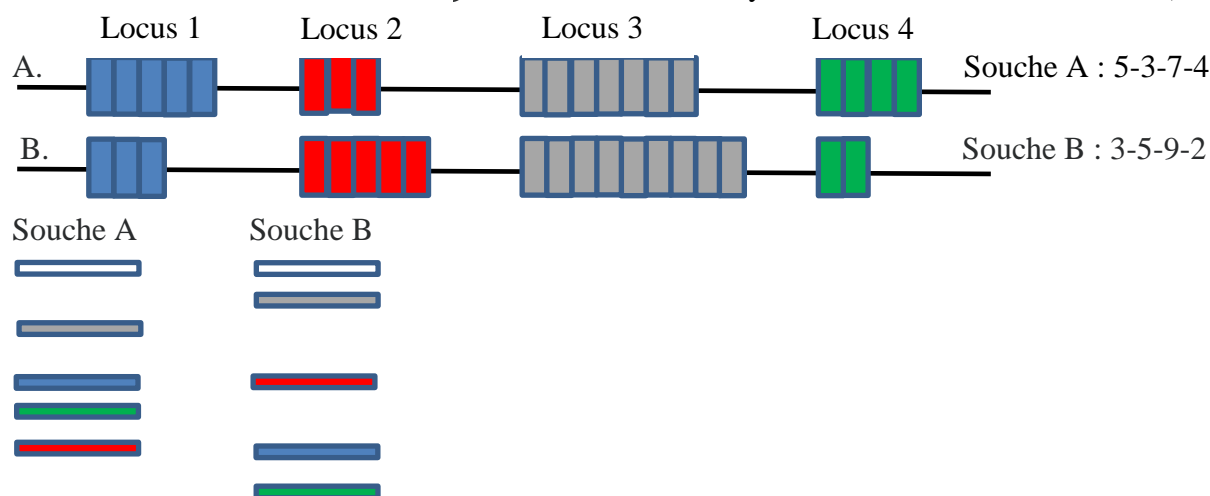
#### 6.4 Génotypage

Le génotypage des bactéries est un outil essentiel pour comprendre l'épidémiologie des maladies infectieuses. En ce qui concerne les zoonoses telles que la fièvre Q, il revêt une importance capitale, car il aide à trouver la source animale des infections humaines (Arricau-Bouvery et al., 2006). Par conséquent, il contribuerait à réduire le nombre d'épidémies de fièvre Q (Arricau-Bouvery et al., 2006; Klaassen et al., 2009; Roest et al., 2011 ; Eldin et al., 2017). Les progrès de la technologie moléculaire et du séquençage ont conduit à la caractérisation moléculaire de génome complet de la bactérie. Le séquençage du génome entier est la méthode ultime pour effectuer des comparaisons directes entre les souches. Cependant, même avec un coût considérablement réduit de la technologie de séquençage, il n'est toujours pas pratique, ni financièrement viable pour de nombreux laboratoires d'effectuer de telles analyses. Cela a influencé le développement d'autres méthodes de typage pour la comparaison entre les souches de *C. burnetii*. Les méthodes de typage antérieures ont été effectuées à l'aide de polymorphisme de longueur de fragments de restriction (RFLP) (Vodkin et al., 1986), séparé par l'électrophorèse sur gel en champ pulsé (PFGE) (Jager et al., 1998) ou par électrophorèse sur gel de sodium-dodécyl sulfate-Polyacrylamide (SDS-PAGE) (Hendrix et al., 1991), amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) (Rustscheff et al., 2000), séquençage de gènes *com1* (Zhang et al., 1998), *mucZ* (Sekeyová et al., 1999), *Icd* (Van Nguyen and Hirai, 1999) et *rpoB* (Mollet et al., 1998). Mais, elles comportent des problèmes de reproductibilité inter- et intra-laboratoire et donnent des résultats limités

(Boarbi et al., 2014). La disponibilité de séquences génomiques complètes a entraîné une nouvelle émergence de méthodes du génotypage tel que l'analyse de répétition en tandem polymorphe (MLVA) (Svraka et al., 2006 ; Arricau-Bouvery et al., 2006), le séquençage de multiples régions intergéniques (MST) (Glazunova et al., 2005), le polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) (Huijsmans et al., 2011), le micro-array ADN (Beare et al., 2006) et le typage par différenciation PCR de la transposon d'IS1111 (Denison et al., 2007). Ces dernières méthodes présentent un fort pouvoir discriminant, pouvant être utilisées directement sur des échantillons cliniques sans culture préalable. Cependant, aucune méthode n'est reconnue au niveau international comme méthode de référence (Sidi-Boumedine et Rousset, 2011).

#### 6.4.1 Analyse de répétition en tandem polymorphe (MLVA)

Le génotypage par MLVA (Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis) repose sur l'amplification par PCR de plusieurs séquences d'ADN répétées en tandem, polymorphes, de longueurs variables et connues (VNTRs = Variable Number of Tandem Repeat), et dispersée dans de nombreux endroits différents dans le génome bactérien (loci ou marqueurs mini-satellites ou microsatellite, noté ms), à l'aide d'amorces spécifiques des régions flanquantes. La détermination de la taille des amplicons par électrophorèse permet ensuite d'évaluer le nombre de répétitions à un locus donné. Le résultat du typage est un code numérique incluant le nombre de répétition à chaque locus. Par exemple pour un code numérique de 5-3-7-4, comme représenté à la figure 6 A, le premier chiffre se rapporte au nombre de répétitions du premier motif séquentiel d'ADN au premier locus analysé, le deuxième chiffre se rapporte au nombre de répétitions du deuxième motif séquentiel d'ADN au deuxième locus analysé, etc. (figure 6) (ArricauBouvery et al., 2006; Svraka et al., 2006).



**Figure 6** : Exemple de variation du nombre de répétitions en tandem VNTR dans plusieurs loci de deux souches différentes (Sobral et al., 2012).

La méthode MLVA développée par Arricau-Bouvery et al. (2006) comprend dix-sept marqueurs ms qui pourraient être analysés dans deux panels distincts. Le premier panel de dix marqueurs était plus adaptable pour l'analyse en utilisant des techniques de détection conventionnelles par électrophorèse sur gel, car les séquences répétées avaient une longueur de 9 à 126 pb. Le second panel contenant sept marqueurs, avait des unités répétées beaucoup plus petites de 6 à 7 pb de longueur et devait être utilisé à l'aide de techniques de dimensionnement automatisées plus sophistiquées telles que l'électrophorèse capillaire (Arricau-Bouvery et al., 2006). Cette méthode a permis l'identification de 36 génotypes différents à partir de 42 isolats de *C. burnetii*. Un troisième panel a été mis en place lors de l'épidémie de fièvre Q aux Pays-Bas, impliquant 6 marqueurs (Klaassen et al., 2009). En outre, une base de données a été créée sur le site Web, soient disponibles gratuitement, facilitant la comparaison entre les souches ([http:// minis atellites.u-psud.fr/](http://minis.atellites.u-psud.fr/)).

La méthode MLVA présente l'avantage d'être très discriminante (Boarbi et al., 2016) et moins laborieuse (Koh et al., 2012; Svraka et al., 2006) par rapport à d'autres techniques telles que le Multispacer Sequence Typing (MST), et reproductible (Astobiza et al., 2012 ; Sulyok et al., 2014). De plus, l'automatisation de la méthode MLVA permet d'obtenir des résultats rapides et à moindre coût.

#### **6.4.2 Multispacer Sequence Typing (MST)**

Multispacer Sequence Typing (MST) est une méthode de typage basée sur la PCR pour analyser des régions intergéniques très variables situées entre deux cadres de lecture ouverts (ORF). Ces régions non codantes (spacer ou espaceur) sont utilisées pour le typage car elles ne sont pas soumises à une pression sélective pour coder des protéines fonctionnelles, comme le sont des gènes codants (Glazunova et al., 2005). Cette méthode a été appliquée pour la première fois en 2005 sur *C. burnetii* ciblant 10 espaces intergéniques, et a permis de séparer 173 isolats de *C. burnetii* en 30 génotypes (Glazunova et al., 2005). Il s'agit d'une méthode fiable, reproductible et possède un pouvoir discriminatoire élevé (Glazunova et al., 2005 ; Sulyok et al., 2014). Comme pour le MLVA, Les résultats sont analysés à l'aide d'un outil électronique sur Internet permettant des comparaisons avec d'autres souches disposées dans une base de données centrale (<http://ifr48.timone.univ-mrs.fr>).

### **6.4.3 Polymorphisme d'un seul nucléotide (PSN) (single-nucleotide polymorphism)**

Le génotypage par Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) se repose sur la détection des variations (polymorphismes) d'une seule base nucléotidique dans les séquences des génomes des souches testées. Cette méthode utilise un panel de dix SNP, sept situés dans des gènes monocopies et trois situés dans un gène multicopie (IS1111). Un total de 9 génotypes SNP ont pu être distingués parmi 28 souches de *C. burnetii* représentant 14 génotypes de MLVA (Huijsmans et al., 2011). La méthode SNP présente l'avantage d'être réalisable avec des échantillons faiblement concentrés en *C. burnetii* (Huijsmans et al., 2011), d'avoir un délai d'exécution court (environ 2 h à compter du moment de l'extraction de l'ADN jusqu'au résultat), d'être effectué dans n'importe quelle machine de PCR en temps réel, ne nécessitant pas d'équipement de séquençage coûteux, sensibles, faciles à exécuter et non ambiguë quant à l'interprétation des résultats (Huijsmans et al., 2011).

### **6.4.4 Micro-array ADN**

Le génotypage par micro-array ADN se base sur l'hybridation du génome à leurs gènes complémentaires de la souche Nine Mile I de référence fixés préalablement sur une puce (Boarbi et al., 2016). Ainsi, 24 isolats ont pu être attribués à sept groupes différents (Beare et al., 2006).

### **6.4.5 Typage par différenciation PCR de la transposase codé sur l'IS1111**

Le typage par amplification et séquençage de la transposase de l'IS1111 a permis la classification de 14 isolats de *C. burnetii* en sept groupes distincts (Denison et al., 2007).

### **6.4.6 Détermination de la méthode de typage la plus discriminante pour *Coxiella burnetii***

La méthode de choix pour le génotypage dépend de son pouvoir discriminatoire. Une valeur numérique est attribuée à chaque méthode à l'aide d'une formule d'index de Simpson modifiée décrite par Hunter et Gaston (Hunter et Gaston, 1988). Cet index de discrimination de Hunter–Gaston (HGDI) est basé sur la probabilité que deux souches qui n'ont aucune parenté et prélevées à partir d'une même population soient classées dans des groupes génotypiques distincts (Hunter and Gaston, 1988 ; Boarbi et al., 2016). La méthode ayant un index HGDI très élevé est considérée comme la plus discriminante (tableau 1). Les principales méthodes de génotypage publiées sont illustrées dans le tableau 1.



**Tableau 1** : Aperçu des principales techniques de génotypage publiées (Boarbi et al., 2016).

Méthodes de génotypage	principe	Index HDGI	Nombre d'isolats testés	Nombres de groupes	références
<b>Séquençage du gène com1</b>	Analyse des différences dans la séquence du gène encodant Com1	ND	21	4	Zhang et al., 1998
<b>Séquençage du gène rpoB</b>	Analyse des différences dans la séquence encodant RpoB	ND	ND	ND	Mollet et al., 1998
<b>Séquençage des gènes com1 et mucZ</b>	Analyse des différences dans la séquence Com1 et MucZ	ND	27	Com1 : 4 MucZ : 5	Sekeyova et al., 1999
<b>Séquençage du gène Icd</b>	Analyse des différences dans la séquence encodant l'Icd	ND	19	3	Van Nguyen et Hirai, 1999
<b>RAPD</b>	Comparaison de la taille des produits d'amplification d'ADN polymorphe	0,9	ND	ND	Rustscheff et al., 2000
<b>MST</b>	Variation de séquences dans de courtes régions intergéniques du génome	0,93	173	30	Glazunova et al., 2005
<b>MLVA</b>	Détermination par PCR du nombre de répétitions en tandem de motifs séquentiels d'ADN répétés	0,99	42	36	Svraka et al., 2006; Arricau-Bouvery et al., 2006
<b>Micro-array ADN</b>	Comparaison de génomes complets	0.71	24	7	Beare et al., 2006
<b>Typage par différenciation PCR de la transposase codé sur l'IS1111</b>	Amplification et séquençage de la transposase de l'IS1111	0,73	14	7	Denison et al., 2007
<b>SNP</b>	Variation d'un seul nucléotide à une position précise du génome	0.74	28	9	Huijsmans et al., 2011

Nota : HGDI, index de diversité de Hunter et Gaston (Hunter and Gaston 1988); ND, non disponible; RAPD, amplification aléatoire d'ADN polymorphe; MST, séquençage de multiples régions intergéniques; MLVA, analyses de plusieurs loci VNTR, répétition en tandem polymorphe; micro-array ADN, génotypage par puce à ADN; PCR, réaction en chaîne de la polymérase; SNP, polymorphisme d'un seul nucléotide.

## 7 Prophylaxie

La prophylaxie de la coxiellose a pour objectifs de lutter contre la maladie animale en réduisant ses conséquences sur le plan clinique et économique, et de lutter contre le risque zoonotique de la fièvre Q en réduisant les contaminations humaines. La prophylaxie peut être de deux ordres : sanitaire ou médical.

### 7.1 Prophylaxie sanitaire

Toutes les mesures sanitaires ne sont pas spécifiques à la fièvre Q et l'efficacité de chacune d'elles pour réduire la transmission de *Coxiella burnetii* entre animaux et troupeaux reste inconnue. En effet, la prophylaxie sanitaire se base sur des mesures offensives dans les élevages infectés, ou défensives dans les élevages indemnes.

#### 7.1.1 Mesures défensives :

- Eviter l'introduction d'animaux de statut sanitaire inconnu (Poncelet, 1993).
- Pratiquer la mise en quarantaine et l'analyse sérologique et moléculaire de la fièvre Q sur tout animal nouvellement introduit (Poncelet, 1993 ; Rousset et al., 2001).
- Utiliser des locaux spécifiques pour la mise bas (Rousset et al., 2001)
- Utiliser des antiparasitaires externes pour lutter contre les tiques (Coche, 1981 ; Rousset et al., 2000).
- Désinfecter les bâtiments d'élevages régulièrement (Rousset et al., 2001).
- Eviter le contact avec d'autres élevages (Rousset et al., 2001).
- Limiter le contact de l'élevage avec d'autres espèces animales considérés comme réservoir (Rousset et al., 2001).

#### 7.1.2 Mesures offensives :

L'objectif principal des mesures offensives est de limiter la dissémination de *C. burnetii* dans l'environnement.

- Réformer des animaux malades qui semblent être excréteurs de la bactérie (Debin, 2007).
- Isoler les femelles qui viennent de mettre bas dans un box spécifique sans induire d'aérosols, loin des autres animaux (Rodolakis, 2009 ; EFSA, 2010 ; OIE, 2018).
- Détruire les placentas et les avortons par incinération (Rodolakis, 2009 ; EFSA, 2010 ; OIE, 2018).
- Eviter l'épandage des fumiers et lisiers pendant les jours venteux, près des habitations et des élevages, dans les mois qui suivent l'épidémie. (Lorthios, 1998 ; Debin, 2007).

- Traiter thermiquement ou chimiquement les fumiers et les lisiers (Lorthios, 1998 ; Arricau-Bouvery et al., 2001 ; Debin, 2007 ; Rodolakis, 2009).

Finalement, les mesures de prophylaxie sanitaire ne sont pas très efficaces car *C.burnetii* diffuse par voie aérienne, est fortement résistante à la dessiccation et possède un nombre important de réservoirs. Par ailleurs, à l'heure actuelle la maîtrise de l'infection fait majoritairement appel à des mesures d'ordre médical.

## 7.2 Prophylaxie médicale

### 7.2.1 Vaccination

La vaccination avec un vaccin efficace peut réellement contrôler la maladie chez les ruminants (EFSA, 2010). L'efficacité de la vaccination par un vaccin en phase I (COXEVAC™) et un en phase II (CHLAMYVAX FQ™) a été comparée chez des chèvres gestantes infectées expérimentalement avec une dose suffisante de *C. burnetii* pour provoquer un avortement ou une naissance prématurée chez 85 % des chèvres du groupe témoin (Arricau-Bouvery et al., 2005). Le vaccin en phase I a empêché l'avortement et réduit considérablement l'excrétion de *C. burnetii* dans le lait, le mucus vaginal et les matières fécales. En revanche, le vaccin en phase II n'a montré aucune différence par rapport au groupe témoin. Par conséquent, le vaccin de phase I a le potentiel de réduire le risque de dissémination de la maladie aux troupeaux proches non infectés (Rodolakis, 2009). L'efficacité du vaccin phase I a également été étudiée chez des vaches naturellement infectées (Guatteo et al., 2008). Si les vaches initialement non infectées avaient été vaccinées pendant la période où elles ne sont pas gestantes, elles avaient cinq fois moins de chances de devenir un excréteur que les vaches recevant un placebo. Par contre si les vaches avaient été vaccinées pendant la gestation, elles avaient la même probabilité de devenir excréteur que les vaches recevant le placebo. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la gestation avait un effet néfaste sur la réponse immunitaire. Le vaccin de phase I induit une réponse immunitaire humorale et cellulaire significative contre les phases I et II de la bactérie. Alors que le vaccin de phase II induit une réponse cellulaire dirigée contre les phases I et II de la bactérie, et une réponse humorale dirigée uniquement contre la phase II.

La vaccination des animaux a été mise en œuvre lors de l'épidémie de 2009 en France et de celle qui a duré de 2007 à 2010 aux Pays-Bas (de Bruin et al., 2012). La vaccination des troupeaux infectés a permis de prévenir l'apparition de signes cliniques et de réduire considérablement les pertes zootechniques dues à la fièvre Q (Guatteo et al., 2008; EFSA,

2010; Guatteo et al., 2012). Cependant, la vaccination préventive (vaccination avant l'infection) est beaucoup plus efficace que la vaccination contre les épidémies (infection avant la vaccination) (EFSA, 2010 ; Selim et Elhaig, 2016). Les inconvénients majeurs du vaccin sont son processus de production compliqué, le besoin de travailler en laboratoire de biosécurité de niveau 3 et l'incapacité de distinguer les animaux vaccinés des animaux infectés, ainsi que la durée de protection vaccinale qui n'est pas encore complètement investiguée à ce jour (Boarbi et al., 2016).

Aujourd'hui, aucun vaccin n'empêche totalement l'excrétion. Le recours à la vaccination permet uniquement de diminuer les conséquences économiques de la maladie et de limiter la transmission de l'agent au sein de l'élevage. La vaccination d'un troupeau doit donc être associée à d'autres mesures de prophylaxie sanitaire adaptées.

### **7.2.2 Antibiothérapie**

Chez les ruminants, l'utilisation d'antibiotiques a pendant un temps été préconisée afin de réduire le nombre d'avortements ainsi que l'excrétion bactérienne par les femelles infectées par la fièvre Q (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005). Les antibiotiques les plus couramment utilisés sont les tétracyclines, et plus particulièrement l'oxytétracycline en raison de sa diffusion intracellulaire (Taurel et al., 2014). Cependant, leur efficacité est aujourd'hui controversée. En effet, il a été montré que l'injection d'oxytétracycline ne permettait pas de réduire le nombre d'avortements ni les charges bactériennes excrétées dans les principales voies d'excrétion connues chez les ovins (Astobiza et al., 2013) et les caprins (Blain, 2006). Chez les bovins, une antibiothérapie est fréquemment appliquée en routine, soit au tarissement pour prévenir un avortement tardif, soit au vêlage pour éviter le pic de l'excrétion. L'utilisation de tétracyclines durant la période de tarissement a permis de réduire l'excrétion bactérienne au moment du vêlage chez les vaches laitières (Taurel et al., 2012) mais n'a pas permis de la diminuer à l'échelle du troupeau lorsque la charge bactérienne est mesurée dans le lait de tank (Taurel et al., 2014). Le protocole le plus utilisé consiste en deux injections d'oxytétracycline (20 mg / kg) au cours du dernier mois de gestation (Arricau-Bouvery et Rodolakis, 2005). Sur la base des connaissances actuelles, le traitement antibiotique chez les ruminants domestiques n'a pas été jugé efficace pour réduire de manière substantielle le niveau ou la durée de l'excrétion des bactéries (EFSA, 2010). Cependant, le développement possible d'une antibiorésistance à la doxycycline a été évoquée chez les ruminants (Rolain et al., 2005).

**DEUXIEME PARTIE : ÉTUDE  
EXPERIMENTALE**

**ÉTUDE DE LA COXIELLOSE BOVINE DANS LA  
RÉGION DE SÉTIF**

## Chapitre I :

Enquête épidémiologique sur la coxiellose chez les vaches de la  
région de Sétif au Nord-Est Algérien

## Chapitre I : Enquête épidémiologique sur la coxiellose chez les vaches de la région de Sétif au Nord-Est Algérien

### 1 Introduction

La fièvre Q chez l'homme ou la coxiellose chez l'animal est une zoonose de distribution mondiale à l'exception de la Nouvelle-Zélande, dont l'agent causal est une bactérie intracellulaire nommée *Coxiella burnetii*. Elle est capable d'infecter un grand nombre d'hôtes, y compris les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les arthropodes (Parker et al., 2006). Cependant, les ruminants domestiques sont considérés comme les principaux réservoirs pour l'infection humaine (Maurin et Raoult, 1999).

Sur le plan clinique, l'infection est généralement asymptomatique chez les ruminants. Cependant, elle se manifeste par des troubles de la reproduction, l'avortement, la mortinatalité, la naissance prématurée et la naissance de nouveau-né faible chez les petits ruminants et par l'infertilité, la métrite, la mammite et occasionnellement des cas d'avortement chez les bovins (Agerholm, 2013; Porter et al., 2011). En effet, *C. burnetii* serait responsable de 1 à 3 % des avortements bovins (Woldehiwet et al., 2004).

Plusieurs enquêtes épidémiologiques ont été menées dans de nombreux pays pour évaluer la prévalence de *C. burnetii* chez les bovins. Celle-ci s'étend de 0 % à 100 % au niveau animal et de 4.4 % à 100 % au niveau du troupeau (Guatteo et al., 2011). En Algérie, Peu d'études sérologiques sur la coxiellose bovine ont été menées dans différentes régions algériennes, ciblant un petit nombre de vaches et adoptant différentes stratégies d'échantillonnage (Dechicha et al., 2010; Abdelhadi et al., 2015; Agag et al., 2017; Derdour et al., 2017 ; Djellata et al., 2019). Actuellement, aucune enquête épidémiologique n'a ciblé la région de Sétif en Algérie. Cependant, Lacheheb et Raoult (2009) ont montré une séroprévalence considérable chez les habitants humains de Sétif (15.5 %), avec une séroprévalence significativement plus élevée chez ceux vivants dans les zones rurales (20 %).

Plusieurs études ont montré que le risque d'infection par *C. burnetii* chez les bovins varie avec les caractéristiques individuelles des animaux telles que l'âge, la parité, la race, le niveau de production laitière, le stade de lactation et la saison (Turcotte, 2015). Les facteurs liés au troupeau, tels que la taille du troupeau, le type de l'exploitation et la pratique du pâturage, peuvent aussi jouer un rôle de facteurs favorisants (Turcotte, 2015). D'où la nécessité d'identifier les facteurs de risque favorisants la transmission de la fièvre Q dans nos élevages bovins.

## 2 Objectifs de l'étude

Dans ce contexte les objectifs de notre travail sont les suivants :

- Déterminer la séroprévalence de *C. burnetii* au niveau individuel et au sein du troupeau dans la wilaya de Sétif.
- Identifier les facteurs de risque potentiellement associés à l'infection par *C. burnetii* chez les vaches dans la région étudiée.
- Estimer la prévalence de *C. burnetii* chez les vaches ayant des antécédents d'avortement et/ou de mortalité néonatale et/ou d'infertilité durant l'année précédente.
- Evaluer l'association entre l'infection des vaches par *C. burnetii* et la présence des antécédents d'avortement et/ou de mortalité néonatale et/ou d'infertilité durant l'année précédente.

## 3 Matériel et méthodes

### 3.1 Description de la région d'étude

#### 3.1.1 Situation géographique

La wilaya de Sétif se situe dans les hautes plaines du Nord-Est Algérien. Elle occupe une position centrale et constitue un carrefour entouré de 6 wilayas. Au Nord, elle est limitée par les wilayates de Bejaia et de Jijel, à l'Est par la wilaya de Mila, au Sud par les wilayates de Batna et M'sila et à l'Ouest par la wilaya de Bordj Bou-Arriidj (figure 7). Elle dispose d'une superficie totale de 6 549 km<sup>2</sup>, soit 0.27 % de la superficie nationale. Sétif se subdivise en 60 communes, et s'étend entre les latitudes 35° 61' et 36° 59' Nord et entre les longitudes 4° 73' et 6° 02 Est.

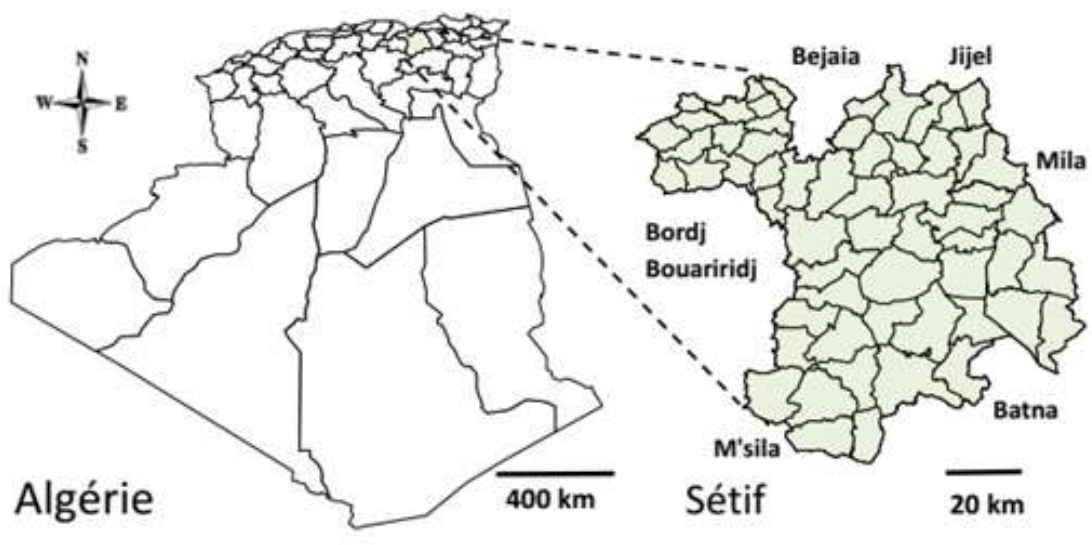


Figure 7 : Localisation géographique de la wilaya de Sétif.



### 3.1.2 Caractères Agropédoclimatiques

#### 3.1.2.1 Relief

Sur le plan relief, la région de Sétif possède trois grandes zones (figure 8) :

- **Zone montagneuse** : constituée de trois masses montagneuses :

Les montagnes de la région Nord (Babor) s'étendant sur une centaine de kilomètres avec une altitude maximale de 2004 m. Les montagnes de Bibans dont l'extrémité orientale couvre le Nord-Ouest de la wilaya et les montagnes du Hodna qui s'étalent sur le Sud et le Sud-Ouest, où l'altitude atteint à Djebel Boutaleb 1890 m. Cette zone occupe plus de 40% de la superficie de la wilaya.

- **Zone des hautes plaines** : c'est une immense étendue, occupant 50 % de la superficie totale de la wilaya, relativement plate dont l'altitude varie de 900 à 1200 m. En effet, malgré ce caractère plat, des mamelons montagneux sont rencontrés dans cette zone (Djebel Youcef et Braou).

- **Zone de dépression Sud et Sud-Est** : située dans le Sud et le Sud-Est de la wilaya, où l'altitude dépasse rarement les 900 m. Cette zone pratiquement plate couvre une superficie de 10 % de l'espace de la wilaya et se caractérise par la présence des `chotts' ou dépression salées.

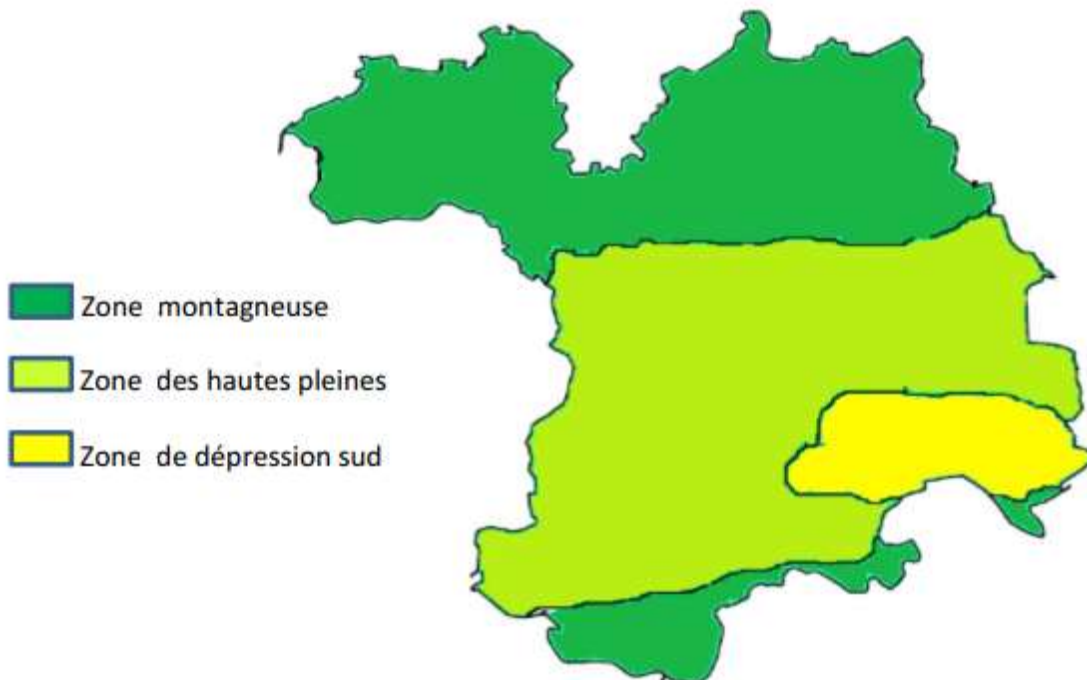


Figure 8 : Relief de la wilaya de Sétif.

### 3.1.2.2 Climat

La structure des reliefs a ses conséquences sur le climat de la région. Les montagnes de Babor à l'extrême Nord sont les plus arrosées recevant annuellement plus de 700 mm de précipitations. Cette formation montagneuse provoque le blocage des influences maritimes en réduisant ainsi le taux de précipitation qui se situe à 400 mm au Centre et à moins de 200 mm à l'extrême Sud. Ces précipitations sont caractérisées par l'irrégularité dans le temps et l'espace. Généralement, les étés sont chauds et secs et les hivers froids et rigoureux. La température dépasse souvent 40 °C en été et tombe en dessous de 0 °C en hiver. Il est à noter aussi que la région de Sétif est caractérisée par la longueur de la période de gelée qui peut aller jusqu'à 45 jours par an (novembre vers mai), et des vents de siroco pendant la saison estivale.

### 3.1.3 Description du mode d'élevage bovin

La wilaya de Sétif possède approximativement 161 952 têtes bovines dont 79 659 sont des vaches laitières (Direction des services agricoles de la wilaya de Sétif, 2015). L'espèce bovine est subdivisée en trois catégories :

- **Le BLM** (bovin laitier moderne), composé principalement de races européennes notamment la Montbéliarde, la Holstein, la Fleckvieh et la Brune des Alpes. Il présente un effectif de 33 % (DSAWS, 2015).
- **Le BLA** (bovin laitier amélioré), constitué des populations issues de croisement anarchique entre les races importées et les races locales ainsi que les races importées entre elles-mêmes. Il présente un effectif de 47 % (DSAWS, 2015).
- **Le BLL** (bovin laitier local), constitué de la race locale qui regroupe sous la dénomination « Brune de l'Atlas », 4 rameaux importants (la Guelmoise, la Cherfa, la Chélifienne et la Sétifienne). Il présente un effectif de 20 % (DSAWS, 2015).

Le mode d'élevage est généralement de type semi-intensif. Les animaux sont nourris au foin, au son et à l'herbe pendant la saison de pâturage. Celle-ci va de mars à décembre avec des variations suivant les conditions climatiques.

## 3.2 Conception de l'étude

### 3.2.1 Étude épidémiologique de type transversale (cross-sectional study)

Durant la période allant de mars 2016 à avril 2018, nous avons réalisé une enquête épidémiologique de type transversale (cross-sectional study) pour déterminer la séroprévalence et les facteurs de risque associés à la coxiellose chez les vaches dans la wilaya

de Sétif. Cette étude a ciblé un nombre important de vaches âgées de moins de 24 mois, sélectionnées par une méthode d'échantillonnage aléatoire simple auprès de la population bovine de la région de Sétif.

Tout d'abord, pour estimer le nombre d'animaux échantillonnés, nous avons utilisé la formule d'échantillonnage aléatoire simple recommandée par Thrusfield (Thrusfield, 2007) :

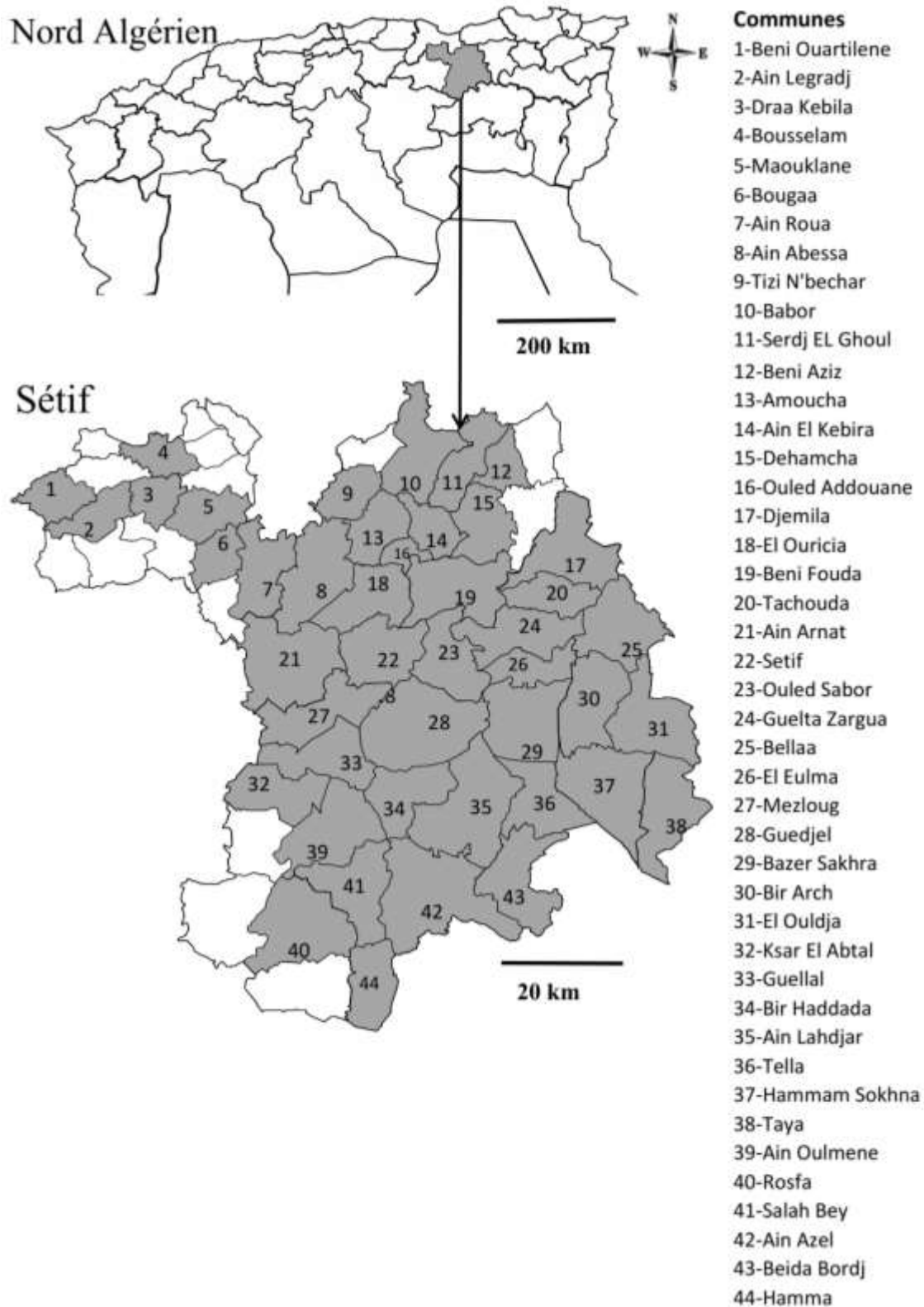
$$N = \frac{(1.96)^2 P(1-P)}{L^2}$$

Où N est la taille de l'échantillon, 1.96 est la valeur Z pour le niveau de confiance sélectionné (95 %), P est la prévalence individuelle de la maladie et L est la précision absolue souhaitée. Une taille d'échantillon minimale de 600 animaux a été obtenue en utilisant une prévalence individuelle attendue de 50 % (puisque'il n'y avait aucune étude précédente dans cette zone), une précision absolue de 4 % et un niveau de confiance de 95 %. Cependant, au total 678 animaux ont été inclus dans cette étude pour augmenter la précision.

Deuxièmement, pour déterminer le nombre minimal de vaches à sélectionner dans chaque troupeau laitier, nous avons adopté la formule décrite par Thrusfield (Thrusfield, 2007):

$$n = \left[ 1 - (1 - p)^{1/d} \right] \times \left( N - d/2 \right) + 1$$

Où «n» est la taille de l'échantillon, «p» est la probabilité de détection au moins une vache séropositive, «N» est la taille du troupeau et «d» est le nombre de vaches séropositives dans le troupeau. La probabilité de détecter au moins une vache séropositive dans un troupeau a été déterminée à 95 % et le nombre de vaches séropositives dans chaque troupeau «d» a été calculé en supposant une prévalence intra-troupeau de 25 % (Carbonero et al., 2015; Guatteo et al., 2011). À cette fin, une taille d'échantillon minimale de 11 animaux par troupeau a été déterminée. Dans les fermes comptant jusqu'à 11 animaux, tous les animaux étaient inclus. Enfin, 90 troupeaux contenant 678 vaches localisées dans quarante-quatre communes de la wilaya de Sétif ont été sélectionnés au hasard (figure 8). Le nombre des animaux et les troupeaux prélevés dans chaque commune sont présentés dans le tableau 2. Les troupeaux et les animaux au sein de chaque troupeau ont été sélectionnés de manière aléatoire à l'aide de la fonction ALEA du Microsoft Excel® 2013. Dans le cas où le propriétaire du troupeau sélectionné a refusé de participer, nous avons recherché le troupeau le plus proche.



**Figure 9** : Carte de la région de Sétif au Nord-Est de l'Algérie, illustrant les communes (zone grise) où des échantillons de sang ont été prélevés pour la détection de l'infection à *Coxiella burnetii* chez les vaches.

**Tableau 2** : Distribution de vaches prélevées par troupeau et par commune.

Communes	No. de troupeaux échantillonnés	No. de vaches prélevées
1-Beni Ouartilene	1	5
2-Ain Legradj	1	5
3-Draa Kebila	1	4
4-Bousselam	1	6
5-Maouklane	1	4
6-Bougaa	2	10
7-Ain Roua	2	17
8-Ain Abessa	5	46
9-Tizi N'bechar	1	7
10-Babor	2	15
11-Serdj EL Ghoul	2	12
12-Beni Aziz	1	6
13-Amoucha	2	17
14-Ain El Kebira	3	20
15-Dehamcha	1	4
16-Ouled Addouane	2	14
17-Djemila	2	18
18-El Ouricia	3	24
19-Beni Fouda	4	29
20-Tachouda	3	29
21-Ain Arnat	4	31
22-Setif	2	18
23-Ouled Sabor	2	12
24-Guelta Zargua	2	15
25-Bellaa	2	15
26-El Eulma	4	28
27-Mezloug	4	33
28-Guedjel	2	19
29-Bazer Sakhra	4	34
30-Bir Arch	2	15
31-El Ouldja	1	9
32-Ksar El Abtal	1	8
33-Guellal	2	17
34-Bir Haddada	1	5
35-Ain Lahdjar	2	19
36-Tella	3	21
37-Hammam Sokhna	3	26
38-Taya	2	10

**Tableau 2** (suite) : Distribution de vaches prélevées par troupeau et par commune.

Communes	No. de troupeaux échantillonnés	No. de vaches prélevées
39-Ain Oulmene	1	7
40-Rosfa	1	6
41-Salah Bey	1	7
42-Ain Azel	1	6
43-Beida Bordj	2	15
44-Hamma	1	10
<b>total</b>	<b>90</b>	<b>678</b>

### 3.2.2 Étude épidémiologique de type cas-témoin (case-control study)

Dans la présente enquête, nous avons ciblé toutes les exploitations ayant des antécédents d'avortement (n=14) et / ou de mortalité néonatale (n=6) et / ou d'infertilité (n=16) durant l'année passée, soit 26 au total. Des échantillons de sang total provenant de 186 vaches ont été analysés par des outils moléculaires pour rechercher la présence de *C. burnetii*. Le but est de comparer la prévalence de la coxiellose chez les vaches présentant des troubles décrit ci-dessus (cas) et chez celles n'ayant pas connu ce genre de problème (témoin).

### 3.3 Échantillonnage

Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine coccygienne dans des tubes secs (sans anticoagulants) et EDTA (avec anticoagulants), à l'aide d'aiguilles jetables, puis transportés sous froid jusqu'au laboratoire. Chaque tube a été identifié par un code portant l'abréviation de la commune, le numéro sérique de l'exploitation et le numéro sérique de l'animal prélevé. Les sérums ont été séparés par centrifugation des tubes secs à 1000 x g pendant 10 min, puis, conservés dans des tubes Eppendorf au congélateur à -20 °C. Tandis que les tubes d'EDTA ont été congelés directement à -20 °C. Le matériel nécessaire à la procédure d'échantillonnage est décrit en annexe 1.

### 3.4 Questionnaire épidémiologique

Un questionnaire bien structuré mettant l'accent sur les facteurs de risque potentiellement associés à l'infection par *C. burnetii* a été remis aux propriétaires d'exploitations le jour du prélèvement. Le questionnaire est divisé en deux parties:

la première partie concerne les caractéristiques de l'exploitation et la gestion du troupeau comme le mode d'élevage (intensif ou semi-intensif), la taille du troupeau ( $\leq 11$  de vaches ou  $>$  de 11 vaches), le type de production (laitière ou mixte), l'utilisation de désinfectants (oui ou

non), le contact avec d'autres troupeaux (oui ou non), la source d'eau (eau de puits ou eau du robinet), la présence de tiques (oui ou non), la présence de petits ruminants (oui ou non), la présence d'équidés (oui ou non), la présence de chiens (oui ou non), présence de chats (oui ou non), le type de reproduction (seulement l'insémination artificielle, ou seulement la monte naturelle, ou les deux), l'utilisation de box de vêlage (oui ou non) et le mode de traite (mécanique ou manuelle).

La seconde partie porte sur les caractéristiques individuelles et les troubles de la reproduction recueillis chez chaque vache, tels que la race (les races importées; Holstein, Montbéliarde et Fleckvieh.....ex, ou les races locales à dominance brune d'atlas, ou les races croisées entre races importées, et les races locales), l'âge en années ( $> 2 - \leq 5$  ou  $> 5 - \leq 8$  ou  $> 8$ ), l'origine de la vache (née dans la ferme ou achetée), les antécédents d'avortement au cours de l'année précédente (oui ou non), les antécédents de mortalité néonatale au cours de l'année précédente (oui ou non) et les antécédents d'infertilité au cours de l'année précédente (oui ou non).

### **3.5 Analyse des échantillons**

Les analyses sérologiques et moléculaires ont été réalisées au niveau du laboratoire des zoonoses de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Sardegna G. pegreffi, Sassari, Italie. Le matériel et les réactifs utilisés pour l'analyse sérologique et moléculaire sont présentés respectivement en annexe 2 et 3.

#### **3.5.1 Analyse sérologique**

La détection des anticorps dirigés contre les antigènes en phase I et en phase II de *C. burnetii* dans chaque échantillon du sérum bovin a été réalisé par la technique ELISA indirecte à l'aide du kit commercial «ID Screen Q Fever Indirect Multi-species Kit» (ID.vet Innovative Diagnostics, Grabels, France) selon le protocole prescrit par le fabricant (annexe 04). Cette technique ELISA utilise des plaques de microtitrage à 96 puits qui ont été sensibilisées par des antigènes natifs isolés d'un placenta de vaches ayant avorté et purifiées à partir de cultures de *C. burnetii* phases I et II. Le rapport de validation interne du fabricant indique une spécificité de 100 % sur la base des résultats sérologiques négatifs obtenus sur 167 sérums bovins de cheptels bretons indemnes (aucun avortement n'a été enregistré pendant trois ans et aucun résultat positif n'a été obtenu, ni par ELISA ni par fixation du complément au cours des trois dernières années) et une sensibilité de 100 % basée sur des résultats sérologiques positifs sur 52 sérums de vaches ayant avorté et séropositives par fixation du complément ou positif par PCR sur placenta.

Les anticorps spécifiques de *C. burnetii* éventuellement présents dans les échantillons du sérum se lient à l'antigène. Après lavage, un conjugué anti-multi-espèces marqué à la peroxydase est ajouté pour se fixer sur les anticorps préalablement fixés sur les microcupules. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage avant addition d'un substrat chromogène (TMB). L'apparition d'une coloration est la conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase du conjugué. En présence d'anticorps, une coloration bleue apparaît et devient jaune après l'ajout de la solution d'arrêt. L'intensité de la coloration de chaque puits est proportionnelle aux taux d'anticorps anti-*C. burnetii* présents dans l'échantillon dilué. Après arrêt de la réaction, la lecture des résultats (densité optique) est réalisée par un lecteur de plaques ELISA (BioTEK MQX200 UQuant, Winooski, 132 Vermont, USA) à 450 nm en monochromatisme. Cet instrument est couplé à un ordinateur piloté par le logiciel GEN 5<sup>TM</sup> version 2.00 (BioTEK, Winooski, 132 Vermont, USA). Ce dernier assure l'acquisition de données brutes à partir de lecteur de plaques ELISA, leur traitement et leur exportation rapide vers un document Excel<sup>TM</sup>. Les sérums de contrôle positif anti-*C. burnetii* sont fournis avec le kit.

Le ratio échantillon/positif (E/P %) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{E/P \%} = [(\text{DO échantillon} - \text{DO contrôle négatif}) / (\text{DO contrôle positif} - \text{DO contrôle négatif})] \times 100.$$

Un échantillon était considéré négatif lorsque le ratio échantillon/positif E/P%  $\leq 40$  %, douteux lorsque  $40 \% < \text{E/P \%} \leq 50$  %, et positif lorsque  $\text{E/P \%} > 50$  %. Les résultats douteux ont été considérés comme négatifs dans cette étude. Pour plus de détail concernant le mode opératoire et l'interprétation des résultats du kit ELISA utilisé, voir l'annexe 4.

### **3.5.2 Analyse moléculaire**

Cent quatre-vingt-six (n=186) échantillons de sang total provenant de 26 exploitations bovines ayant des troubles de la reproduction (antécédents d'avortement, mortalité néonatale et infertilité) ont été analysés par des outils moléculaires pour détecter la présence de *C. burnetii* chez les vaches laitières de la présente région.

#### **3.5.2.1 Extraction d'ADN du sang**

L'ADN génomique a été extrait du sang à l'aide du kit commercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), conformément aux recommandations du fabricant.



### 3.5.2.1.1 Principe de kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Allemagne)

Ce kit permet l'extraction des acides nucléiques grâce à une membrane de silice à l'intérieur de mini colonnes de centrifugation. La matrice en silice est capable de fixer sélectivement l'ADN en condition de force ionique élevée, c'est-à-dire en  $\text{pH} \leq 7$  (éthanol) et en présence de sels chaotropiques qui assure la dénaturation des molécules d'acides nucléiques. Les protéines, les lipides et les polysaccharides présents dans la préparation passent à travers la membrane. Les impuretés sont éliminées par des lavages et les ADN sont élués dans une solution en force ionique faible c'est-à-dire en  $\text{pH} \geq 7$  (Tampan AE). Cette méthode est rapide et simple. Elle permet d'obtenir des ADN purs jusqu'à 30 – 50 kb.

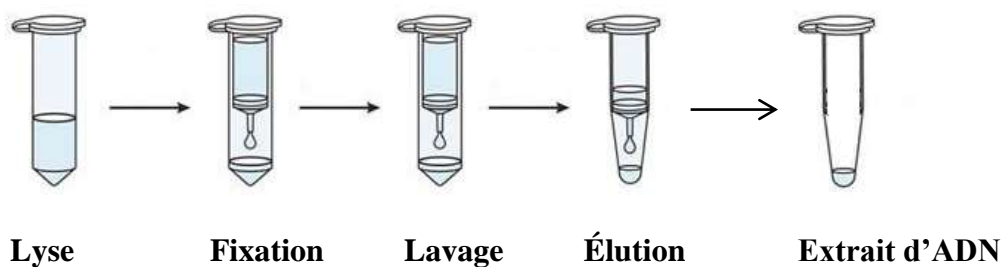
L'extraction d'ADN avec le DNeasy Blood and Tissue consiste de 4 étapes (figure 10).

1-Lyse: le sang est lysé sous conditions dénaturantes à température élevée et en présence de protéinase K et de tampon de lyse (AL). Cette étape permet de casser le matériel cellulaire et de libérer ainsi le génome bactérien.

2- Fixation: l'ADN de l'échantillon lysé est fixé sur la membrane de silice dans la colonne en présence de l'éthanol et le reste du lysat passe à travers la membrane de la colonne par centrifugation.

3-Lavage: la membrane de silice est lavée par les Tampons AW1 et AW2 pour éliminer tout ce qui a pu rester accrocher à la colonne mais qui n'est pas du matériel génétique.

4-Élution: l'ADN fixé sur la membrane est élué avec un petit volume de Tampon AE pour obtenir le matériel génétique.



**Figure 10** : Les étapes de l'extraction d'ADN.

### 3.5.2.1.2 Mode opératoire

#### 3.5.2.1.2.1 Préparation

-Préparation des échantillons à extraire (numérotation). Pour chaque lot de 23 échantillons, ajouter un "contrôle d'extraction (N° 24).

-Marquer les tubes, colonnes ou autres récipients à identifier.

- Nettoyer et décontaminer le cabinet d'extraction par irradiation avec la lumière UV pendant 30 min.
- Nettoyer la paillasse avec une solution hypochlorite à 2 %.
- Équilibrer le Tampon AE à température ambiante.
- Vérifier si le Tampon AL ne contient pas de précipitation. Si nécessaire, dissoudre les précipitations en chauffant le tampon à 56 °C pendant 5 min jusqu'à ce que les précipités soient complètement dissous. Garder à température ambiante pendant 1 an.
- Les tampons AW1 et AW2 sont fournis sous forme concentrés. Avant la première utilisation, ajouter une quantité appropriée d'éthanol (96-100 %) comme indiquée sur le flacon pour obtenir une solution de travail.
- Mélanger le tampon AW1 avant utilisation en inversant plusieurs fois.
- Ajuster la température du premier bain-marie ou bloc chauffant à 56 °C et du deuxième à 70 °C.

#### **3.5.2.1.2.2 Extraction**

- 1-Pipeter 20 µl de protéinase K dans des tubes Eppendorf 2 ml, ajouter 100 µl de sang total et compléter avec Phosphate-Buffered Saline (PBS) pour atteindre un volume total de 220 µl.
  - 2-Ajouter 200 µl de tampon de lyse AL (sans éthanol ajouté) puis bien mélanger le tout en vortexant et incubé à 56 °C pendant 10 min.
  - 3-Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100 %) aux échantillons puis bien mélanger le tout en vortexant.
  - 4-Pipeter le mélange obtenu à l'étape 3 dans une colonne DNeasy Mini spin placé sur un tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen. Centrifuger à 6000 x g (8000 T/min) pendant 1 min. Jeter l'éluât et le tube de collection.
  - 5-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un nouveau tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen, ajouter 500 µl de Tampon AW1 et centrifuger à ~ 6000 x g (8000 T/min) pendant 1 min. Jeter l'éluât et le tube de collection.
  - 6-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un nouveau tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen, ajouter 500 µl de Tampon AW2 et centrifuger à 20000 x g (14000 T/min) pendant 3 min pour sécher la membrane. Jeter l'éluât et le tube de collection.
  - 7-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un tube 1.5 ml propre (non fourni par Qiagen), et pipeter 200 µl de Tampon AE directement sur la DNeasy membrane. Incuber à la température ambiante pendant 1 min, et centrifuger 1 min à ~ 6000 x g (8000 T/min).
- Recommandation : répéter l'étape 7 pour un maximum de production d'ADN.

### 3.5.2.1.2.3 Conservation

Les ADN extraits dans des tubes 1.5 ml sont conservés dans des congélateurs à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

### 3.5.2.1.2.4 Déchets et nettoyage

- Déposer tout le matériel à usage unique dans un conteneur pour déchets contaminés.
- Nettoyer la paillasse avec une solution d'hypochlorite à 2 %.
- Décontaminer le cabinet d'extraction par irradiation UV pendant 30 min.

### 3.5.2.2 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

Cette méthode permet de générer des dizaines de milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN particulier à partir d'un extrait d'ADN (ADN matriciel). L'extrait d'ADN a été examiné pour rechercher la présence de *C. burnetii* par PCR classique qui a ciblé un fragment du gène correspondant à l'élément d'insertion IS1111, d'une taille de 154 paires de bases (pb), en utilisant une couple d'amorces IS1111F (forward) 5'-CAAGAAACGTATCGCTGTGGC-3' et IS1111R (reverse) 5'-CACAGAGAGCCACCGTATGAGA-3' (Rolain et al., 2005; Mediannikov et al., 2010; Subramanian et al., 2012).

#### 3.5.2.2.1 Préparation du mélange réactionnel

Le volume final du mélange réactionnel de PCR est préparé par 24 réactions. La composition de ce mélange est détaillée dans le tableau 3

**Tableau 3** : Composition de mélange réactionnel de PCR.

Réactifs	Volume par réaction de 20 µL	Volume par 24 réactions
Eau Ultra Pure sans DNase et RNase (eau distillée stérile)	5.5 µL	132 µL
Master Mix Quantitech (Qiagen, Hilden, Allemagne)	12.5 µL	300 µL
Amorce sens (Forward)	1 µL	24 µL
Amorce anti-sens (Reverse)	1 µl	24 µL
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>	<b>480 µL</b>

Le mix est distribué à raison de 20 µl pour chaque tube PCR, auquel est rajouté 5 µl d'ADN de chaque échantillon en mélangeant ainsi par pipetage successif, pour obtenir un volume total de 25 µl par tube.

Pour chaque analyse de 24 échantillons, nous avons inclus un témoin positif (5 µl d'extrait d'ADN issue de placentas d'une brebis infectée plus 20 µl de mix) et un témoin négatif (5 µL d'eau distillée stérile plus 20 µl de mix).

### **3.5.2.2.2 Protocole de la PCR**

Les tubes PCR sont placés dans un thermocycleur automatique (SimpliAmp™ Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Singapour) qui est lancé selon le programme de PCR suivant: un cycle de pré-dénaturation à 95 °C pendant 15 min, suivi par 40 cycles de l'amplification de l'ADN d'intérêt comprenant chacun 1 min de dénaturation à 94 °C, 30 s d'Hybridation des amorces à 62 °C et 1 min de polymérisation à 72 °C, et un dernier cycle de post-polymérisation à 72 °C pendant 5 min.

### **3.5.2.2.3 Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5 % dans une cuve à électrophorèse contenant SYBR Safe DNA (Thermo Fisher™ Applied Biosystems™ Waltham, MA, USA), puis visualisés sous un transilluminateur à ultraviolet, et photographiés.

#### **3.5.2.2.3.1 Préparation du tampon TAE 1X**

Le tampon TAE 1x est utilisé pour la préparation du gel d'agarose et le bain d'électrophorèse. Ainsi, un volume de 1000 ml du tampon TAE 1x a été préparé en rajoutant 900 ml d'eau distillée à 100 ml de tampon TAE 10x en solution (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

#### **3.5.2.2.3.2 Préparation du gel d'agarose**

-Dans une fiole Erlenmeyer, mélanger 1.5 g de poudre d'agarose (BioReagent, for molecular biology, low EEO, Sigma-Aldrich Roche diagnostics GmbH Allemagne) en utilisant une balance de précision (OHAUS®) avec 100 ml du tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) 1X.

-Faire fondre le mélange au four à micro-ondes jusqu'à l'obtention d'un mélange parfaitement transparent.

-Laisser refroidir.

-Verser le gel préparé dans un verre gradué utilisé pour le coulage du gel contenant 4 µl de SYBR Safe DNA (Thermo Fisher™ Applied Biosystems™ Waltham, MA, USA) et mélanger bien. SYBR Safe DNA est une molécule qui s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN. Lorsqu'elle est ajoutée au gel d'agarose et qui sous les rayons UV s'excite et fluoresce, ce qui va permettre de visualiser l'ADN dans le gel sous forme de bande.

-Couler le gel dans le support du gel après avoir mis les peignes.

-Laisser refroidir jusqu'à solidification de gel à température ambiante.

### **3.5.2.2.3.3 Electrophorèse des produits d'amplification**

- Retirer les peignes après solidification du gel.
- Placer le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Remplir la cuve d'électrophorèse avec le tampon TAE 1X (le gel doit être totalement émergé).
- Déposer 4µl de DNA marqueur de poids moléculaire (DNA Molecular Weight Marker VIII, Sigma-Aldrich Roche diagnostics GmbH Allemagne) dans le premier puits. Ce marqueur a été utilisé pour détecter la présence ou l'absence des bandes spécifiques. Une bande a été dite spécifique lorsqu'elle apparaît au niveau de la taille attendue.
- Prendre un morceau de Parafilm sur lequel est mélangé 8µl de chaque échantillon avec 2 µl de tampon de charge (Gel Loading Buffer for NA electrophoresis, Sigma-Aldrich Roche diagnostics GmbH Allemagne) qui assure le maintien du dépôt en immersion dans le puit et permet la visualisation de la migration.
- Déposer le produit amplifié avec un témoin négatif et un témoin positif dans les puits.
- Fermer le couvercle de la cuve et brancher la cuve au générateur à de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-).
- Mettre l'alimentation sous tension à 120 Volt et régler la durée de migration à environ 40 min.

### **3.5.2.2.4 Révélation des bandes d'ADN aux rayons UV**

Le gel d'agarose est ensuite exposé sous rayons ultra-violet pour visualiser les bandes d'ADN à l'aide d'un transilluminateur à UV (UVITEC Cambridge, UK). La présence de la bande correspond au fragment amplifié a été comparé avec le marqueur de poids moléculaire et celui du témoin positif. Les gels sont photographiés grâce à un appareil photo connecté à un ordinateur et l'image est enregistré sou format JPG.

## **3.5.2.3 Purification des produits de PCR**

### **3.5.2.3.1 Principe de la purification des produits de PCR**

L'étape de purification est une étape importante avant de séquencer un échantillon. En effet, elle permet de nettoyer l'échantillon de tous les résidus des PCR précédentes (amorces, dNTP, etc...) susceptibles d'inhiber la réaction de séquençage. Le kit QIAquick Spin PCR purification (Qiagen, Hilden, Allemagne), a été utilisé en suivant les recommandations du fabricant. À l'instar du kit d'extraction d'ADN, ce kit de purification d'ADN utilise colonnes de centrifugation contenant des membranes en silice qui sont capable de fixer sélectivement

les ADN en présence de fortes concentrations en sels. Les impuretés sont éliminées par des lavages, et les ADN sont élués en présence de faibles concentrations en sels (figure 11).



**Figure 11** : Principe de purification de l'ADN.

### 3.5.2.3.2 Mode opératoire du kit de purification des produits de PCR

#### 3.5.2.3.2.1 Préparation

- Ajoutez de l'éthanol (96–100 %) au tampon de lavage PE avant utilisation.
- Toutes les étapes de centrifugation sont effectuées à 17 900 x g (13 000 T/ min) dans une microcentrifugeuse de table classique à température ambiante.

#### 3.5.2.3.2.2 Purification

- Ajouter 5 volumes de tampon PB à 1 volume de l'échantillon de PCR et mélanger.
- Placez la colonne (QIAquick spin column) dans un tube de prélèvement fourni avec le kit de 2 ml.
- Pour lier l'ADN, appliquez l'échantillon sur la colonne et centrifugez pendant 30 à 60 s.
- Jeter l'éluât. Placez la colonne dans le même tube.
- Pour laver, ajouter 0.75 ml de tampon PE à la colonne et centrifuger pendant 30 à 60 s.
- Jeter l'éluât et replacer la colonne dans le même tube. Centrifuger la colonne pendant 1 min supplémentaire.
- Placez la colonne QIAquick dans un microtube propre de 1.5 ml.
- Pour éluer l'ADN, ajouter 50 µl de tampon EB ou d'eau (pH 7.0–8.5) au centre de la membrane QIAquick et centrifuger la colonne pendant 1 min. Sinon, pour augmenter la concentration en ADN, ajoutez 30 µl tampon EB au centre de la membrane QIAquick, laissez la colonne pendant 1 min, puis centrifugez.

### **3.5.2.4 Séquençage**

Le séquençage a pour but de confirmer les résultats positifs du PCR.

### **3.5.2.5 Principe du séquençage**

Le recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase dépendante d'ADN est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5'-3'. L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTP: déoxynucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5' phosphate du dNTP suivant. La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu. Dans le milieu réactionnel il y a compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la taq polymérase pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles. Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel très résolutif (polyacrylamide) va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille). Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial. Le séquenceur automatique intègre les données de migration et les transforme en électrophorégrammes sous forme de pics de couleurs différentes correspondant aux séquences nucléotidiques des fragments d'ADN synthétisés.

### **3.5.2.6 PCR séquence**

Dans notre étude, les produits PCR purifiés ont été séquencés grâce à un instrument d'électrophorèse à 4 capillaires (Genetic Analyzer ABI 3130, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) en utilisant le kit Big Dye Terminator (dRhodamine Terminator cycle sequencing ready reaction ; Applied Biosystems). Ce kit comprend :

-Le Terminator Ready Reaction Mix qui contient les réactifs suivants : les dNTPs, les ddNTPs, MgCl<sub>2</sub>, un tampon Tris HCL pH=9 et l'AmpliTaq polymérase.

- ADN de contrôle double brin : 0.2 µg/µl.
- Amorce de contrôle (sens) : 0.8 pmol/µl.

La réaction de séquençage est réalisée dans deux directions. À cet effet, nous avons utilisé deux tubes différents, un contenant le Forward et l'autre contenant le Reverse, dans un volume final de 20 µl. Le mélange réactionnel comprend entre 10 µl de produit d'amplification purifié, 2 µl d'eau UP, 2 µl de l'amorce choisie, 4 µl du tampon de séquence (Applied Biosystems) et 2 µl du Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems). Ces mélanges sont ensuite déposés dans un thermocycleur et soumis au programme suivant : 1 min de dénaturation à 96°C, puis 25 cycles composés de 10 s de dénaturation à 96 °C, 5 s d'hybridation à 61 °C et 2 min d'élongation à 60 °C. Les produits d'amplification sont ensuite conservés à 4 °C.

### **3.5.2.7 Purification des produits de séquençage**

#### **3.5.2.7.1 Principe de purification des produits de séquençage**

La séquence obtenue a été purifiée à l'aide d'une colonne Séphadex G50 (Sigma-Aldrich Roche diagnostics GmbH Allemagne). La chromatographie d'exclusion va permettre le piégeage de particules de bas poids moléculaire sur une colonne Sephadex G50 constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre déterminé (de 20 à 50µm). Les petites particules de diamètre inférieur à ceux-ci entrent et sont piégées. A l'inverse les grosses vont passer autour et être éluées très rapidement. La réaction de séquence est purifiée par chromatographie pour piéger les ddNTP libres, en excès. En effet ces ddNTP libres non incorporés lors de la réaction pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques. Les sels éventuellement présents sont piégés de la même manière que les ddNTP.

#### **3.5.2.7.2 Mode opératoire de purification des produits de séquençage**

La purification s'effectue sur colonnes de résine Sephadex® G50 dans les plaques à filtre MultiScreen.

- Charger la résine sèche Sephadex® G-50 fine (poudre) dans les puits d'une plaque MultiScreen HV.
- Ajouter 300 µl d'eau UP dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incuber 3 heures à température ambiante.
- Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits.



- Centrifuger les plaques deux fois à 17000 T/min pendant 2 min pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.
- Déposer 20 µl de produits de PCR au centre des puits de plaque à filtre.
- Placer la plaque MultiScreen HV sur une deuxième plaque pour récupérer le produit à centrifuger.
- Centrifuger la plaque à 17000 T/min pendant 2 min.
- Récupérer les produits de séquençage d'ADN purifié.

### **3.5.2.8 Analyse des produits de séquençage**

Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel ABI PRISM DNA Sequencing Analysis version 3.0 (Applied BioSystems), assemblées et éditées à l'aide du logiciel ChromasPro (version 2.2 ; Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Queensland, Australia), et comparées aux séquences disponibles dans la base de données GenBank en utilisant l'algorithme BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## **3.6 Analyses statistiques**

L'analyse statistique des données recueillies à partir du questionnaire et des résultats des analyses du laboratoire a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS v25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### **3.6.1 Étude épidémiologique de type transversale (cross-sectional study)**

#### **3.6.1.1 Prévalence et Séroprévalence**

La séroprévalence apparente (PA) au niveau individuel a été estimée en divisant le nombre des vaches séropositives sur le nombre total de vaches testées. La séroprévalence des troupeaux a été calculée par la division du nombre de troupeaux séropositifs sur le nombre total de troupeaux ayant fait l'objet de l'enquête. Un troupeau est considéré séropositif lorsqu'il contient au moins une vache séropositive. Ces valeurs ont été mesurées avec un intervalle de confiance de 95 %.

#### **3.6.1.2 Analyse des facteurs de risque**

L'analyse des facteurs de risque potentiellement associés à la séropositivité vis-à-vis de *C. burnetii* a été évaluée en deux étapes. Tout d'abord, nous avons effectué une analyse univariable de chaque variable à l'aide d'un test du khi-deux, et les variables présentant  $p \leq 0.25$  ont été soumises à une analyse de régression logistique multivariable. Le modèle a été développé selon une approche pas à pas descendant, utilisant à chaque étape un test de rapport de vraisemblance avec 0.05 comme seuil de significativité pour l'entrée et 0.1 pour le retrait

des variables. Toutes les variables avec un  $p < 0.05$  ont été considérées comme statistiquement significatives. L'ajustement du modèle a été évalué par le test d'adéquation d'Hosmer et Lemeshow (Hosmer et Lemeshow, 2000). Le test de corrélation de Spearman a été utilisé pour vérifier une corrélation entre les variables indépendantes et si une colinéarité plus élevée (coefficient de corrélation  $> 0.9$ ) était trouvée entre ces variables, l'une d'elles était exclue de l'analyse multivariable en prenant en considération la plausibilité biologique (Dohoo et al., 1996). Une variable est considérée comme un facteur de confusion si sa suppression a modifié le coefficient de régression des autres variables de plus de 25 %. Enfin, toutes les interactions possibles entre deux variables ont été testées pour déterminer leur signification ( $p \leq 0.05$ ). Enfin, pour chaque variable indépendante qui est significative ( $p < 0.05$ ) dans le modèle finale de régression logistique binaire, l'odds ratio (OR) ajusté et son intervalle de confiance (IC à 95 %); et le coefficient de régression logistique (B) et son écart type (ES) ont été calculés et interprétés comme suit (Thrusfield, 2007):

- Lorsque  $OR > 1$  et son [IC à 95 %] exclut la valeur 1, ou  $B > 0$  et son  $[B \pm 1.96 \times ES]$  exclut la valeur 0: la variable est considérée comme facteur de risque.
- Lorsque  $OR < 1$  et son [IC à 95 %] exclut la valeur 1, ou  $B < 0$  et son  $[B \pm 1.96 \times ES]$  exclut la valeur 0: la variable est considérée comme facteur de protection.

### 3.6.2 Étude épidémiologique de type cas-témoin (case-control study)

Dans cette enquête, nous avons calculé les paramètres suivants :

#### 3.6.2.1 Odds ratio (OR)

La force d'association entre la positivité à l'ADN de *C. burnetii* et la présence d'antécédents d'avortement, d'infertilité et de mortalité néonatale a été mesurée par le biais du test du Khi-deux de Pearson ( $\chi^2$ ) et de l'odds ratio (OR) avec calcul d'un intervalle de confiance à 95 % (IC). En se basant sur un risque de première espèce  $\alpha$  égal à 0.05. La variable est considérée comme facteur de risque lorsque l'OR et la valeur de  $p$  ( $\chi^2$ ) sont significatifs ( $OR > 1$  et valeur de  $p < 0.05$ ) (Toma et al., 2001). L'interprétation de l'odds ratio (OR) se fait de la façon suivante :

- $OR = 1$ ,  $p$  ( $\chi^2$ )  $> 0.05$  ou [IC à 95 %] incluant la valeur 1 : absence de relation entre le facteur de risque et la maladie.
- $OR > 1$ ,  $p$  ( $\chi^2$ )  $< 0.05$  ou [IC à 95 %] excluant la valeur 1 : risque accru de maladie (facteur de risque).
- $OR < 1$ ,  $p$  ( $\chi^2$ )  $< 0.05$  ou [IC à 95 %] excluant la valeur 1 : risque réduit de maladie (facteur protecteur).

### 3.6.2.2 Fraction attribuable dans la population ou fraction étiologique de risque dans la population

**La fraction attribuable dans la population (PAF) :** c'est la proportion parmi tous les cas dans la population cible, de ceux que l'on peut attribuer à l'exposition (Rockhill et al., 1998), expliqué encore par la proportion de tous les cas qui auraient été prévenus si l'exposition n'était pas présente. Elle mesure l'impact global du facteur de risque dans la population en tenant compte de la proportion des individus exposés.

Dans notre étude, c'est la proportion parmi tous les cas d'avortement ou d'infertilité ou de mortalité néonatale attribuée à *C. burnetii*. On peut expliquer aussi par la proportion de tous les cas d'avortement, d'infertilité et de mortalité néonatale qui aurait été épargnée si ce pathogène n'était pas présent.

Le PAF est mesuré comme suit (Benichou, 1991 ; Smith, 1995 ; Garcia-Vazquez et al., 2005) : **PAF = [(OR-1)/OR] \* proportion des exposés parmi les cas.**

Nous pouvons estimer le nombre (Np) de cas attribuable à l'exposition parmi le nombre de tous les cas observés à partir de la fraction attribuable dans la population (PAF) (Rockhill et al., 1998).

**Np= PAF × np**, soit np le nombre de cas total.

La fraction étiologique du risque dans la population est un paramètre fondamental dans les enquêtes épidémiologiques cas-témoin car elle permet de quantifier la proportion de cas évitables si on supprime l'exposition.

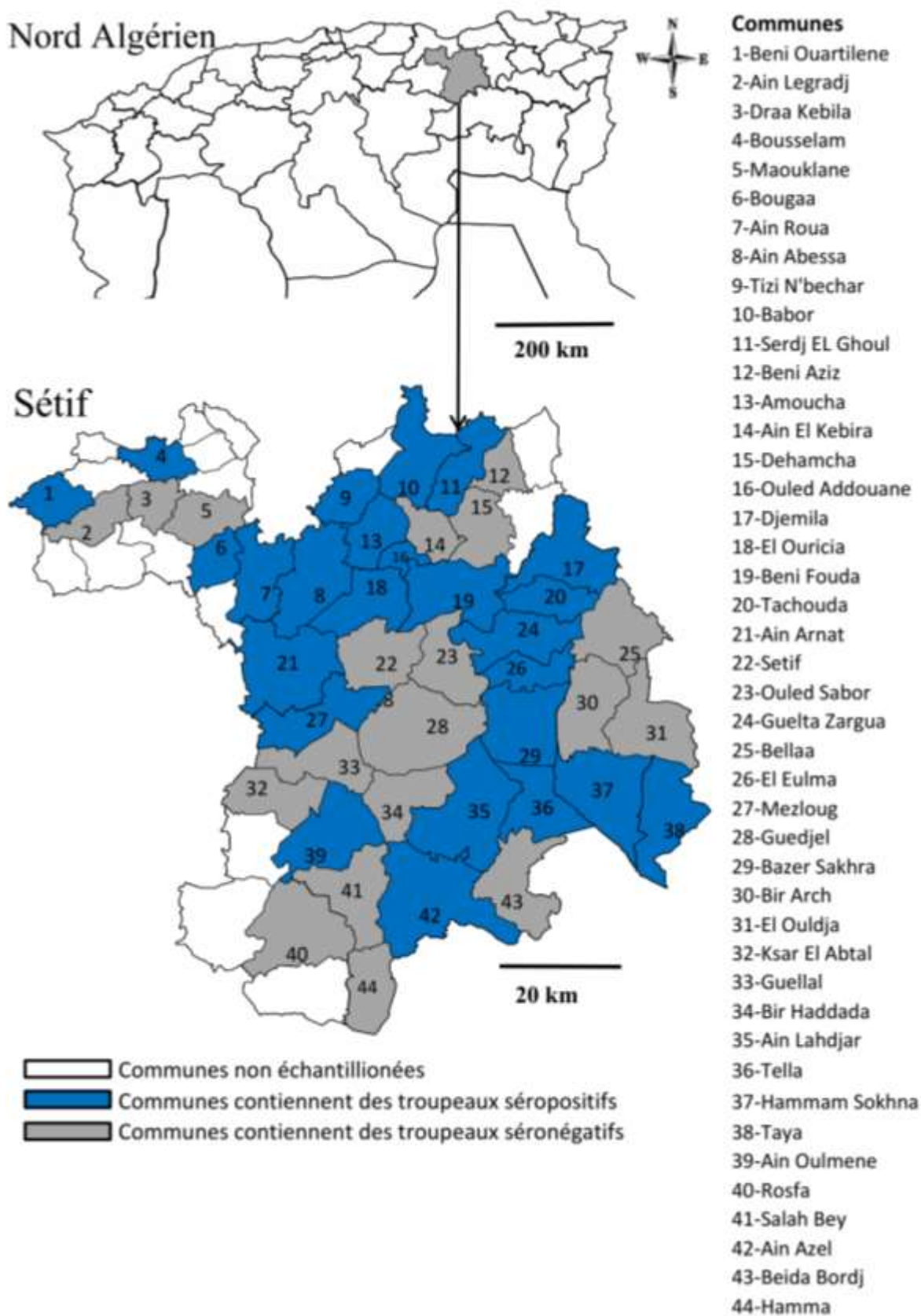
### 3.7 Considération éthique

L'administration des questionnaires et la prise de sang se sont faites avec le consentement total des éleveurs enquêtés. De plus, la prise de sang a été réalisée par des vétérinaires qualifiés conformément aux directives internationales pour le soin et l'utilisation des animaux.

## 4 Résultats

### 4.1 Séroprévalence de *Coxiella burnetii* chez les vaches de la wilaya de Sétif

L'analyse par la technique ELISA indirecte des 678 sérums de vaches issues des 90 exploitations bovines prélevées, a mis en évidence 77 vaches séropositives vis-à-vis de *C. burnetii*, soit une séroprévalence individuelle de 11.36 % (IC 95% : 8.97%-13.75%). Par ailleurs, 41 troupeaux bovins possèdent au moins une vache séropositive soit une séroprévalence au sein des troupeaux de 45.56 % (IC 95% : 35.27%-55.84%). En outre, la séroprévalence intra-troupeau variait de 9.09 % à 57.14 % (moyenne: 23.71%; Q1: 11.11%, médiane: 20%, Q3: 30%). Enfin, parmi les 44 communes incluent dans notre étude, 24 renfermaient au moins un troupeau séropositif (54.54 %) (IC 95% : 39.83%-69.25%). La distribution des vaches séropositives vis-à-vis de *C. burnetii* par troupeau et par commune est détaillée dans le tableau 4 et la figure 12.



**Figure 12 :** Carte de la région de Sétif au Nord-Est de l'Algérie, illustrant les communes qui contiennent des troupeaux séropositifs (zone bleu).

**Tableau 4 :** Distribution des vaches séropositives vis-à-vis de *Coxiella burnetii* par troupeau et par commune.

Communes	No. de troupeaux échantillonnés	No. de troupeaux séropositifs	No. de vaches prélevées	No. de vaches séropositives
1-Beni Ouartilene	1	1	5	1
2-Ain Legradj	1	0	5	0
3-Draa Kebila	1	0	4	0
4-Bousselam	1	1	6	1
5-Maouklane	1	0	4	0
6-Bougaa	2	1	10	1
7-Ain Roua	2	1	17	1
8-Ain Abessa	5	3	46	8
9-Tizi N'bechar	1	1	7	1
10-Babor	2	1	15	4
11-Serdj EL Ghoul	2	1	12	2
12-Beni Aziz	1	0	6	0
13-Amoucha	2	2	17	4
14-Ain El Kebira	3	0	20	0
15-Dehamcha	1	0	4	0
16-Ouled Addouane	2	2	14	0
17-Djemila	2	1	18	1
18-El Ouricia	3	1	24	2
19-Beni Fouda	4	3	29	7
20-Tachouda	3	3	29	5
21-Ain Arnat	4	1	31	2
22-Setif	2	0	18	0
23-Ouled Sabor	2	0	12	0
24-Guelta Zargua	2	2	15	3
25-Bellaa	2	0	15	0
26-El Eulma	4	3	28	5
27-Mezloug	4	3	33	4
28-Guedjel	2	0	19	0
29-Bazer Sakhra	4	2	34	5
30-Bir Arch	2	0	15	0
31-El Ouldja	1	0	9	0
32-Ksar El Abtal	1	0	8	0
33-Guellal	2	0	17	0
34-Bir Haddada	1	0	5	0
35-Ain Lahdjar	2	1	19	2
36-Tella	3	2	21	4

**Tableau 4 (suite)** : Distribution des vaches séropositives vis-à-vis de *Coxiella burnetii* par troupeau et par commune.

Communes	No. de troupeaux échantillonnés	No. de troupeaux séropositifs	No. de vaches prélevées	No. de vaches séropositives
37-Hammam Sokhna	3	1	26	9
38-Taya	2	2	10	3
39-Ain Oulmene	1	1	7	1
40-Rosfa	1	0	6	0
41-Salah Bey	1	0	7	0
42-Ain Azel	1	0	6	0
43-Beida Bordj	2	1	15	1
44-Hamma	1	0	10	0
<b>Total</b>	<b>90</b>	<b>41</b>	<b>678</b>	<b>77</b>

#### 4.2 Analyse des facteurs de risque potentiellement associés à la séropositivité vis-à-vis de *Coxiella burnetii* chez les vaches dans la wilaya de Sétif.

Parmi 20 variables indépendantes analysées, l'analyse univariée a montré 6 variables présentant une valeur de  $P$  inférieure à 0.25 ( $p < 0.25$ ) qui sont : la taille du troupeau, le contact avec d'autres troupeaux, la présence de petits ruminants dans l'élevage, l'utilisation de désinfectants, l'origine des vaches et les antécédents d'infertilité durant l'année précédente (tableau 5). Lorsque ces variables indépendantes ont été soumises à l'analyse de régression logistique multivariée, celle-ci a identifié le contact avec d'autres troupeaux (OR: 1.95 ; IC 95% : 1.12-3.42) et les vaches achetées (OR: 2.05 ; IC 95% : 1.14-3.68) comme facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de *C. burnetii* chez les vaches dans la wilaya de Sétif. En effet, le risque d'acquisition de l'infection par *C. burnetii* est deux fois plus élevé chez les vaches achetées et les vaches élevées en contact avec d'autres troupeaux. Tandis que l'utilisation de désinfectants (OR: 0.32; IC 95% : 0.14-0.72) a été défini comme facteur protecteur (tableau 6) (figure 13). Le modèle final avait une bonne qualité d'ajustement (test de Hosmer et Lemeshow:  $\chi^2 = 5.006$ ;  $p = 0.28$ ).

**Tableau 5 :** Analyse univariable des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de *Coxiella burnetii* chez les vaches dans la wilaya de Sétif.

Variables Indépendantes	Catégories	No. De vaches testées	No. de vaches séropositives	Séroprévalence %	Valeur p
<b>Mode d'élevage</b>	Intensive	159	20	12.57	0.58
	Semi-intensive	519	57	10.98	
<b>Taille du troupeau</b>	≤11 vaches	436	43	9.86	<b>0.10*</b>
	>11 vaches	242	34	14.04	
<b>Type de production</b>	Laitière	579	63	10.88	0.34
	Mixte	99	14	14.14	
<b>Utilisation de désinfectants</b>	Oui	131	7	5.34	<b>0.016*</b>
	Non	547	70	12.79	
<b>Contact avec d'autres troupeaux</b>	Oui	280	47	16.78	<b>&lt;0.001*</b>
	Non	398	30	7.53	
<b>Présence de tique</b>	Oui	129	17	13.17	0.47
	Non	549	60	10.92	
<b>Source d'eau</b>	Puit	395	39	9.87	0.31
	Source naturelle	116	21	18.10	
	Robinet	167	17	10.17	
<b>Présence de petits ruminants</b>	Oui	213	34	15.96	<b>0.011*</b>
	Non	465	43	9.24	
<b>Présence de chevaux</b>	Oui	111	14	12.61	0.65
	Non	567	63	11.11	
<b>Présence de chiens</b>	Oui	252	32	12.69	0.39
	Non	426	45	10.56	
<b>Présence de chats</b>	Oui	175	21	12.00	0.76
	Non	503	56	11.13	
<b>Mode de reproduction</b>	Seulement la Monte naturelle	387	43	11.11	0.38
	Seulement l'insémination artificielle	202	27	13.36	
	Les deux	89	7	7.86	
<b>Utilisation du box de vêlage</b>	Oui	100	10	10.00	0.64
	Non	578	67	11.59	
<b>Traite</b>	Manuelle	146	18	12.32	0.68
	Mécanique	532	59	11.09	
<b>Race</b>	Importée	237	27	11.39	0.58
	Locale	90	13	14.44	
	Croisée	351	37	10.54	
<b>Age en années</b>	>2 - ≤5	310	31	10	0.57
	>5 - ≤8	299	38	12.70	
	>8	69	8	11.59	

\*les variables dont leur  $p \leq 0.25$  soumises au modèle de régression logistique multivariable



**Tableau 5 :** Analyse univariante des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de *Coxiella burnetii* chez les vaches dans la wilaya de Sétif.

Variables Indépendantes	Catégories	No. De vaches testées	No. de vaches séropositives	Séroprévalence %	Valeur p
<b>Origine de la vache</b>	Née dans la ferme	538	48	8.92	<b>&lt;0.001*</b>
	Achetée	140	29	20.71	
<b>Antécédents d'avortement durant l'année précédente</b>	Oui	43	7	16.27	0.29
	Non	635	70	11.02	
<b>Antécédents de mortalité néonatale durant l'année précédente</b>	Oui	16	3	18.75	0.35
	Non	662	74	11.17	
<b>Antécédents d'infertilité durant l'année précédente</b>	Oui	74	13	17.56	<b>0.07*</b>
	Non	604	64	10.59	

\*les variables dont leur  $p \leq 0.25$  soumises au modèle de régression logistique multivariante.

**Tableau 6 :** Analyse de régression logistique multivariante des facteurs de risque associés à la séropositivité vis-à-vis de *Coxiella burnetii* chez les vaches dans la wilaya de Sétif.

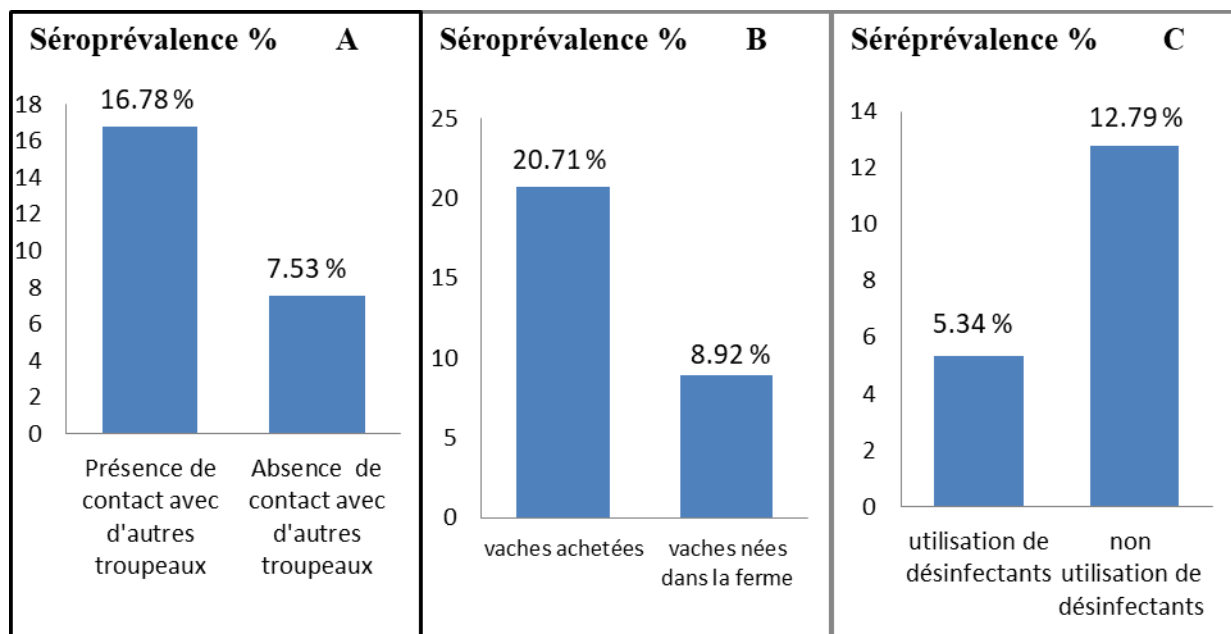
Variables	B <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	OR <sup>c</sup>	IC <sup>d</sup> 95%(OR)	p value
<b>Contact avec d'autres troupeaux</b>	0.67	0.28	1.95	1.12-3.42	0.019
<b>Utilisation de désinfectants</b>	-1.14	0.41	0.32	0.14-0.72	0.006
<b>Vaches achetées</b>	0.72	0.30	2.05	1.14-3.68	0.016

Model Khi-deux 27.885 avec degrés de liberté ddl = 5.

Model  $-2 \log$ -vraisemblance (rapport de vraisemblance) = 479.907.

Qualité de l'ajustement de Hosmer-Lemeshow du Khi-deux de Pearson= 5.006, valeur  $p = 0.287$ .

- Coefficient de régression logistique Beta.
- Erreur standard (écart type).
- Odds ratio.
- Intervalle de confiance.

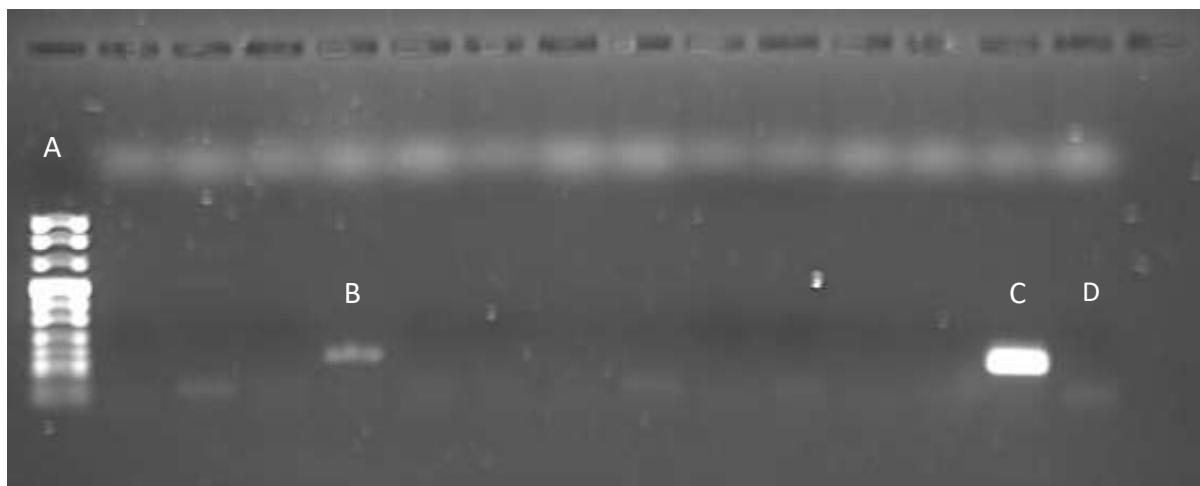


**Figure 13 :** Variation de la séroprévalence de *Coxiella burnetii* en fonction de la présence ou de l'absence de contact avec d'autres troupeaux (A), de l'origine de la vache (B) et de l'utilisation ou non de désinfectants (C).

#### 4.3 Étude cas-témoin entre l'infection par *Coxiella burnetii* chez les vaches et la présence de troubles de la reproduction durant l'année précédente

Nous avons réalisé une étude épidémiologique de type cas-témoin pour étudier l'association entre l'infection à *C. burnetii* chez les vaches et la présence des antécédents d'avortement et / ou de mortalité néonatale et / ou d'infertilité durant l'année précédente. En effet, 186 échantillons de sang total issu de deux groupes de vaches (un groupe de vaches présentant les dits troubles appelé cas et un groupe de vaches n'ayant jamais montré de troubles appelé témoin) ont été examinés par les techniques moléculaires pour détecter l'ADN de *C. burnetii* afin de comparer les prévalences obtenues chez les vaches cas et les vaches témoins (tableau 7).

Parmi les 186 échantillons de sang total prélevés dans 26 fermes différentes, 13 vaches issues de 6 fermes se sont révélées positives pour l'IS1111 soit une proportion individuelle de 6.98% (IC 95% : 3.32%-10.65%) et une proportion au sein du troupeau de 23.07% (IC 95% : 6.88%-39.27%) (figure 14 et 15).



**Figure 14 :** Photographie de la migration sur gel d'agarose d'un fragment de l'élément d'insertion du *Coxiella burnetii* (IS1111) d'une taille de 154 pb (B) issue d'un échantillon de sang total. Le marqueur d'ADN (A), le contrôle positif (C) et le contrôle négatif (D).

Les séquences IS1111 obtenues étaient similaires à 100 % à celles de *Coxiella burnetii* (numéro d'accèsion CP035112.1, CP040059.1, CP014354.1, CP013667.1 et autres) (figure 15).

**La séquence sens (forward)**

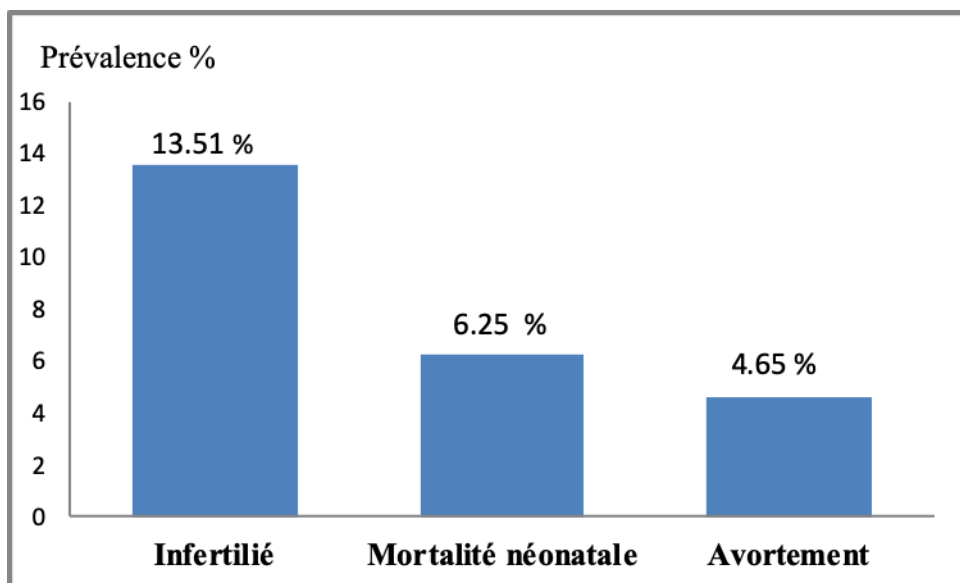
**CAAGAAACGTATCGCTGTGGCGCCTAAACACCGCCGTGGGTAAAAAAAAG  
AATTAACAAAAGGAGACACACCAACCGAGTTCGAAACAATGAGGGCTGAT  
GAAAGTAAGGTAAAACCTGAGGTTGATTAAGCTGATTCATACGGTGGCTC  
TGTG**

**La séquence anti-sens (reverse)**

**GTTCTTTGCTTAGCGACACCGCGGATTTGTGGCGGCACCCATTTTTTTTC  
TTAATTGTTTTCTCTGTGTGGTTGGCTCAAGCTTTGTTACTCCCGACTA  
CTTTCATTCCATTTTGGACTCCAACCTAACCCGACTCCGTA TGCCACCGAG ACAC**

**Figure 15 :** Séquence nucléotidique obtenu d'un fragment de gène IS1111 de *Coxiella burnetii* amplifié à partir du sang total provenant de vaches laitières de la wilaya de Sétif.

Dans cette étude nous avons constaté que les vaches infertiles sont les plus infectées avec une prévalence de 13.51 %, suivie par les vaches dont leur veau est mort-né (6.25 %) et celles ayant avorté au courant de l'année précédente (4.25 %) (figure 16). Alors que nous n'avons enregistré aucun échantillon positif chez les vaches ayant un historique d'avortement ou de mortalité néonatale et souffrant par la suite par de troubles d'infertilité (tableau 7).



**Figure 16** : Prévalence de *Coxiella burnetii* chez les vache infertiles, ayant avorté, et celles produisant des mort-nés.

L'étude cas témoin n'a montré une association significative qu'avec les vaches ayant des antécédents d'infertilité. En effet, sur les 74 vaches ayant connu des troubles d'infertilité durant l'année précédente, 10 étaient infectées par *C. burnetii* soit une prévalence de 13.51 %. En revanche, sur les 112 vaches n'ayant pas connu de troubles d'infertilité, 3 ont été infectées, soit une prévalence de 2.67 % (tableau 7). Par conséquent, La prévalence obtenue chez les vaches cas (13.51 %) était significativement plus élevée que celle notée chez les vaches témoins (2.67 %) ( $p < 0,05$ ). Le calcul de l'Odds Ratio a montré une valeur de 5.62 qui est significativement supérieure à 1 ( $p < 0,05$ ), et une fraction attribuable dans la population (PAF) de 11.10 % (tableau 7).

Cette association est interprétée comme suit :

- Les vaches infectées étant de 5.62 fois plus susceptibles de développer une infertilité que les vaches non infectées.
- La fraction attribuable dans la population (PAF) obtenue de 11.10 % signifie que parmi les 74 cas d'infertilité enregistrés dans notre étude, 11.10 % sont attribuables à l'infection par *C. burnetii*, soit 8 cas d'infertilité.  $Np = PAF (0.11) \times np (74)$ , soit np le nombre de cas total. Cela signifie aussi que 8 parmi les 74 cas d'infertilité observés auraient pu être évités si *C. burnetii* n'avait pas sévi dans la région étudiée.

**Tableau 7** : Association entre l'infection par *Coxiella burnetii* chez les vaches et la présence des antécédents d'avortement et/ou de mortalité néonatale et/ou d'infertilité durant l'année précédente.

Vache	Antécédents d'avortement		Antécédents de mortalité néonatale		Antécédents d'infertilité		Antécédents d'avortement suivi par une infertilité		Antécédents de mortalité néonatale suivie par une infertilité	
	Cas	Témoin	Cas	Témoin	Cas	Témoin	Cas	Témoin	Cas	Témoin
<b>Positive</b>	2	13	1	12	10	3	0	13	0	13
<b>Négative</b>	41	130	15	158	64	109	13	160	4	169
<b>Total</b>	43	143	16	170	74	112	13	173	4	182
<b>Taux d'exposition %</b>	4.65 %	9.09 %	6.25 %	7.05 %	13.51 %	2.67 %	0 %	7.51 %	0 %	7.14 %
<b>Odds Ratio</b>	0.49 (0.05-2.30)		0.88 (0.02-6.76)		5.62 (1.38-32.96)		NA		NA	
<b>Valeur p</b>	0.53		1		0.006		0.60		1	
<b>PAF</b>	-0.044		-0.0085		11.10%		NA		NA	

NA = non applicable, PAF : fraction attribuable dans la population.

## 5 Discussion

### 5.1 Séroprévalence vis-à-vis de *Coxiella burnetii*

Notre travail est la première étude réalisée avec un plan d'échantillonnage approprié pour déterminer la séroprévalence individuelle et du troupeau, ainsi que les facteurs de risque associés à l'infection par *C. burnetii* dans la wilaya de Sétif, au Nord-Est de l'Algérie. Dans cette étude, nous avons choisi la technique ELISA indirecte au lieu d'autres techniques sérologiques en raison de sa sensibilité élevée et son utilité en pratique. En effet, il s'agit d'une méthode rapide, peu coûteuse, facile à réaliser et utilisée pour le dépistage à grande échelle (OIE, 2018). L'ELISA est une méthode de diagnostic indirecte mettant en évidence une exposition antérieure par *C. burnetii* par la détection de leurs anticorps spécifiques. Par conséquent, un résultat positif ne confirme pas une infection active, car cela nécessite l'utilisation de méthodes de diagnostic directes telles que l'ELISA par antigène ou la PCR (Muskens et al., 2011; Alvarez et al., 2012). La sensibilité et la spécificité de la trousse commerciale ELISA utilisée sont de 100 % (Seo et al., 2017; IDvet, rapport de validation interne), ce qui indique une valeur identique de la séroprévalence apparente et réelle. La vaccination contre *C. burnetii* n'est pas pratiquée en Algérie, par conséquent, le résultat de cette étude sérologique est la réponse à une infection naturelle par *C. burnetii*.

La séroprévalence individuelle obtenue dans cette étude (11.36 %) est similaire à celle signalée dans la wilaya de Bejaïa située au Nord de la région d'étude (10.6 %) (Agag et al., 2017) et celle rapportée chez des vaches laitières ayant avorté dans la plaine de la Mitidja au centre du pays (8,4 %) (Djellata et al., 2019), mais inférieure à celle observée dans la région de Tiaret à l'Ouest de l'Algérie (23.91 %) (Abdelhadi et al., 2015) et celle observée dans une ferme souffrant de problèmes d'avortement dans la wilaya de Blida au centre du pays (29 %) (Dechicha et al., 2010). Par ailleurs, notre séroprévalence est supérieure à celle publiée dans une étude cas-témoin illustrant l'association des causes infectieuses abortives avec la survenue de l'avortement chez les vaches de la wilaya d'Alger (1.66 %) (Derdour et al., 2017). Cette différence de prévalence entre les régions pourrait être attribuée aux stratégies d'échantillonnage qui sont différentes.

La coxiellose bovine a été rapportée dans de nombreux pays avec des prévalences différentes (Guatteo et al., 2011), comparée aux études sérologiques effectuées dans d'autres pays africains et méditerranéens, la séroprévalence individuelle obtenue dans ce travail semble inférieure à celle rapportée au Nigéria (14.5 %) (Tukur et al., 2014), en Tunisie (16.21 %) (Elandalousi et al., 2015), au Ghana (21.7%) (Johnson et al., 2019), à l'Est de la Turquie (16.3

%) (Ceylan et al., 2009), en Italie (14.4 %) (Capuano et al., 2001), au centre de l'Italie (37.8 %) (Barlozzari et al., 2020), en Égypte (19.3 %) (Klemmer et al., 2018), au Soudan (29,92 %) (Hussien et al., 2017) et au Cameroun (31.3%) (Scolamacchia et al., 2010). Néanmoins, elle était comparable à celle enregistrée au Kenya (10.5 %) (Wardrop et al., 2016) et au Liban (9.94 %) (Dabaja et al., 2019). Par ailleurs, notre étude a montré une séroprévalence plus élevée que celle observée dans une autre étude au Nigéria (6,76 %) (Adamu et al., 2018), au Tchad (4 %) (Schelling et al., 2003), au Sénégal (3.6 %) (Kamga-Waladjo et al., 2010) et en Espagne (6.76 %) (Alvarez et al., 2012) et 5.28% en Sicile (Italie) (Galluzzo et al., 2019). Cette différence dans les séroprévalences entre les régions et les pays peut être attribuée à de nombreux facteurs tels que les facteurs écologiques locaux, la gestion et la pratique d'élevage et la taille du troupeau qui peuvent influencer sur la transmission de *C. burnetii* entre les animaux (Hussien et al., 2017).

Cette étude a révélé aussi que 45.56 % des troupeaux avaient au moins une vache séropositive. Ce taux est supérieur à celui observé dans la wilaya de Bejaïa (22 %) (Agag et al., 2017). Par ailleurs, plus de la moitié des communes ciblées (54.54 %) possèdent au moins un troupeau séropositif montrant ainsi la large distribution de la coxiellose dans notre région d'étude. Ceci peut être expliqué par le fait que *C. burnetii* soit caractérisée par une transmission aérienne sur de longue distance, une forte résistance aux conditions environnementales et un fort pouvoir infectieux (une petite dose de *C. burnetii* peut être à l'origine d'une contamination) (Madariaga et al., 2003 ; Woldehiwet., 2004 ; Gürtler et al., 2014 ; Nusinovici et al., 2015). Plusieurs études ont montré des variations considérables dans la séroprévalence des troupeaux bovins tels que l'Espagne (30 %) (Alvarez et al., 2012), le Nigéria (57,1%) (Tukur et al., 2014), le Cameroun (68.1 %) (Scolamacchia et al., 2010), l'Italie (68 %) (Capuano et al., 2001), la Sicile (Italie) (38.8%) (Galluzzo et al., 2019) et au centre d'Italie (68.5%) (Barlozzari et al., 2020).

La séroprévalence intra troupeau obtenue variait de 9.09 % à 57.14 % avec une moyenne de 23.71 % (médiane: 20% ; Q1: 11.11% ; Q3: 30%). Celle-ci est proche de la prévalence moyenne estimée à partir de nombreuses études à travers le monde (Guatteo et al., 2011) (médiane: 26.3%, Q1: 21.8%, Q3: 38.2%).

## 5.2 Analyse des facteurs de risque potentiellement associés à la séropositivité vis-à-vis de *Coxiella burnetii* chez les vaches dans la wilaya de Sétif

L'identification des facteurs de risque potentiellement associés à une maladie donnée dans les enquêtes épidémiologiques est utile pour orienter le contrôle de la maladie (Jin et al., 2017). Par conséquent, le contrôle d'une maladie zoonotique comme la fièvre Q permet de réduire sa transmission entre animaux et à l'homme. Citons l'exemple d'une étude récente menée en Jordanie qui a montré que la séropositivité de *C. burnetii* est significativement plus élevée chez les éleveurs de petits ruminants, et recommande la mise en place de mesures protectives dans les élevages de petits ruminants pour prévenir la fièvre Q humaine (Obaidat et al., 2019).

Il existe une association positive entre la séropositivité vis-à-vis de *C. burnetii* chez les vaches et le contact avec d'autres troupeaux à travers l'utilisation en commun du champ de pâturage et du point d'abreuvement ( $p < 0.01$ ). Cela s'explique d'une part par le fait que le contact avec d'autres troupeaux augmente la chance de rencontrer des bovins infectés, ce qui favorise la transmission directe de *C. burnetii* entre animaux (Adamu et al., 2018), et d'autre part, par la contamination de l'environnement du pâturage et d'abreuvement. Cette bactérie est caractérisée par une très grande stabilité vis-à-vis des conditions environnementales et peut rester contagieuse pendant plusieurs mois (Gürtler et al., 2014). L'environnement peut être contaminé par les produits d'avortement ou de naissance, les matières fécales, l'urine, le lait et le mucus vaginal provenant d'animaux infectés au moment du pâturage ou d'abreuvement (Guatteo et al., 2006; 2007; Angelakis et Raoult, 2010; EFSA, 2010; Astobiza et al., 2011), ou par dissémination de coxielles provenant d'exploitations contaminées via le sol, la peau des animaux, les eaux usées et le lait (Kersh et al., 2013b; Villari et al., 2018), ainsi que le vent (Nusinovici et al., 2015).

Les vaches achetées ont également été identifiées comme facteurs de risque d'infection par *C. burnetii*. La séroprévalence de *C. burnetii* chez vaches achetées (20.71 %) était significativement plus élevée que celle observée chez les vaches nées dans la ferme (8.92 %) ( $p < 0.05$ ). Ceci est en accord avec une étude antérieure qui a indiqué une association significative entre l'introduction de nouveaux bovins aux troupeaux et la positivité aux anticorps spécifiques de *C. burnetii* dans les laits de citerne des troupeaux laitiers jordaniens (Obaidat et Kersh, 2017), et celle montrant que l'achat de bovins provenant d'au moins deux différents élevages en 2009 était corrélée de manière significative à la présence d'ADN et d'anticorps de *C. burnetii* dans le lait de tank des élevages bovins laitiers aux Pays-Bas (van Engelen et al., 2014). En outre, il a été révélé que l'absence de mise en quarantaine des



animaux nouvellement achetés augmenterait significativement la séroprévalence de *C. burnetii* dans le lait de tank des troupeaux bovins laitiers au Danemark (Paul et al., 2012). Cela souligne l'importance de prendre des mesures de biosécurité telles que la mise en quarantaine et le dépistage des animaux nouvellement achetés pour empêcher l'introduction d'animaux infectés dans les troupeaux.

Les deux facteurs de risque identifiés dans cette étude, que ce soit le contact direct entre troupeaux ou l'introduction de nouvelles vaches dans le troupeau, favorisent la propagation de l'infection d'un troupeau à l'autre, ce qui explique une forte séroprévalence des troupeaux bovins dans notre étude (45.56 %).

Cependant, l'utilisation de désinfectants a été identifiée comme facteur de protection contre la coxiellose bovine. Un résultat similaire a été signalé récemment chez des ruminants domestiques au Liban (Dabaja et al., 2019). En outre, il a été montré que la séroprévalence de *C. burnetii* chez les bovins diminuait significativement dans les exploitations où la désinfection du matériel après utilisation (Tukur et al., 2014), des logettes de la litière au moins une fois par jour (van Engelen et al., 2014) et des mangeoires de façon hebdomadaire (Obaidat et Kersh, 2017) a été pratiquée. D'où l'intérêt de bonnes pratiques d'hygiène pour réduire l'exposition à *C. burnetii* chez les animaux d'élevage. En effet, *C. burnetii* ou plus précisément sa forme infectieuse à petite cellule (SCV) est connue pour sa résistance aux facteurs environnementaux et aux désinfectants chimiques (Cantas et al. 2011; Pexara et al. 2018). Cependant, elle est complètement inactivée après une exposition à de l'ammonium quaternaire ou à de l'éthanol à 70 % pendant 30 min (Plummer et al. 2018). Il a également été révélé qu'une exposition à 1 % de Peroxygen ou à une dilution de 1: 100 d'hypochlorite pendant 30 min a réduit l'infectiosité de plus de 90 % (Plummer et al. 2018). Le désinfectant peut détruire un grand nombre d'agents pathogènes et minimiser les risques d'infection chez les bovins. Par conséquent, il aide indirectement le système immunitaire des animaux à lutter contre les agents pathogènes résistants aux désinfectants tels que *C. burnetii*, notamment la destruction d'agents pathogènes ayant des effets immunosuppresseurs tels que le virus de l'herpès virus bovin de type 1 (BHV-1) et le virus de la diarrhée virale bovine (BVDV) qui prédisposent les bovins aux infections secondaires (Potgieter, 1995; Srikumaran et al., 2007; Biswas et al., 2013; Biswas et al., 2013; Molina et al. 2013; Lanyon et al. 2014).

### 5.3 Étude cas-témoin entre l'infection par *Coxiella burnetii* chez les vaches et la présence de troubles de reproduction au courant de l'année précédente

Dans la présente étude, nous avons examiné le sang total de bovin pour rechercher l'ADN de *C. burnetii* par amplification du fragment de gène correspondant à la séquence d'insertion IS1111. Celle-ci est souvent choisit pour diagnostiquer la fièvre Q par rapport à d'autres gènes en raison de sa sensibilité élevée, car *C. burnetii* possède de multiple copies d'IS1111 dans son génome (Klee et al., 2006 ; Boarbi et al., 2016). Cette étude cas témoin a révélé un taux d'infection de 13.51 % chez des vaches infertiles, ce taux est significativement plus élevé comparé à celui enregistré chez les vaches fertiles (2.67 %) ( $p < 0.05$ ). L'analyse statistique a révélé que les vaches infectées étant de 5.62 fois plus susceptibles de développer une infertilité que les vaches non infectées, et que 11.10 % des cas d'infertilité signalés dans la région de Sétif sont attribuables à l'infection par *C. burnetii*. Ces résultats rejoignent les études qui mettent en évidence que *C. burnetii* a un rôle possible dans les troubles d'infertilité chez les vaches (Rady et al., 1985; Krauss et al., 1987 ; Ho et al., 1995; To et al., 1998; Bildfell et al., 2000; Lopez-Gatius et al., 2012; Garcia-Ispuerto et al., 2013; 2014; 2015). Cependant, aucune preuve solide n'indique que *C. burnetii* provoque à elle seule une affection telle que l'endométrite et l'infertilité qui en résultent (Agerholm, 2013). Bien que De Biase et ses collaborateurs (2018) ont détecté récemment l'ADN de *C. burnetii* et son antigène dans des biopsies de l'endomètre de vaches avec repeat breeding en Italie (De Biase et al., 2018). Ces résultats n'ont pas été comparés avec ceux des vaches en bon état de santé et par conséquent, les conclusions finales ne peuvent pas être tirées (Macías-Rioseco et al., 2019).

Dans cette étude, nous avons constaté un taux d'infection de 4.25 % et 6.25 % chez les vaches ayant des antécédents d'avortement et de mortalité néonatale respectivement. Cependant, aucune différence significative n'a été signalée comparée avec des taux observés chez les vaches n'ayant pas avorté (9.09 %) et celles dont les produits sont viables (7.05 %). Cela est probablement due à la dominance d'autres agents infectieux à l'origine de l'avortement bovin dans la région tels *Brucella abortus*, *Neospora caninum*, *Herpesvirusvirus bovins de type 1* ou virus de la diarrhée virale bovine... Des travaux antérieurs ont trouvé des taux plus élevés soit 17.2 % et 11.6 % de vaches positifs par PCR parmi les bovins ayant avorté en Italie et au Portugal respectivement (Parisi et al., 2006 ; Clemente et al., 2009). Cependant, les travaux de Kirkbride (1992) ont attribué seulement 0.1 % des cas d'avortements et des mortalités néonatales sur 1784 signalés aux États-Unis à *C. burnetii*. En plus, aucun avortement bovin n'a été rapporté lors d'épidémie de coxiellose bovine au Sud-Est

de Pologne qui a touché 220 vaches laitières et au moins 1300 personnes (Bielawska-Drózd, 2013). Une séroconversion a été montrée chez des vaches ayant des veaux morts nés lors des épidémies ultérieures dans cette région (Krzysztof Niemczuk et al., 2011). Aucune preuve expérimentale ne permet de confirmer que *C. burnetii* est à l'origine de l'avortement chez les bovins, le seul cas fiable étant un veau mort-né à terme (Behymer et al., 1976 ; Agerholm, 2013). Plusieurs études séroépidémiologiques montrent que les vaches séropositives vis-à-vis de *C. burnetii* avortent plus fréquemment que les séronégatives (Vidic et al., 1990 ; Sting et al., 2002, ; Cabassi et al., 2006 ; Derdour et al., 2017). Même si d'autres études infirment cette observation (Hässig et al., 1998 ; Ruiz-Fons et al., 2010). En effet, *C. burnetii* est considérée comme un agent pathogène opportuniste associé à un avortement sporadique chez les bovins (Anderson et al., 1990 ; Bildfell et al., 2000 ; Agerholm, 2013) et le diagnostic d'un avortement à *C. burnetii* chez les bovins est confirmé par la détection de cet agent associé à des lésions placentaires, ainsi que par l'élimination d'autres causes d'avortement bovin (Agerholm, 2014). En effet, ce pathogène peut être détecté dans le placenta, les produits de mise bas et le mucus vaginal après un avortement ou après une vêlage normal (Hansen et al., 2011 ; Agerholm, 2013). Concernant la mortalité néonatale, Nielsen et al. (2011) ont déterminé que le risque de mortinatalité et de mortalité périnatale était plus élevé dans les exploitations avec un taux élevé d'anticorps spécifiques de *C. burnetii* dans le lait du tank. Freick et al. (2017) ont montré la présence de *C. burnetii* et des anticorps anti-*C. burnetii* dans le sang précolostral des veaux mort-nés, mais pas chez des veaux nés vivants dans un troupeau infecté de manière endémique. Cependant, rien n'indique que *C. burnetii* soit une cause importante de mortalité néonatale ou de naissance de veaux faibles (Agerholm, 2013 ; Freick et al., 2017).

L'analyse phylogénétique a révélé une similarité de 100 % de notre souche avec la souche NL3262 de *C. burnetii* (numéro d'accèsion CP013667.1) isolé à partir de placentas de chèvres ayant avorté et responsable de la plus grande épidémie de fièvre Q au monde qui a touché plus de 4000 cas humains aux Pays-Bas durant la période allant de 2007 à 2010 (Kuley et al., 2016). Cette découverte suggère une virulence importante de la souche circulante dans la région de Sétif.

## 6 Conclusion

Cette présente étude confirme la présence et la circulation de l'infection par *C. burnetii* dans les troupeaux bovins de la wilaya de Sétif au Nord-Est de l'Algérie. Par conséquent, certaines mesures d'hygiène et de biosécurité doivent être mises en œuvre, en mettant l'accent sur les facteurs de risque identifiés tels que la limitation de contact entre les troupeaux bovins, la mise en quarantaine des bovins nouvellement acquis et l'utilisation de désinfectants pouvant réduire la propagation de l'infection entre les animaux et la transmission possible à l'homme. Cette étude a également montré l'implication de *C. burnetii* dans les troubles d'infertilité chez les vaches examinées. Enfin, élargir les enquêtes épidémiologiques sur les animaux et les humains afin de mieux comprendre et contrôler cette maladie en Algérie.

## Chapitre II :

Enquête transversale sur la coxiellose bovine basée sur l'analyse sérologique et moléculaire du lait de mélange (tank) comme matrice de diagnostic dans la région de Sétif.

## **Chapitre II : Enquête transversale sur la coxiellose bovine basée sur l'analyse sérologique et moléculaire du lait de mélange (tank) comme matrice de diagnostic dans la région de Sétif**

### **1 Introduction**

Les ruminants infectés sécrètent *Coxiella burnetii* pendant et après la parturition ou bien après l'avortement dans le liquide amniotique et le placenta. Aussi la sécrétion peut se faire dans les urines, les selles, les sécrétions vaginales et le lait (Van Den Brom et al., 2012). Chez les brebis, *C. burnetii* peut être excrétée dans le lait pendant 8 jours alors que chez les vaches, l'excrétion peut durer jusqu'à 13 mois (Roest et al., 2011). L'analyse du lait de mélange (tank) est utilisée comme méthode pour contrôler la coxiellose dans les troupeaux de vaches laitières (Kim et al., 2005; Muskens et al., 2011). L'échantillonnage du lait de réservoir présente l'avantage d'être un échantillon représentatif de toutes les vaches en lactation, facile à obtenir, non invasif, pratique et économique (Muskens et al., 2011 ; Wapenaar et al., 2007).

Les techniques PCR et ELISA sont le plus souvent utilisées pour diagnostiquer l'infection par *C. burnetii* au niveau des troupeaux bovins dans la majorité des enquêtes épidémiologiques menées à travers le monde (Pexara et al., 2018). La technique ELISA vise à détecter des anticorps anti-*C. burnetii* dans le lait, ce qui démontre une exposition antérieure des troupeaux à cette bactérie. La PCR quant à elle, détecte la présence de *C. burnetii* dans le lait, ce qui témoigne d'une infection récente (Guatteo et al., 2007; Nokhodian et al., 2016).

En Algérie, peu d'études épidémiologiques existent sur la séoprévalence de la coxiellose chez les bovins, et aucune étude publiée n'a montré la présence de *C. burnetii* dans le lait de vaches au niveau de toute l'Afrique (Pexara et al., 2018).

### **2 Objectifs de l'étude**

Dans ce contexte, nous avons utilisé le lait de mélange (tank) comme matrice de diagnostic pour :

- Déterminer la séoprévalence de *C. burnetii* chez des troupeaux bovins par la technique ELISA dans la région de Sétif.
- Déterminer la prévalence de *C. burnetii* chez des troupeaux bovins par la méthode de PCR.
- Évaluer la concordance entre les méthodes de diagnostic sérologique (ELISA) et moléculaire (PCR).

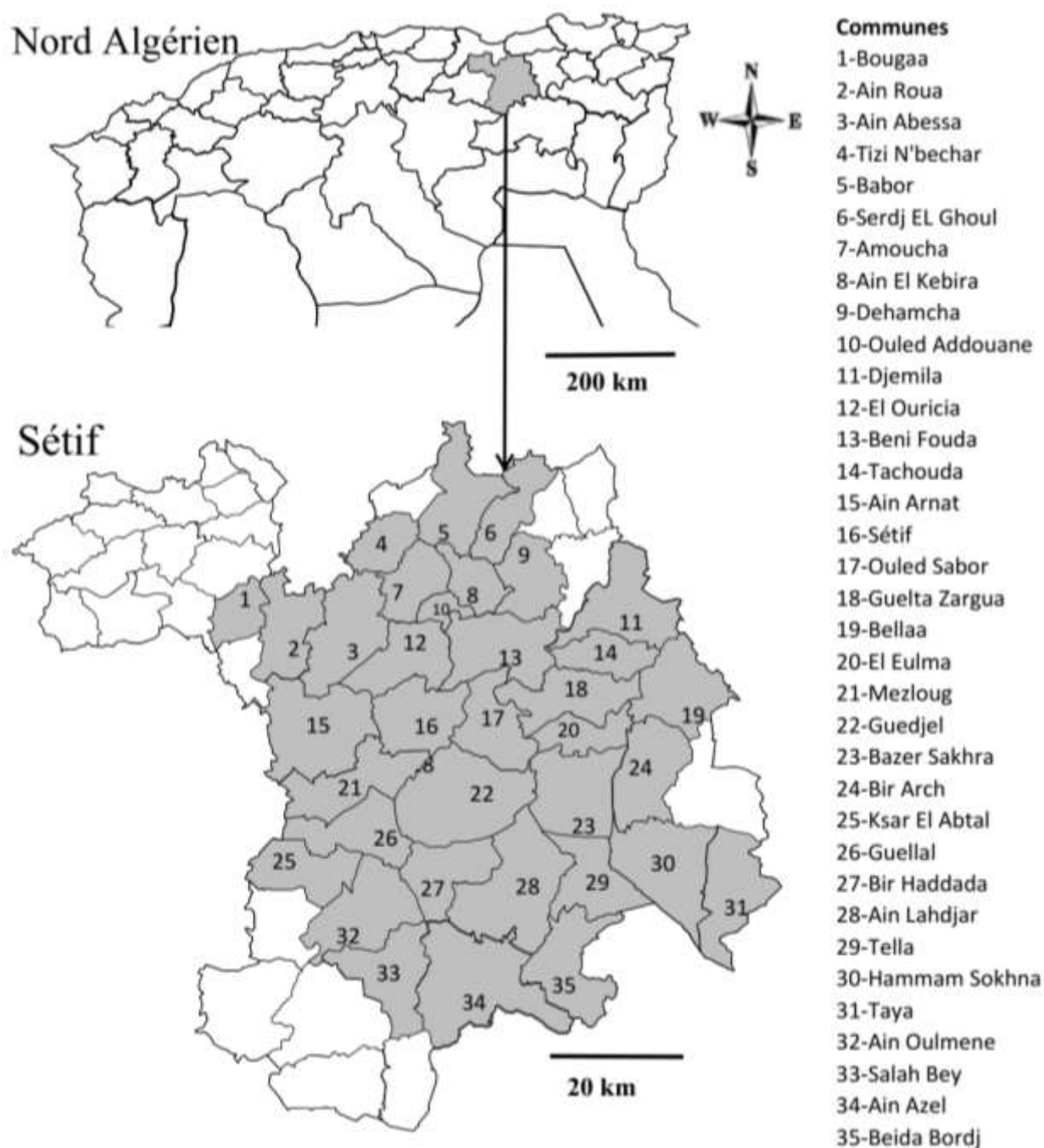
### **3 Matériel et Méthodes**

#### **3.1 Conception de l'étude**

Elle s'agit d'une enquête épidémiologique transversale ciblant un échantillon aléatoire et représentatif des troupeaux bovins laitiers dans la région de Sétif, réalisée durant la période s'étalant entre septembre 2017 et avril 2018. Dans cette étude, nous avons collecté un échantillon de lait de mélange (tank) à partir de chaque exploitation laitière commerciale contenant au moins dix vaches en lactation. Les prélèvements se sont effectués lors de la collecte quotidienne par les ramasseurs de lait, après avoir obtenu le consentement des éleveurs. La taille de l'échantillon a été déterminée selon la formule d'échantillonnage aléatoire simple proposée par Thrusfield (Thrusfield, 2007):

$$N = \frac{(1.96)^2 P(1-P)}{L^2}$$

Où N était la taille de l'échantillon, 1.96 était la valeur Z du niveau de confiance sélectionné (95 %), P était la prévalence attendue de la maladie et L était la précision absolue souhaitée. Une taille d'échantillon minimale de 96 élevages de vaches laitières a été obtenue en utilisant une prévalence attendue de 50 % (pas d'étude antérieure dans la région), une précision absolue souhaitée de 10 % et un intervalle de confiance de 95 %. Ainsi, un total de 200 troupeaux de vaches laitières possédant entre 10 à 40 vaches en lactation parmi 3900 présentes dans la région de Sétif, ont participé à notre enquête. La fonction aléatoire « ALEA » du Microsoft Excel® 2013 a été utilisée pour sélectionner les troupeaux bovins. Dans le cas de refus de l'éleveur de participer à cette enquête, nous avons ciblé l'élevage le plus proche. Les fermes sélectionnées étaient localisées dans 35 communes de la wilaya de Sétif (figure 17) et la répartition des troupeaux prélevés par commune est présentée dans le (tableau 8).



**Figure 17 :** Carte de la région de Sétif illustrant les communes (zone grise) où des échantillons du lait de tank ont été collectés pour la détection de l'infection par *Coxiella burnetii* chez les troupeaux bovins laitiers.



**Tableau 8 :** Distribution des troupeaux échantillonnés par commune.

<b>Communes</b>	<b>No. des troupeaux échantillonnés</b>
1-Bougaa	3
2-Ain Roua	4
3-Ain Abessa	8
4-Tizi N'bechar	3
5-Babor	4
6-Serdj EL Ghoul	2
7-Amoucha	3
8-Ain El Kebira	5
10-Ouled Addouane	4
11-Djemila	2
12-El Ouricia	5
13-Beni Fouda	5
14-Tachouda	5
15-Ain Arnat	8
16-Setif	3
17-Ouled Sabor	4
18-Guelta Zargua	10
19-Bellaa	8
20-El Eulma	10
21-Mezloug	7
22-Guedjel	7
23-Bazer Sakhra	12
24-Bir Arch	9
25-Ksar El Abtal	3
26-Guellal	6
27-Bir Haddada	7
28-Ain Lahdjar	9
29-Tella	14
30-Hammam Sokhna	10
31-Taya	5
32-Ain Oulmene	2
33-Salah Bey	2
34-Ain Azel	3
35-Beida Bordj	8
<b>Total</b>	<b>200</b>

### **3.2 Échantillonnage**

Des échantillons de lait de mélange ont été recueillis dans un pot en plastique stérile de 50 ml après avoir mixé du lait du tank, puis transportés immédiatement sous froid jusqu'au laboratoire et congelés à - 20 °C jusqu'à leur utilisation (annexe 1).

### **3.3 Analyses des échantillons**

Le matériel utilisé pour l'analyse des échantillons de lait prélevé est détaillé dans la partie annexe du document (annexe 2 et 3).

#### **3.3.1 Analyse sérologique**

Un échantillon de lait entier prélevé dans chaque troupeau a été testé par le kit ELISA indirect (PrioCHECK™ Ruminant Q Fever Ab Plate Kit, LSI, Lissieu, France) pour la recherche des anticorps anti-*C. burnetii*. Le kit était précédemment appelé LSIVet Ruminant Q Fever Serum/Milk. Cette technique ELISA utilise des plaques de 96 cupules sensibilisées par des antigènes en phase I et en phase II. Ceux-ci sont isolés par l'INRA de Nouzilly à partir de ruminants domestiques. C'est une souche ovine responsable d'avortements chez les brebis (CbO1). L'utilisation de ce kit sur le lait de citerne a été validée, pouvant donner un résultat positif lorsque 10 % des vaches en lactation au sein d'un troupeau bovin ont des anticorps spécifiques de *C. burnetii* (Meunier, 2008 ; Muskens et al., 2011; Czaplicki et al., 2012; Anastácio et al., 2016). Les valeurs de densité optique (DO) ont été mesurées à 450 nm et le ratio échantillon/positif (E/P%) de chaque échantillon a été calculé conformément aux recommandations du kit (annexe 5).

Selon le fabricant, un échantillon était considéré comme négatif lorsque le ratio échantillon/positif  $E/P\% \leq 30\%$ , faiblement positif lorsque  $30\% < E/P\% \leq 100\%$  (+), positif lorsque  $100 < E/P\% \leq 200\%$  (++) et fortement positif lorsque  $E/P\% > 200\%$  (+++).

Le principe du kit ELISA indirect utilisé, sa composition, son mode opératoire, sa validation ainsi que l'interprétation des résultats obtenus sont présentés en annexe 5.

#### **3.3.2 Analyse moléculaire**

##### **3.3.2.1 Extraction d'ADN à partir du lait**

###### **3.3.2.1.1 Préparation**

-Préparation de la solution de Phosphate-Buffered Saline 1X (PBS) en mélangeant 100 g du PBS 10X(Sigma-Aldrich P3813-5X10PAK, USA) avec 1 litre d'eau désionisée ou stérile.

-Préparation de la solution de Phosphate-Buffered Saline 1X (PBS) / Dodécylsulfate de Sodium (SDS) (BIO-RAD 161-0301, USA) à raison de 1 % [PBS1X/SDS1 %] en mélangeant 1 g du SDS avec 100 ml du PBS 1X.

-Préparation de culot des cellules de lait.

Les cellules somatiques du lait ont été concentrées par centrifugation à vitesse basse (Renshaw et al., 2000) dont les étapes sont les suivants :

- 1-Mettre les tubes de lait au bain-marie ajusté à 70 °C pendant une 1 h pour l'inactivation complète des éventuels agents pathogènes présents dans le lait échantillonné.
- 2-Mélanger et distribuer 1.5 ml de chaque échantillon de lait de mélange dans des tubes eppendorfs de 2 ml.
- 3-Centrifuger les tubes eppendorfs à 10000 T/min pendant 10 min à 4 °C.
- 4-Enlever le gras de lait avec une spatule.
- 5-Enlever le surnageant par inversion des tubes et retirer la graisse résiduelle collée aux parois des tubes avec un coton-tige.
- 6-Ajouter à chaque tube environ 1 ml de PBS 1X stérile et remettre en suspension le culot avec la pipette (en pipétant 3 à 4 fois), puis compléter avec du PBS 1X jusqu'à 2 ml et vortexer.
- 7-Centrifuger les tubes eppendorfs à 10000 T/min pendant 10 min à 4 °C, et retirer le surnageant par inversion.
- 8-Répéter les étapes 6 et 7 une seconde fois.
- 9-Ajouter environ 1 ml de solution [PBS1X / SDS1 %], et remettre en suspension le culot avec la pipette (en pipétant 3 à 4 fois), puis compléter avec du [PBS1X / SDS1%] jusqu'à 2 ml et vortexer.
- 10-Centrifuger à 10000 T/min pendant 10 min à 4 °C et retirer le surnageant par inversion.
- 11-Conserver les culots cellulaires à -20 °C.

#### **3.3.2.1.2 Extraction**

L'ADN génomique a été extrait à partir du culot cellulaire à l'aide du kit commercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Allemagne) appliqué au tissu des animaux avec modification des volumes. Les étapes d'extraction de lait sont les suivants :

- Ajouter 360 µl du tampon ATL au culot cellulaire.
- Ajouter 40 µl de protéinase K, vortexer et incuber dans un bain-marie thermomixeur à 56 °C pendant 2 h.
- Ajouter 360 µl du tampon AL et vortexer.
- Ajouter immédiatement 400 µl d'éthanol (96-100 %) puis vortexer.
- Transférer l'échantillon dans une colonne DNeasy Mini spin column placé sur un tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen et centrifuger à ~ 6000 x g (8000 T/min) pour 1 min. Jeter l'éluât et le tube de collection.

-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un nouveau tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen, ajouter 500 µl de Tampon AW1 et centrifuger à ~ 6000 x g (8000 T/min) pendant 1 min. Jeter l'éluât et le tube de collection.

-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un nouveau tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen, ajouter 500 µl de Tampon AW2 et centrifuger à 20000 x g (14000 T/min) pendant 3 min pour sécher la DNeasy membrane. Jeter l'éluât et le tube de collection.

-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un tube 1.5 ml propre (non fourni par Qiagen), et pipeter 50 µl de Tampon AE directement sur la DNeasy membrane.

-Incuber à la température ambiante pendant 1 min, et centrifuger 1 min à ~ 6000 x g (8000 T/min). Repasser l'éluât sur la colonne pour un maximum de production d'ADN.

### **3.3.2.2 Réaction en chaîne par Polymérase**

Tous les échantillons de lait ont été testés par méthode de PCR conventionnelle amplifiant le fragment de gène correspondant à l'élément d'insertion IS1111, pour mettre en évidence l'excrétion de *C. burnetii* dans le lait. Les échantillons positifs ont été confirmés par séquençage. Les protocoles suivis et les kits utilisés sont ceux décrits dans la partie analyses moléculaires du sang total (chapitre I, page 51 à 58).

## **3.4 Analyses statistiques**

La prévalence des troupeaux a été estimée en rapportant le nombre de troupeaux positifs au nombre de troupeaux visés, avec calcul de l'intervalle de confiance binomial exact de 95 % (Thrusfield, 2007). Le test Kappa de Cohen a été calculé pour évaluer la concordance entre les résultats de l'analyse sérologique (ELISA) et moléculaire (PCR) (Cohen, 1960). La valeur K a été interprétée comme suit (Landis et Koch, 1977) :

- Inférieur à 0 : désaccord
- 0.0 – 0.20 : degré d'accord très faible
- 0.21 – 0.40 : degré d'accord faible
- 0.41 – 0.60 : degré d'accord modéré
- 0.61 – 0.80 : degré d'accord fort
- 0.81 – 1.00 : accord presque parfait.

Le test de McNemar a également été utilisé pour comparer les proportions de résultats positifs entre les deux méthodes de diagnostic (McNemar, 1947). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS v25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

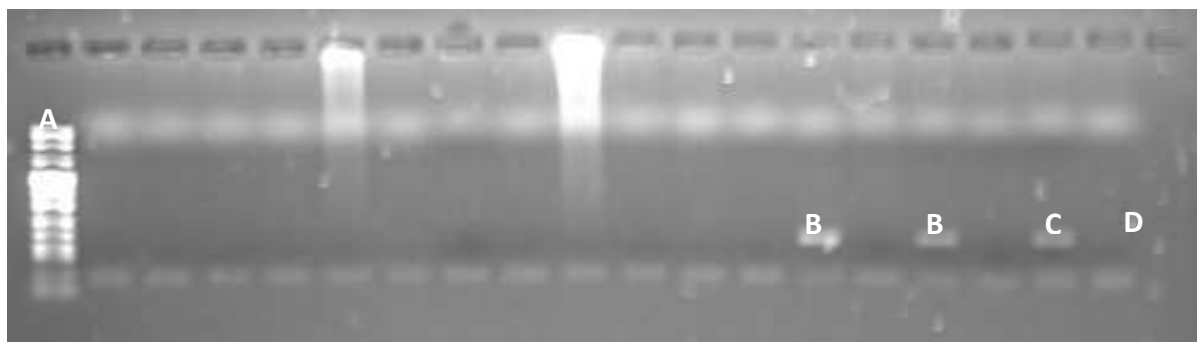
### 3.5 Considération éthique

Les échantillons de lait du tank bovin ont été prélevés avec les collecteurs de lait au cours de la collecte quotidienne après avoir obtenu le consentement des éleveurs. En outre, la collecte de lait n'est ni nocive ni menaçante pour le bien-être des animaux.

## 4 Résultats

### 4.1 Prévalence de la coxiellose chez les troupeaux bovins laitiers

Sur un total de 200 échantillons de lait de mélange analysés par la technique ELISA indirect, 74 se sont révélés positifs aux anticorps spécifiques de *C. burnetii* (37 % ; IC 95% : 30.31%-43.69%). Parmi eux, 54 appartenaient à des troupeaux faiblement séropositifs (+) (27 % ; IC 95% : 20.84%-33.15%), 20 appartenaient à des troupeaux moyennement séropositifs (++) (10 % ; IC 95% : 5.84%-14.15%) et aucun des troupeaux ne s'est révélé comme hautement séropositif (+++). Cependant, sur les 200 échantillons analysés par la méthode de PCR, seulement 18 ont donné un résultat positif, soit un taux d'infection de 9 % (IC 95% : 5.03%-12.96%) (figure 18). Enfin, la prévalence globale obtenue par les deux méthodes de diagnostic à la fois était de 41 % (IC 95% : 34.18%-47.82%).

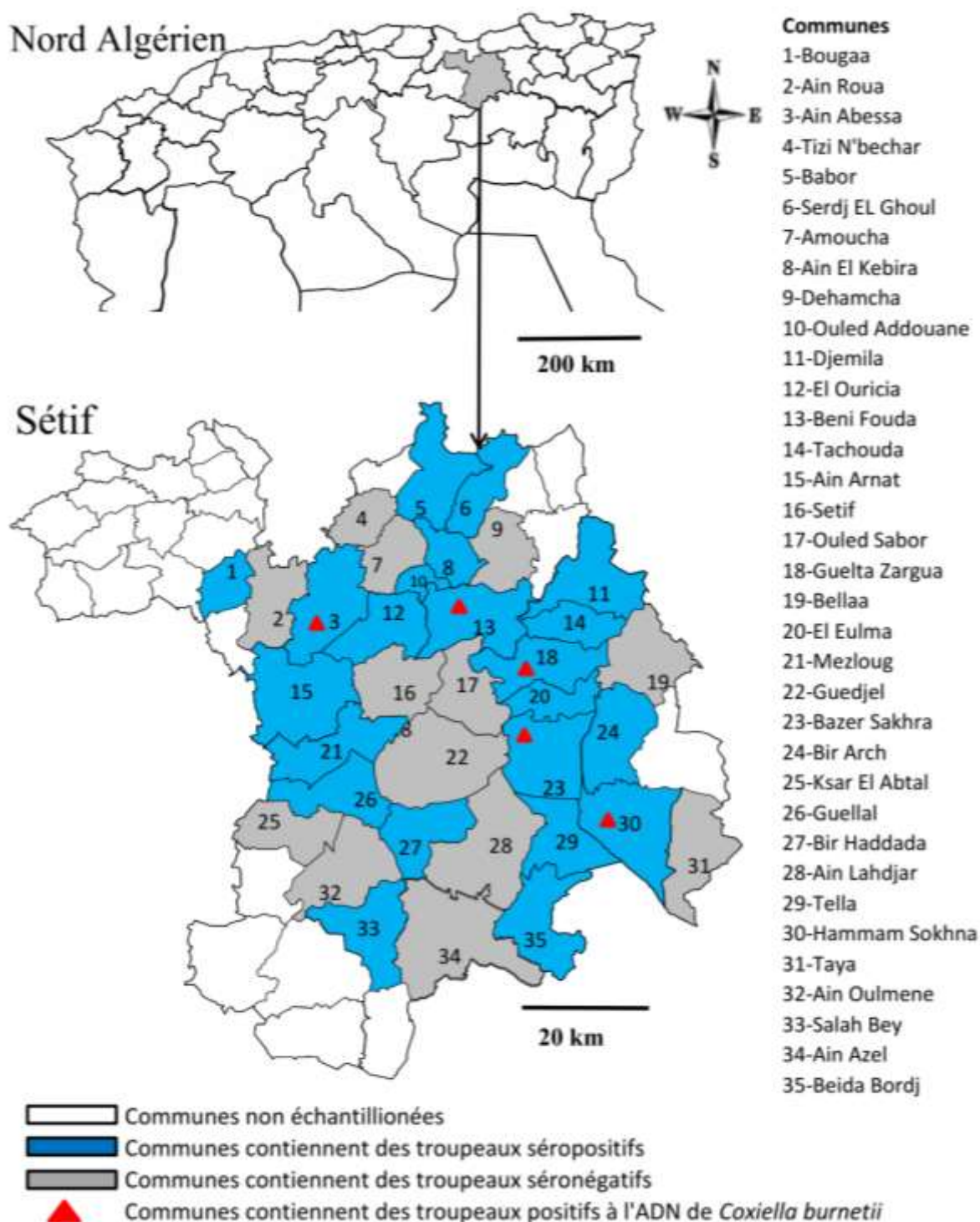


**Figure 18** : Photographie du résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'IS1111 issus des échantillons de lait de mélange (B). (Marqueur d'ADN (A), contrôle positif (C) et contrôle négatif (D)).

L'analyse phylogénique a montré que les séquences IS1111 obtenues dans le lait bovin présentent 100 % de similarité avec celles détectées dans les échantillons de sang total et celles de *C. burnetii* déposées dans le Genbank (numéro d'accèsion CP035112.1, CP040059.1, CP014354.1, CP013667.1 et autres).

Parmi 35 communes sélectionnées dans cette étude, 22 contiennent au moins un troupeau positif par ELISA soit un taux de 62.95 % (IC 95% : 45.85%-78.86%) et 7 positifs par PCR

soit un taux de 20 % (IC 95% : 6.74%-33.25%). La répartition des troupeaux infectés par *C. burnetii* selon les communes est illustrée dans la figure 19 et tableau 9.



**Figure 19** : Carte de la région de Sétif au Nord-Est de l'Algérie, illustrant les communes qui contiennent des troupeaux positifs.

**Tableau 9** : Distribution des troupeaux positifs vis-à-vis de *Coxiella burnetii* en utilisant le lait bovin de tank comme matrice de diagnostic par commune.

Communes	No. de troupeaux échantillonnés	No. de troupeaux positifs par ELISA	No. de troupeaux positifs par PCR
1-Bougaa	3	2	0
2-Ain Roua	4	0	0
3-Ain Abessa	8	5	3
4-Tizi N'bechar	3	0	0
5-Babor	4	2	0
6-Serdj EL Ghoul	2	1	0
7-Amoucha	3	0	0
8-Ain El Kebira	5	3	0
9-Dehamcha	1	0	0
10-Ouled Addouane	3	1	0
11-Djemila	2	1	0
12-El Ouricia	5	3	0
13-Beni Fouda	5	3	2
14-Tachouda	5	2	0
15-Ain Arnat	8	4	2
16-Setif	3	0	0
17-Ouled Sabor	4	0	0
18-Guelta Zargua	10	4	2
19-Bellaa	8	0	0
20-El Eulma	10	6	0
21-Mezloug	7	4	0
22-Guedjel	7	0	0
23-Bazer Sakhra	12	6	4
24-Bir Arch	9	5	0
25-Ksar El Abtal	3	0	0
26-Guellal	6	3	0
27-Bir Haddada	7	3	0
28-Ain Lahdjar	9	0	0
29-Tella	14	6	4
30-Hammam Sokhna	10	4	0
31-Taya	5	0	0
32-Ain Oulmene	2	0	0
33-Salah Bey	2	2	1
34-Ain Azel	3	0	0
35-Beida Bordj	8	4	0
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>74</b>	<b>18</b>

## 4.2 Concordance entre la méthode de PCR et la technique ELISA

La comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes pour la mise en évidence de l'infection par *C. burnetii* dans le lait de tank de vache a révélé 10 échantillons positifs par les deux techniques (ELISA+/PCR+) (5 % ; IC 95% ; 1.98%-8.02%), 8 positifs uniquement par la méthode de PCR (ELISA-/PCR+) (4 % ; IC 95% ; 1.28% -6.71%), 64 positifs uniquement par la technique d'ELISA (ELISA+/PCR-) (32 % ; IC 95% ; 25.53% -38.46%) et 118 négatifs par les deux techniques (ELISA-/PCR-) (59% ; IC 95% ; 52.18%-65.81%) (tableau 10). Le test kappa de Cohen a montré un coefficient k égal à 0,0849 (IC 95% ; 0-0.189), ce qui correspond à une très faible concordance entre les résultats des techniques ELISA et PCR. Le test de McNemar a également montré que les deux méthodes de diagnostic donnaient des résultats significativement différents ( $p < 0,01$ ) (tableau 10).

**Tableau 10** : Concordance entre les méthodes ELISA et PCR pour la détection de l'infection par *Coxiella burnetii* sur du lait bovin de tank.

Techniques	ELISA		Total
	Positif	Négatif	
PCR	Positif	8	18
	Négatif	118	182
	total	126	200
Coefficient de Kappa de Cohen	0.0849 (IC 95 % : 0-0.189)		
Test de McNemar	9.06 <sup>e-11</sup>		

## 5 Discussion

Dans cette étude, le lait de tank bovin a été analysé par la technique ELISA indirecte pour détecter les anticorps spécifiques de *C. burnetii*. Cette technique utilise des antigènes obtenus à partir d'une souche ovine européenne de *C. burnetii* et qui est considérée plus sensible que celle utilisant des antigènes préparés à partir de la souche de référence Nine Mile isolée à partir de tiques (EFSA, 2010). La méthode de PCR utilisée dans cette étude amplifie un fragment de gène correspondant à l'élément d'insertion IS1111 qui est caractérisé par une sensibilité élevée en raison de la présence de plusieurs copies de gène IS1111 dans le génome



de *C. burnetii* (Klee et al., 2006 ; Boarbi et al., 2016). De plus, la vaccination contre *C. burnetii* n'est pas pratiquée en Algérie, par conséquent, notre résultat ne peut refléter qu'une infection naturelle.

### **5.1 Prévalence de la coxiellose chez les troupeaux bovins laitiers de la wilaya de Sétif**

Cette étude a révélé que parmi les 200 échantillons de lait de tank analysés par ELISA indirect, 74 se sont révélés positifs aux anticorps spécifiques de *C. burnetii* (37 %). Parmi les 74 troupeaux séropositifs, 54 sont faiblement séropositifs (+) (27 %), 20 sont moyennement séropositifs (++) (10 %) et aucun des troupeaux ne s'est avéré comme hautement séropositif (+++). Ceci est expliqué par la dominance des troupeaux à faible séoprévalence intra-troupeau dans notre région d'étude et corrobore notre résultat de l'enquête sérologique menée sur des échantillons de sérum bovins qui a rapporté une séoprévalence intra troupeau de 23,71 % (chapitre I). En revanche, la séoprévalence du troupeau obtenue dans cette étude (37 %) est légèrement inférieure à celle retrouvée dans l'enquête sérologique précédente (45.55 %) (chapitre I). Cette constatation peut s'expliquer d'une part, par le respect des mesures d'hygiène et de biosécurité dans les grands élevages bovins commerciaux et d'autre part, par le critère de séropositivité des deux enquêtes sérologiques qui sont différentes (Anastácio et al., 2016). En effet, dans l'étude précédente, un troupeau était considéré comme séropositif lorsqu'il contient au moins une vache séropositive, surtout que la majorité des fermes sélectionnées étaient de faible taille et par conséquent, la totalité était prélevée. Alors que dans la présente étude, un troupeau est considéré séropositif lorsqu'il contient au moins 10% des vaches en lactation séropositives, car la sensibilité de ce kit ELISA diminue lorsque la séoprévalence intra-troupeau est inférieure à 10 % (Meunier, 2008; Muskens et al., 2011; Czaplicki et al., 2012; Anastácio et al., 2016). De plus, les échantillons du lait de tank n'incluent pas les vaches tarées ou malades (ex : mammite) qui peuvent être probablement des séropositives. D'où l'intérêt de répéter l'échantillonnage du lait de tank à intervalles réguliers pour couvrir tous les animaux de la ferme. Plusieurs études ont rapporté de grandes variations dans la prévalence de *C. burnetii* chez les troupeaux bovins dans le monde. En effet, une revue de la littérature sur la prévalence de l'infection à *C. burnetii* basée sur des méthodes sérologiques et moléculaires chez les ruminants domestiques a montré une prévalence mondiale de la coxiellose bovine au niveau du troupeau qui varie de 4.4 % à 100 %, avec une moyenne de 37.7 % (Guatteo et al., 2011). En comparant nos résultats avec ceux obtenus dans d'autres enquêtes épidémiologiques utilisant le lait de tank comme matrice de diagnostic

pour déterminer la prévalence du troupeau, notre séroprévalence apparente est similaire à celle obtenue au Portugal (37.8 %) (Anastácio et al., 2016). Cependant, elle semble être inférieure à celle observée en Pologne (45.5%) (Szymańska-Czerwińska et al., 2019), en Belgique (57.8 %) (Czaplicki et al., 2012), au Danemark (59 %) (Agger et al., 2013), en Espagne (66.9 %) (Astobiza et al., 2012b), aux Pays-Bas (78.6 %) (81.6 %) (Muskens et al., 2011 ; van Engelen et al., 2014) et en Jordanie (70.9 %) (Obaidat et Kersh, 2017).

L'excrétion de *C. burnetii* dans le lait de tank a été détectée dans 18 troupeaux parmi 200 testés soit une prévalence de 9 %. À l'instar de l'enquête sérologique, la prévalence de *C. burnetii* par outil moléculaire est également inférieure à celle retrouvée dans la majorité des enquêtes publiées à travers le monde, notamment celles réalisées en Europe et aux États-Unis. Citons l'exemple des Pays-Bas dans deux études différentes (56.6 % et 18.8 %) (Muskens et al., 2011 ; van Engelen et al., 2014), de Portugal (20 %) (Anastácio et al., 2016), de Belgique (30 %) (Czaplicki et al., 2012), de Pologne (36.9 %) (Szymańska-Czerwińska et al., 2019), de l'Italie (40.1 %) (Valla et al., 2014), de l'Espagne (51,7 %) (Astobiza et al., 2012b) et des États-Unis (94.3 %) (Kim et al., 2005). Cela est expliqué par le fait que ces pays possèdent un cheptel bovin très important avec de nombreux troupeaux de grandes tailles, ce qui favorise la dissémination de l'infection par *C. burnetii* entre les élevages bovins (McCaughey et al. 2010 ; Ryan et al. 2011 ; Agger et al., 2013 ; Anastácio et al., 2014; van Engelen et al., 2014). Cependant, des études iraniennes rapportent des prévalences similaires voir plus faibles (5 %), (6.2 %) et (8.6 %) (Rahimi et al., 2010 ; Borji et al., 2014 ; Nokhodian et al., 2016). En fait, l'excrétion laitière de *C. burnetii* constitue la voie la plus importante de dissémination de la bactérie dans l'environnement par les élevages bovins laitiers, car elle peut durer jusqu'à 13 mois (Rahman et al., 2016). La présence de *C. burnetii* dans le lait de bovins laitiers a été confirmée dans de nombreux pays du monde et soulève des préoccupations quant au rôle du lait non pasteurisé en tant que source potentielle de maladie chez l'homme (Pexara et al., 2018). Certaines études ont rapporté un taux de séroprévalence et de maladie plus élevés chez les patients consommant du lait cru (Eldin et al., 2013). La contamination du lait cru peut en outre générer des aérosols contaminés au cours des différentes étapes de la manipulation du lait, notamment la traite des vaches et la manipulation du lait dans les fermes et les laiteries. Par conséquent, il est nécessaire de prendre des mesures préventives telles que la pasteurisation du lait et l'utilisation de matériels de protection nécessaires (Rahman et al., 2016).

## 5.2 Concordance entre les méthodes de diagnostic ELISA et PCR

Sur la base du test kappa de Cohen, une très faible concordance entre les résultats des techniques ELISA et PCR utilisées pour détecter l'infection à *C. burnetii* dans le lait du tank a été obtenue 0.0849 (IC 95 % : 0-0.189). Le test de McNemar a également révélé que les deux techniques donnaient des résultats significativement différents ( $p < 0.01$ ). Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres études (Czaplicki et al., 2012 ; Anastácio et al., 2016). Cette différence est liée d'une part, par la présence de troupeaux laitiers positifs par ELISA et négatifs par PCR, avec une prévalence qui semble importante (32 %) par rapport à la prévalence globale obtenue par les deux méthodes de diagnostic (41%), ce qui indique une infection antérieure avec absence de vaches excrétrices de *C. burnetii* (Muskens et al., 2011 ; Anastácio et al., 2016). D'autre part, par la présence de troupeaux laitiers testés positifs par PCR et négatifs par ELISA (4 %). Ceci peut être expliqué par la présence de vaches infectées récemment n'ayant pas encore fabriqué d'anticorps contre la bactérie ou bien le taux de ces derniers est sous le seuil de la détectabilité (Muskens et al., 2011 ; Anastácio et al., 2016). Enfin, la comparaison entre les méthodes moléculaires et sérologiques pour la recherche de *C. burnetii* dans le lait bovin n'est pas appropriée, car la réponse immunitaire est plus durable que l'excrétion de cette bactérie dans le lait (Boroduske et al., 2017). De plus, l'excrétion est parfois intermittente (Rodolakis et al., 2007), se produit chez des animaux séronégatifs (Rodolakis et al., 2007) et peut également se produire par d'autres voies telles que les glaires vaginales et les selles et non pas dans le lait (Guatteo et al., 2006 ; 2007).

## 6 Conclusion

Cette étude a montré que 37 % des troupeaux de vaches laitières possèdent des anticorps anti-*C. burnetii* et 9 % excrètent *C. burnetii* dans le lait dans la région de Sétif. Ces taux sont relativement bas comparés à ceux publiés dans d'autres régions du monde. Cependant, la mise en œuvre de programmes de prophylaxie et de contrôle est nécessaire pour prévenir la propagation de l'infection par *C. burnetii* chez les bovins et le risque potentiel sur la santé publique. Le test du lait de tank est un bon outil de surveillance et de contrôle de la coxiellose dans les troupeaux de vaches laitières, à condition de combiner des méthodes de diagnostic moléculaires et sérologiques avec une répétition d'échantillonnage à intervalle régulier. De plus, des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser les géotypes de *C. burnetii* circulant dans les troupeaux bovins de la zone étudiée.

### Chapitre III :

Enquête épidémiologique sur la diversité des tiques bovines et leur  
taux d'infection par *Coxiella burnetii* dans la région de Sétif

### Chapitre III : Enquête épidémiologique sur la diversité des tiques bovines et leur taux d'infection par *Coxiella burnetii* dans la région de Sétif

#### 1 Introduction

Les tiques constituent un vecteur potentiel et un réservoir naturel de *Coxiella burnetii* (Spyridaki et al., 2002) et plus de 40 espèces de tiques différentes ont été trouvées naturellement infectées par *C. burnetii* à travers le monde (Maurin et al., 1999 ; EFSA, 2010). Les tiques transmettent l'agent pathogène à la fois horizontalement et verticalement, c'est-à-dire de manière transstadiale et transovarienne aux prochaines générations de tiques (Altay Çapin et al., 2013; Eldin et al., 2017). Ceci permet le maintien de *C. burnetii* dans l'environnement (Spyridaki et al., 2002; Dorko et al., 2012; Kumsa et al., 2015). Les tiques transmettent *C. burnetii* principalement entre animaux sauvages et occasionnellement aux ruminants domestiques (EFSA, 2010; Porter et al., 2011; Jourdain et al., 2015). Elles sont infectées lors de la prise d'un repas sanguin provenant d'un animal infecté par *C. burnetii*. Cette dernière se multiplie dans les cellules de la partie moyenne de l'intestin des tiques, puis est excrétée dans leurs salives et leurs matières fécales (Porter et al., 2011; Kumsa et al., 2015; Ndeereh et al., 2017). Par conséquent, cet agent pathogène a été transmis à d'autres animaux directement lors d'un autre repas sanguin ou indirectement par propagation aérogène d'excréments fécaux de tiques séchées (Sprong et al., 2012; Ogo et al., 2013). Les infections humaines et animales sont principalement causées par l'inhalation d'aérosols ou de poussières provenant d'excréments contaminés par *C. burnetii* (Porter et al., 2011). Cependant, les transmissions orales et vectorielles par les tiques ont été rapportées chez les animaux alors qu'elles restent controversées chez l'homme (Toledo et al., 2009a ; Pexara et al., 2018 ; Eldin et al., 2017). En Algérie, seules quatre études ont révélé la présence de *C. burnetii* chez les tiques. En effet, Leulmi et al. (2016) ont détecté *C. burnetii* chez des tiques du genre *Ixodes* *vespertilionis* récoltées sur des chauves-souris. Aouadi et al. (2017) ont détecté la bactérie chez *Rhipicephalus bursa* prélevée sur des petits ruminants à Souk Ahras. Abdelkadir et al. (2019) ont mis en évidence l'infection d'*Hyalomma excavatum* et *Rh. bursa* prélevées à partir de ruminants domestiques au Nord-Ouest Algérien. Enfin, Bellabidi et al. (2020) ont récemment rapporté la présence de *C. burnetii* chez *Hyalomma dromedarii*, *Hyalomma impeltatum* et *Hyalomma excavatum* collectées à partir de dromadaires au Sud-Est de l'Algérie.

## **2 Objectifs de l'étude**

En Algérie, il existe un manque de connaissances sur la fréquence des espèces de tiques dures chez le bovin et des maladies zoonotiques transmises par ces tiques. Dans ce contexte, la présente étude réalisée dans la région de Sétif, vise les objectifs suivants :

- Estimer la prévalence d'infestation des troupeaux bovins d'infestation des bovins par les tiques dures.
- Déterminer la diversité des tiques bovines identifiées.
- Déterminer les espèces de tiques porteuses de *C. burnetii* et évaluer le taux d'infection.
- Déterminer la prévalence des troupeaux infestés par des tiques porteuses de *C. burnetii*.

## **3 Matériel et Méthodes**

Le matériel nécessaire à l'échantillonnage et l'analyse du laboratoire est présenté en annexe 1 et 3 respectivement.

### **3.1 Prélèvement des tiques**

Un total de 228 troupeaux bovins contenant 2508 bovins de différents âge, sexe et race, localisés dans 47 communes de la région de Sétif ont été sélectionnés aléatoirement et examinés pour rechercher la présence de tiques dures durant la période s'étalant du mars 2016 à avril 2018 (figure 20). Selon le degré d'infestation des animaux, nous avons récolté un nombre de un jusqu'à dix tiques par animal infesté. Sur les bovins ayant une bonne contention, les tiques sont recherchées visuellement au niveau des zones de prédilection c'est-à-dire les parties où la peau est fine (mamelle et région anogénitale), ensuite prélevées à l'aide d'un forceps par simple traction en veillant à préserver leur intégrité pour ne pas abîmer le rostre qui est important dans la diagnose des tiques. Le nombre de troupeaux inspectés pour chaque commune est présenté au tableau 11.



**Figure 20** : Carte de la région de Sétif, reprenant les communes (zone grise) échantillonnées pour la collecte de tiques sur des troupeaux bovins.

**Tableau 11** : Répartition des troupeaux échantillonnés en fonction de la commune.

Communes	No. de troupeaux échantillonnés	Communes	No. de troupeaux échantillonnés
1-Beni Ouartilene	2	25-Bellaa	5
2-Ain Legradj	1	26-El Eulma	10
3-Draa Kebila	2	27-Mezloug	4
4-Bousselam	2	28-Guedjel	4
5-Maouklane	1	29-Bazer Sakhra	9
6-Bougaa	5	30-Bir Arch	6
7-Ain Roua	4	31-El Ouldja	2
8-Ain Abessa	12	32-Ksar El Abtal	5
9-Tizi N'bechar	3	33-Guellal	4
10-Babor	4	34-Bir Haddada	4
11-Serdj EL Ghoul	2	35-Ain Lahdjar	3
12-Beni Aziz	5	36-Tella	8
13-Amoucha	3	37-Hammam Sokhna	6
14-Ain El Kebira	4	38-Taya	4
15-Dehamcha	6	39-Ain Oulmene	2
16-Ouled Addouane	6	40-Rosfa	5
17-Djemila	8	41-Salah Bey	4
18-El Ouricia	7	42-Ain Azel	4
19-Beni Fouda	9	43-Beida Bordj	5
20-Tachouda	5	44-Hamma	2
21-Ain Arnat	9	45-Ain Sebt	4
22-Setif	5	46-Moaouia	6
23-Ouled Sabor	3	47-Beni Hocine	4
24-Guelta Zargua	10		
<b>Total</b>		<b>228</b>	

### 3.2 Conservation des tiques

Les tiques ont été conservées dans des tubes identifiés, contenant de l'éthanol à 70 % et maintenu à température ambiante pour éviter la déshydratation des échantillons et assouplir davantage le tégument.

### 3.3 Identification et regroupement des tiques

Les tiques ont été identifiées individuellement à l'aide d'un stéréomicroscope en se basant sur leurs caractéristiques morphologiques, comme décrit dans le guide clé d'identification des tiques établis par Walker et ses collaborateurs (Walker et al., 2003 ; 2014). Au total 712



tiques ont été regroupées en 159 pools selon l'espèce, le stade du développement, le sexe, l'état de gorgement des tiques ainsi que leur appartenance aux troupeaux.

### **3.4 Analyse moléculaire**

#### **3.4.1 Extraction d'ADN des tiques**

##### **3.4.1.1 Préparation**

-Laver les tiques de chaque pool par l'eau stérile pendant 10 min et les sécher sur un papier filtre stérile.

-Couper longitudinalement les tiques en deux moitiés égales avec un scalpel stérile à usage unique (une moitié de chaque tique a été conservée comme échantillon de réserve afin d'éviter le risque de perte après extraction de l'ADN).

-Mettre les tiques dans des tubes stériles à usage unique de 10 ml.

##### **3.4.1.2 Extraction**

-Ajouter 600 µl du tampon de lyse ATL au contenu des tubes et vortexer.

-Ajouter 60 µl de Protéinase K et incuber à 56 °C pendant 24 h dans un bain-marie thermomixeur.

-Ajouter 200 µl d'éthanol (96-100 %), puis vortexer.

-Transférer l'échantillon dans une colonne DNeasy Mini spin column placé sur un tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen et centrifuger à ~ 6000 x g (8000 T/min) pour 1 min. Jeter l'éluât et le tube de collection.

-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un nouveau tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen, ajouter 500 µl de Tampon AW1 et centrifuger à ~ 6000 x g (8000 T/min) pendant 1 min. Jeter l'éluât et le tube de collection

-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un nouveau tube de collection de 2 ml fourni par Qiagen, ajouter 500 µl de Tampon AW2 et centrifuger à 20000 x g (14000 T/min) pendant 3 min pour sécher la DNeasy membrane. Jeter l'éluât et le tube de collection.

-Placer la colonne DNeasy Mini spin sur un tube 1.5 ml propre (non fourni par Qiagen), et pipeter 50 µl de Tampon AE directement sur la DNeasy membrane.

-Incuber à la température ambiante pendant 1 min, et centrifuger 1 min à ~ 6000 x g (8000 T/min). Repasser l'éluât sur la colonne pour un maximum de production d'ADN.

##### **3.4.2 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)**

Pour augmenter la spécificité et la sensibilité de la technique PCR. Des extraits d'ADN provenant de 159 pools de tiques ont été analysés par deux PCR classiques différentes. La

première PCR cible le gène IS1111, qui a été réalisée selon le protocole mis au point précédemment au chapitre I à la section de l'analyse moléculaire des échantillons de sang total (chapitre I, page 51 à 58). Les copies IS1111 trouvées dans le génome de *C. burnetii* peuvent être à 100 % identiques à celles identifiées chez *Coxiella* endosymbiotique (Vilcins et al., 2009 ; Duron, 2015a). Cette dernière n'est pas un agent pathogène, mais plutôt un symbiote mutualiste de tiques (Smith et al., 2015 ; Gottlieb et al., 2015; Guizzo et al., 2017). Par conséquent, pour éviter la réaction croisée entre ces deux microorganismes, une seconde PCR utilise l'amorce forward C.B.-1 :5'- ACT CAA CGC ACT GGA ACC GC-3' et l'amorce reverse C.B.-2 : 5'-TAG CTG AAG CCA ATT CGC C-3') pour amplifier spécifiquement 257 paires de bases du gène codant pour l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) de *C. burnetii* a été réalisée (Stein et Raoult., 1992 ; Masala et al., 2004 ; Altay Çapin et al., 2013 ; Mtshali et al., 2015 ; Chisu et al., 2018).

Le mélange réactionnel utilisé pour l'amplification du gène SOD était composé de : 5.5 µl d'eau UP, 12.5 µl de Master Mix Quantitech (Qiagen, Hilden, Allemagne), 1 µl de chacune des deux amorces et 5 µl d'extrait d'ADN d'un échantillon pour un volume total de 25 µl. Les conditions thermales d'amplification consistaient à réaliser un cycle de pré-dénaturation à 95 °C pendant 15 min, suivi par 40 cycles de l'amplification de l'ADN d'intérêt comprenant chacun 1 min de dénaturation à 94 °C, 30 s d'hybridation des amorces à 62 °C et 1 min de polymérisation à 72 °C, et un dernier cycle de post-polymérisation à 72 °C pendant 5 min. Le résultat d'amplification était vérifié par une migration du produit d'amplification sur un gel d'agarose à 1.5 % coloré avec du SYBR Safe DNA (Thermo Fisher™ Applied Biosystems™ Waltham, MA, USA) et révélé sous une lumière UV. Les échantillons positifs ont été purifiés et séquencés de manière similaire à ceux du sang et du lait (chapitre I et II).

### 3.5 Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de SPSS 25 (Chicago, IL, USA). Les prévalences d'infestation des troupeaux bovins par les tiques (%) ont été calculées en divisant le nombre de troupeaux infestés par les tiques sur le nombre total de troupeau visités, multiplié par 100. Le test du khi carré ou le test exact de Fisher a été mesuré pour comparer la différence de prévalence de *C. burnetii* dans les groupes de tiques. La différence était considérée comme statistiquement significative lorsque la valeur *p* était <0.05. Les taux d'infection des tiques par *C. burnetii* dans les pools ont été estimés à l'aide d'un estimateur du maximum de vraisemblance (EMV) avec un intervalle de confiance de 95 %. EMV a été calculé selon deux équations statistiques différentes selon que la taille des pools est égale (1) ou inégale (2).

1.  $EMV=1-(1-\frac{y}{x})^{1/m}$  (Walter et al., 1980).

Ou m = nombre de tiques dans un pool (taille du pool), x= nombre de pools et y= nombre de pools positifs.

2.  $EMV=1-(1-\frac{Np}{N})^{1/mp}$  (Clements, 2012).

Ou mp = la taille moyenne du pool (taille du pool), N= nombre de tiques dans tous les pools et Np= nombre de tiques dans les pools positifs.

Cependant, dans notre recherche, nous avons utilisé logiciel PooledInfRate (version 4.0) intégrée au Microsoft Excel (Biggerstaff, 2009) pour estimer EMV.

### **3.6 Considération éthique**

Un consentement verbal a été obtenu auprès des éleveurs participants après avoir expliqué le but et l'importance de l'étude. Toutes les directives internationales applicables pour le soin et l'utilisation des animaux ont été suivies.

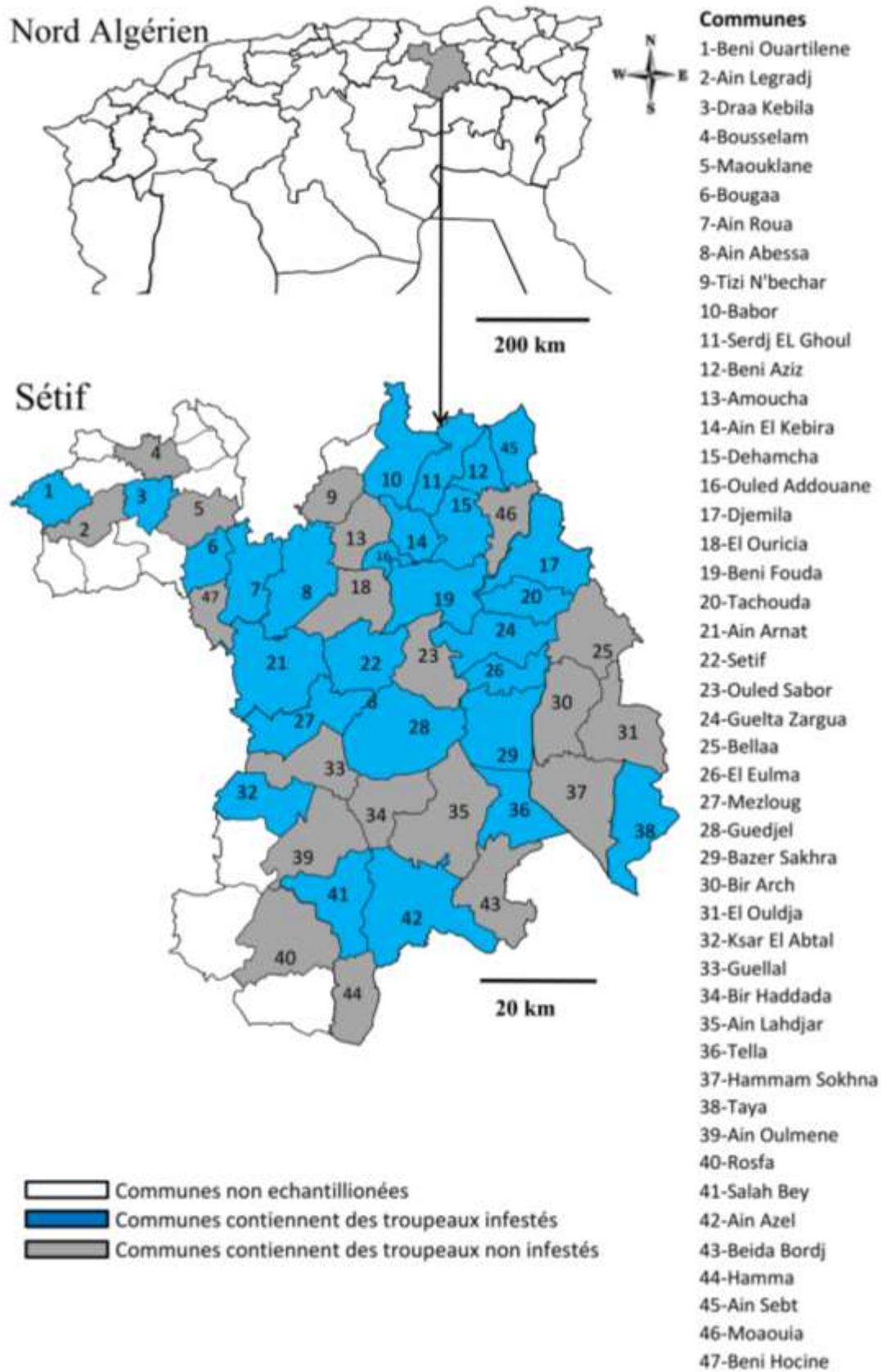
## **4 Résultats**

### **4.1 Prévalence d'infestation des troupeaux bovins par les tiques dures**

À l'échelle individuel, parmi les 2508 bovins observés, 222 étaient infestés soit une prévalence de 8.85 % (IC 95% : 7.74%-9.96%).

À l'échelle de troupeau, des tiques ont été trouvées dans 52 troupeaux parmi 228 inspectés dans la région de Sétif soit une prévalence de 22.80 % (IC 95% : 17.36%-28.25%).

La distribution géographique des troupeaux infestés est présentée à la figure 21. Le tableau 12 présente le nombre de troupeaux inspectés et infestés pour chaque commune.



**Figure 21** : Carte de la région de Sétif illustrant les communes qui renferment des troupeaux infestés.

**Tableau 12** : Répartition géographique des troupeaux infestés par les tiques dures en fonction de la commune.

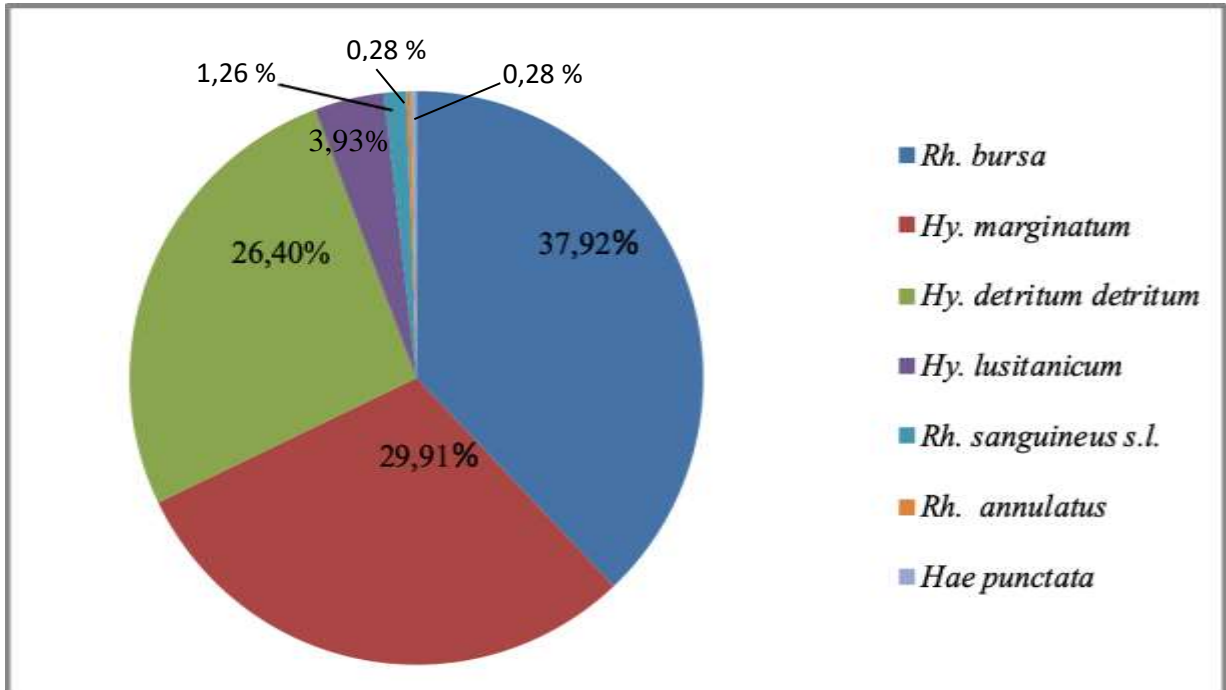
Communes	No. de troupeaux prélevés	No. de troupeaux infestés	Communes	No. de troupeaux prélevés	No. de troupeaux infestés
1-Beni Ouartilene	2	1	25-Bellaa	5	0
2-Ain Legradj	1	0	26-El Eulma	10	2
3-Draa Kebila	2	2	27-Mezloug	4	2
4-Bousselam	2	0	28-Guedjel	4	1
5-Maouklane	1	0	29-Bazer Sakhra	9	2
6-Bougaa	5	2	30-Bir Arch	6	0
7-Ain Roua	4	2	31-El Ouldja	2	0
8-Ain Abessa	12	4	32-Ksar El Abtal	5	2
9-Tizi N'bechar	3	0	33-Guellal	4	0
10-Babor	4	3	34-Bir Haddada	4	0
11-Serdj EL Ghoul	2	2	35-Ain Lahdjar	3	0
12-Beni Aziz	5	1	36-Tella	8	2
13-Amoucha	3	0	37-Hammam Sokhna	6	0
14-Ain El Kebira	4	2	38-Taya	4	2
15-Dehamcha	6	1	39-Ain Oulmene	2	0
16-Ouled Addouane	6	2	40-Rosfa	5	0
17-Djemila	8	3	41-Salah Bey	4	2
18-El Ouricia	7	0	42-Ain Azel	4	2
19-Beni Fouda	9	3	43-Beida Bordj	5	0
20-Tachouda	5	2	44-Hamma	2	0
21-Ain Arnat	9	2	45-Ain Sebt	4	1
22-Setif	5	1	46-Moaouia	6	0
23-Ouled Sabor	3	0	47-Beni Hocine	4	0
24-Guelta Zargua	10	1			

#### 4.2 Diversité des tiques bovines présentes dans la wilaya de Sétif

Le résultat de l'identification au laboratoire a révélé la présence de 7 espèces de tiques rattachées à 4 genres ou sous genres différents. Les tiques du genre *Hyalomma* ont été largement plus abondantes avec un nombre de 429 soit un taux de 60.25 %, suivies par les tiques du genre *Rhipicephalus* avec 281 tiques soit un taux de 39.46 %. Enfin, les tiques les moins représentatives ont été celles du genre *Haemaphysalis* avec seulement 2 tiques soit 0.28 % de l'effectif total.





















L'espèce majoritaire dans notre milieu d'étude est *Rhipicephalus bursa* (37.92 %), suivie de *Hyalomma marginatum* (29.91%) et *Hyalomma detritum detritum* (26.40 %) respectivement (tableau 13) (Figure 22 et 23). Les espèces *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus sanguineus*

*sensu lato*, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, et *Haemaphysalis punctata* ont été moins présentes avec des fréquences respectives de (3.93 %), (1.26 %) , (0.28 %) et (0.28 %) (figure 22 et 23) (tableau 13).



**Figure 22** : Fréquence des espèces de tiques infestant les bovins de la région de Sétif.

En outre, parmi les tiques identifiées, il y avait 390 femelles adultes (54.77 % dont 4.35 % non engorgées; 21.06 % partiellement engorgées; 29.35 % entièrement engorgées), 261 mâles adultes (36.65 % dont 16.57 % non engorgés et 20.08 % partiellement engorgés), et 61 nymphes appartenant à *Rh. bursa* (8.56 % dont 7.72 % non engorgées; 0.84 % partiellement engorgées). La diversité et la fréquence des tiques examinées sont présentées au tableau 13.

Espèce	Face	<i>Rh. bursa</i>	<i>Hy. marginatum</i>	<i>Hy. detritum detritum</i>	<i>Hy. lusitanicum</i>	<i>Rh. sanguineus s.l.</i>	<i>Rh. annulatus</i>	<i>Hae. punctata</i>
Male	Dorsale						non identifiée	
	Ventrale						non identifiée	
Femelle	dorsale							<b>Photos non prises</b>
	ventrale			<b>Photos non prises</b>				

**Figure 23:** Diversité des tiques bovines dans la wilaya de Sétif.

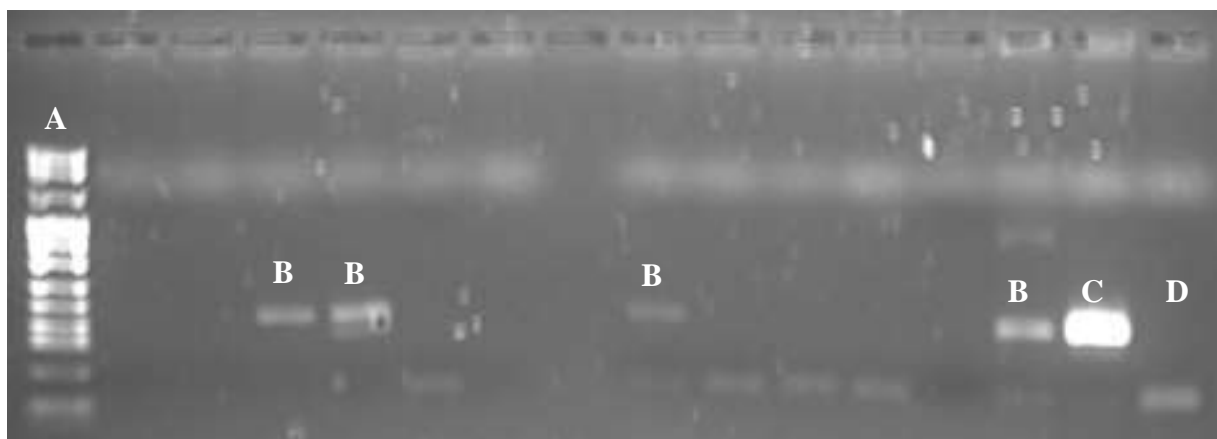
**Tableau 13** : Répartition des espèces de tiques collectées chez les bovins dans la wilaya de Sétif en fonction de leur stade de développement, leur sexe et leur état de gorgement.

Espèce de tiques	Stade de développement		Sexe		Etat de gorgement						No. de tique (%)*		
	Adulte	nymphe	Male	femelle	Male			Femelle				Nymphe	
					Engorgé	Partiellement engorgé	Non Engorgée	partiellement engorgée	Entièrement engorgée	Non engorgée		Partiellement engorgée	
<i>Rh. bursa</i>	209	61	72	137	26	46	15	47	75	55	6	270 (37.92)	
<i>Rh. sanguineus s.l.</i>	9	/	5	4	5	/	/	/	4	/	/	9 (1.26)	
<i>Hy. marginatum</i>	213	/	77	136	60	17	6	44	86	/	/	213 (29.91)	
<i>Hy. detritum detritum</i>	188	/	95	93	40	55	/	59	34	/	/	188 (26.40)	
<i>Hy. lusitanicum</i>	28	/	12	16	12	/	10	/	6	/	/	28 (3.93)	
<i>Rh. annulatus</i>	2	/	/	2	/	/	/	/	2	/	/	2(0.28)	
<i>Hae.punctata</i>	2	/	/	2	/	/	/	/	2	/	/	2(0.28)	
No. total de tiques	651	61	261	390	143	118	31	150	209	55	6	712	
Fréquence de tiques (%)	91.43	8.57	36.65	54.77	20.08	16.57	4.35	21.06	29.35	7.72	0.84	100	



#### 4.3 Détermination des espèces de tiques porteuses de *Coxiella burnetii* et évaluation du taux d'infection

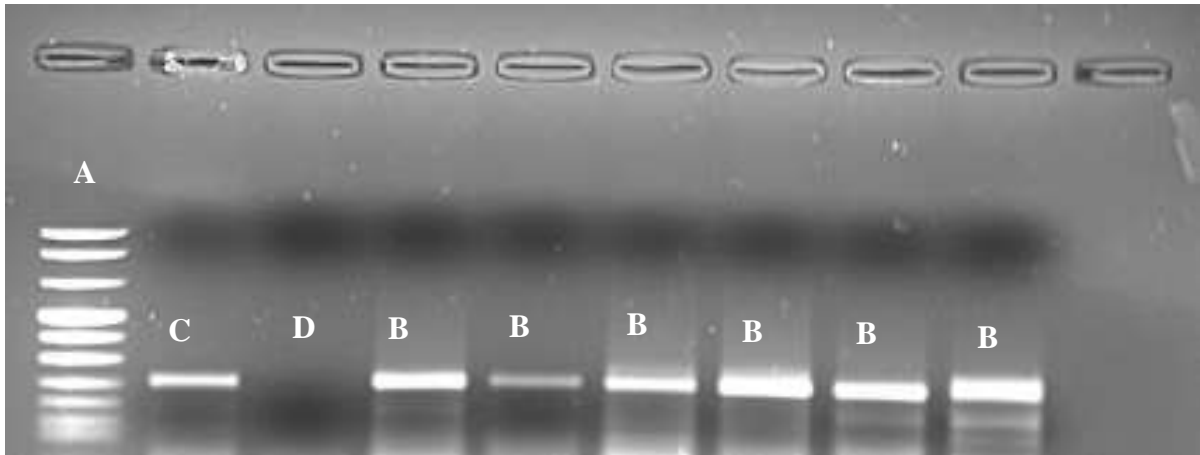
L'analyse moléculaire par la méthode de PCR a révélé que 52 des 159 pools de tiques (32.70 %) étaient positifs ciblant le gène correspondant à l'élément d'insertion IS1111 des coxielles, avec un taux d'infection estimé à l'aide d'un estimateur de maximum de vraisemblance (EMV) égale à 8.41 % (IC 95% : 6.38%-10.79%) (figure 24). L'EMV calculé a montré un taux d'infection de 13.84 % (IC 95% : 3.59%-32.95%) chez *Hy. lusitanicum*, 12.12 % (IC 95% : 7.49%-18.15%) chez *Hy. detritum detritum*, 9.84 % (IC 95% : 6.07%-14.76%) chez *Hy. marginatum* et 4.78% (IC 95% : 2.52%-7.89%) chez *Rh. bursa*. En outre, un seul pool de 2 tiques appartenant à *Rh. annulatus* a été examiné et le résultat était positif. Cependant, les séquences IS1111 n'ont pas été identifiées chez les tiques de *Rh. sanguineus s.l.* et *Hae. punctata* (tableau 14).



**Figure 24 :** Photographie du résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments de la séquence d'insertion IS1111 issue des échantillons de tiques collectées chez les bovins de la wilaya de Sétif (B) (marqueur d'ADN (A), contrôle positif (C) et contrôle négatif (D)).

Cependant, l'amplification du gène codant pour l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) de *C. burnetii* a mis en évidence seulement 14 pools positifs pour l'ADN de *C. burnetii* soit un taux d'infection estimé par EMV égale à 2.05 % (IC 95% : 1.16%-3.29%) (figure 25) ce qui correspond à 14 tiques positives. En plus, il s'est avéré que ces derniers sont également positifs pour IS1111.

*C. burnetii* a été détectée dans 7 pools de tiques appartenant à *Rh. bursa* (EMV : 2.71 % ; IC 95% : 1.17%-5.18%) dont un pool est une nymphe et six sont des adultes, 4 pools de tiques adultes d'*Hy. detritum detritum* (EMV: 2.23 % ; IC 95% : 0.7%-5.11%) et 3 pools de tiques adultes d'*Hy. marginatum* (EMV: 1.46 % ; IC 95% : 0.36%-3.74%).



**Figure 25** : Photographie du résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose du gène codant la protéine SOD de *Coxiella burnetii* provenant des échantillons de tiques (B). (marqueur d'ADN (A), contrôle positif (C) et contrôle négatif (D)).

Si on observe la répartition des tiques porteuses de *C. burnetii* selon le stade de développement, le sexe, et l'état de gorgement, nous constatons la présence de cette bactérie chez les nymphes et les adultes, chez les mâles et les femelles, et chez les tiques non engorgées, partiellement engorgées et totalement engorgées. Cependant aucune association significative n'a été enregistrée ( $p < 0.05$ ) (tableau 15).

**Tableau 14** : Taux d'infection des tiques bovines par *Coxiella burnetii*.

Espèce de tiques	No. de tiques	No. de pools analysés	PCR amplifiant le gène IS1111		PCR amplifiant le gène SOD	
			No. de pools positifs	EMV % (IC 95%)	No. de pools positifs	EMV % (IC 95%)
<i>Rh. bursa</i>	270	61	12	4.78 (2.52-7.89)	7	2.71 (1.17-5.18)
<i>Rhi. sanguineus s.l.</i>	9	2	0	NA	0	NA
<i>Hy. marginatum</i>	213	49	18	9.84 (6.07 -14.76)	3	1.46 (0.36-3.74)
<i>Hy. detritum detritum</i>	188	39	18	12.12 (7.49-18.15)	4	2.23 (0.7-5.11)
<i>Hy. Lusitanicum</i>	28	6	3	13.84 (3.59-32.95)	0	NA
<i>Rh. annulatus</i>	2	1	1	NA	0	NA
<i>Hae. punctata</i>	2	1	0	NA	0	NA
<b>No. total de tiques</b>	<b>712</b>	<b>159</b>	<b>52</b>	<b>8.41 (6.38-10.79)</b>	<b>14</b>	<b>2.05 (1.16-3.29)</b>

No : Nombre, EMV : estimateur du maximum de vraisemblance, NA : non applicable, IS1111 : séquence d'insertion, SOD : superoxyde dismutase

**Tableau 15** : Répartition des espèces de tiques porteuse de *Coxiella burnetii* dans la wilaya de Sétif en fonction de leur stade de développement, leur sexe et leur état de gorgement.

Espèce de tique	<i>Rh. bursa</i>		<i>Hy. marginatum</i>		<i>Hy. detritum detritum</i>		No. total de tiques infectées	
	No. (NPP/NPA)	EMV% (IC 95%)	No. (NPP/NPA)	EMV% (IC 95%)	No.(NPP/NPA)	EMV% (IC 95%)	No. (NPP/NPA)	EMV% (IC95%)
<b>Stade de développement</b>								
Adulte	209(6/48)	3.01 (1.21-6.01)	213(3/49)	1.46 (0.36-3.74)	188(4/39)	2.23(0.7-5.11)	610(13/136)	2.22 (1.23-3.64)
nymphe	61 (1/13)	1.7(0.01-7.26)	0	NA	0	NA	61 (1/13)	0.17 (0.01-7.26)
<b>valeur p</b>	<b>1</b>		NA		NA		1	
<b>Sexe</b>								
male	72(3/14)	4.39 (1.11-11.03)	77(0/13)	NA	95(1/18)	1.08 (0.00-4.67)	244(4/45)	1.68 (0.52-3.86)
femelle	137(3/34)	2.29 (0.57-5.83)	136 (3/36)	2.33(0.58-5.93)	93(3/21)	3.46 (0.87-8.73)	366(9/91)	1.96(0.98-3.41)
<b>Valeur p</b>	0.41		0.55		0.36		1	
<b>Etat de gorgement</b>								
Male non engorgé	26(2/6)	9.25(1.59-26.36)	60 (0/10)	NA	55 (1/10)	1.91 (0.11-8.14)	141(3/26)	2.11(0.53-5.38)
Male partiellement engorgé	46(1/8)	2.15 (0.12-9.13)	17 (0/3)	NA	40(0/8)	NA	103(1/19)	1.05(0.00-4.53)
<b>Valeur de p</b>	0.29		NA		1		0.64	
Femelle non engorgée	15(0/3)	NA	6 (0/1)	NA	0	NA	21(0/4)	NA
Femelle partiellement engorgée	47(2/10)	4.46 (0.75-13.16)	44(2/10)	5.17(0.88-15.23)	59(3/12)	5.7(1.44-14.18)	150(7/32)	3.33(1.44-6.34)
Femelle entièrement engorgée	75(1/21)	1.39 (0.00-0.06)	86(1/25)	1.19 (0.00-5.14)	34(0/9)	NA	195(2/55)	1.05(0.18-3.21)
<b>Valeur de p</b>	0.68		0.36		1		0.33	
<b>Nombre total de tiques</b>	270(7/61)	2.71(1.17-5.18)	213(3/49)	1.46 (0.36-3.74)	188(4/39)	2.23(0.7-5.11)	671(14/149)	2.21(1.32-3.41)

NA: non applicable, NPP : nombre de pools positifs, NPA : nombre de pools analysés, EMV : estimateur du maximum de vraisemblance

#### 4.4 Prévalence des troupeaux infestés par des tiques porteuses de *Coxiella burnetii*

Parmi les 228 troupeaux bovins examinés pour la présence de tiques, 52 étaient infestés soit une fréquence de 22.80 % (IC 95% : 17.36%-28.25%). Parmi les 159 pools de tiques issues de 52 troupeaux, 14 pools provenant de 4 troupeaux sont infectés par *C. burnetii* soit une prévalence globale des troupeaux infestés par des tiques porteuses de *Coxiella burnetii* de 1.75 % (IC 95% : 0.05%-3.46%).

### 5 Discussion

#### 5.1 Prévalence d'infestation des bovins par les tiques dures

Sur un total de 2508 têtes bovines appartenant à 228 troupeaux inspectés dans la région de Sétif, des tiques ont été identifiées chez 222 bovins provenant de 52 élevages différents soit une prévalence individuelle de 8.85 % (IC 95% : 7.74%-9.96%) et de 22.80 % (IC 95% : 17.36%-28.25%) au niveau du troupeau. La prévalence faible d'infestation par les tiques dans notre étude est expliquée par l'utilisation courante des acaricides dans les élevages bovins prélevés, avec notamment l'introduction de la fluméthrine (Bayticol®) en raison de sa facilité d'utilisation, son faible coût, sa rémanence et son efficacité meilleure, son délai d'attente nulle et sa toxicité faible (fiche technique du producteur).

Notre prévalence d'infestation est inférieure à celles observées dans deux études menées en Algérie où 30 % et 18 % des bovins étaient infestés par au moins une espèce de tique dans la wilaya de Tiaret en 2003 et d'Alger en 2014 respectivement (Boukhaboul, 2003 ; Amanzougaghene, 2014). La prévalence élevée observée dans la wilaya de Tiaret serait liée à l'utilisation rare des acaricides chez les bovins (Boukhaboul, 2003). La prévalence d'infestation enregistrée dans la wilaya d'Alger est expliquée par le climat humide et pluvieux de la région qui favorise la végétation des bergeries et par conséquent la régénération des tiques.

Il existe plusieurs publications sur la prévalence d'infestation par les tiques chez les bovins dans différentes régions à travers le monde, avec des taux de 56.8 % , 86.1 % , 72.9 % , 60.5 % , 79.5 % , 81.5 % et 63 % rapportés en Iran, en Éthiopie, au Pakistan, en Égypte, en Colombie, en Zimbabwe et à l'île de Corse respectivement (Sajid et al., 2009 ; Ndhlovu et al., 2012 ; Asmaa et al., 2014; Werede et al., 2014 ; Grech-Angelini et al., 2016 ; Ghashghaei et al., 2017 ; Valencia et al., 2017). La variation de la prévalence de l'infestation par les tiques pourrait être due à la distribution géographique, aux conditions climatiques et aux systèmes de

gestion d'élevage (Sohrabi et al., 2013), ainsi qu'aux facteurs intrinsèques de l'étude (Ghashghaei et al., 2017).

## 5.2 Diversité de tiques récoltées chez les bovins de la wilaya de Sétif

Sept (n=7) espèces de tiques appartenant à 4 genres ou sous genres différents ont été identifiées dans notre étude. *Rh. bursa* était l'espèce de tique la plus abondante soit 37.92 % de la population totale de tiques, suivie par *Hy. marginatum* (29.91 %) et *Hy. detritum detritum* (26.40 %) confirmant ainsi leur large distribution dans la région de Sétif. Bien qu'un très faible taux d'espèces de tiques appartenant à *Hy. lusitanicum* (3.93 %), *Rh. sanguineus s. l.* (1.26 %), *Rh. annulatus* (0.28 %) et *Hae. punctata* (0.28 %) ont été identifiées. Ces mêmes espèces de tiques ont déjà été identifiées auparavant dans l'Est de l'Algérie (Meddour-Bouderda et Meddour, 2006).

*Rh. bursa* est une tique à hôtes multiples associée principalement aux ruminants et chevaux, mais elle peut parfois parasiter d'autres espèces animales tels que les ongulés sauvages et les petits mammifères (Walker et al., 2000; Mihalca et al., 2012 ; Antunes et al., 2018) avec un cycle diphasique qui dure une année. Il s'agit d'une espèce typique de la région méditerranéenne (Walker et al., 2003 ; Estrada-Peña et al., 2004). En Afrique du Nord, elle semble se limiter aux régions les moins arides ou semi-arides comme la région de Sétif. En effet, la fréquence moyenne de *Rh. bursa* (37.92 %) retrouvée dans cette étude est plus élevée que celle obtenue dans les régions côtières du pays, caractérisées par un climat plutôt humide comme la région de Annaba (12.54 %) (Dendani, 1987), Jijel (9.35 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2007) ou encore El Taref (2.79 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2014). En revanche, c'était aussi l'espèce le plus fréquemment collectée chez les bovins dans les régions semi-aride de Tiaret et Constantine (Boukhaboul, 2003 ; Benchikh Elfegoun et al., 2019), dans l'île Corse (Grech-Angelini et al., 2016), dans l'île de Minorque (Castellà et al., 2001), en Sicile au Sud de l'Italie (Torina et al., 2006) ainsi que chez les petits ruminants en Sardaigne (Di Todaro et al., 1999). *Rh. bursa* est reconnue comme le principal vecteur de *Babesia bigemina* et *Babesia bovis* chez les bovins et de *Babesia ovis* chez les ovins (Sergent et al., 1945 ; Sergent et al., 1964 ; Bourdeau, 1993; Grech-Angelini et al., 2016). Elle est également un vecteur d'*Anaplasma marginale* chez les bovins et d'*Anaplasma ovis* chez les petits ruminants, ainsi que de *Theileria equi* chez les équidés (Grech-Angelini et al., 2016 ; Antunes et al., 2018). Elle peut transmettre d'autres agents pathogènes tels que *Rickettsia spp* et d'*Anaplasma spp* (Raele et al., 2015; Dahmani et al., 2016; Ferrolho et al., 2016).

*Hy. marginatum* est une espèce à cycle triphasique, ditrope qui vit dans les régions à climat méditerranéen humide et à climat steppique (Walker et al., 2003). La présence d'*Hy. marginatum* en Algérie a été rapportée par d'autres auteurs (Boukhaboul, 2003 ; Bitam et al., 2006 ; Meddour-Bouderda et Meddour, 2006 ; Bouhous et al., 2011; Amanzougaghene, 2014 ; Benchikh Elfegoun et al., 2014 ; Leulmi et al., 2017; Benchikh Elfegoun et al., 2018; Abdelkader et al., 2019; Benchikh Elfegoun et al., 2019). *Hy. marginatum* est connue pour être un vecteur d'une grande variété d'agents pathogènes d'importance médicale et vétérinaire, y compris le virus de la fièvre hémorragique du Crimée-Congo (FHCC) (walker et al., 2014), le virus West Nile (Kaiser et al., 1974), *Rickettsia aeschlimannii* (Sentausa et al., 2014), *Babesia caballi* et *Theileria annulata* (walker et al., 2014 ; De Kok et al., 2013).

*Hy. detritum detritum* a un cycle diphasique qui dure un an, monotrope où tous les stades du développement se nourrissent de la même espèce hôte (Walker et al., 2003). Les bovins domestiques sont les hôtes les plus infestés par cette espèce, mais les chevaux, les petits ruminant et les camelins peuvent également être infestés (Walker et al., 2003). Cette espèce de tique est présente essentiellement dans le climat méditerranéen de l'Afrique du Nord (Walker et al., 2003). Elle est très adaptée aux différents climats, elle a été décrite dans plusieurs régions de l'Algérie, du désert jusqu'à l'extrême Nord du pays (Senevet, 1922 ; Senevet et Rossi, 1924 ; Yousfi-Monod et Aeschlimann, 1986 ; Boukhaboul, 2003 ; Meddour-Bouderda et Meddour, 2006; Benchikh Elfegoun et al., 2007 ; Bouhous et al., 2011; Amanzougaghene, 2014 ; Kouidri et al., 2018). Il s'agit d'un vecteur efficace de *Theileria Annulata*, agent de la théilériose bovine tropicale, *Theileria equi* aux chevaux et aux ânes, et *C. burnetii* aux ruminants domestiques et à l'homme (Sergent *et al.*, 1945 ; Samish et Pipono, 1978; Walker et al., 2014 ; Grech-Angelini et al., 2016).

*Hy. lusitanicum* est une espèce à cycle triphasique, ditrope, bien adaptée à la végétation mésoméditerranéenne et au climat méditerranéen et steppique (Estrada-Peña, 2004). Les stades immatures parasitent la faune sauvage (Santos-Silva et al., 2011) et les adultes sont principalement associés aux ongulés domestiques et sauvages (Valcárcel et al., 2015). C'est un important vecteur de *Theileria annulata* chez les bovins (Apanaskevich et al., 2008). Plusieurs autres agents pathogènes ont été détectés chez cette espèce (Toledo et al., 2009b, Milhano et al., 2010), y compris le virus de la fièvre hémorragique du Crimée-Congo (FHCC) (Estrada-Peña et al., 2012) et *C. burnetii* (walker et al., 2014). Comme constaté dans cette étude, la majorité des travaux menés en Algérie ont cité une faible fréquence de *Hy. Lusitanicum*. Citons l'exemple de Jijel (5.48 %) (Benchikh-Elfegoun et al., 2007), de

Constantine (3.9 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2019), de Oum El Bouaghi, de Skikda 10.9 % (Benchikh Elfegoun et al., 2018), d'el Taref (0.02 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2014) et de Mila (1.09 %)(Benchikh Elfegoun et al., 2014). En revanche, des taux importants ont été obtenus à Tiaret (20.02% et 15.42%) (Boulkaboul, 2003; Kouidri et al., 2018). Amanzougaghene. (2014) a montré une prédominance d'*Hy. lusitanicum* dans la région d'Alger (68.39 %).

*Rh. sanguineus s.l.* est une espèce de tique à trois hôtes monotrope associée principalement aux chiens (Vassiliades, 1964 ; Noda et al., 2016). Cependant, elle a été collectée sur des bovins, camelins, mouflons, sangliers et plus rarement sur les moutons et les chevaux (Grech-Angelini et al., 2016). Elle peut accidentellement piquer l'homme (Noda et al., 2016). En raison de la forte association avec les chiens domestiques, *Rh. sanguineus s. l.* est présente dans toutes les régions climatiques du bassin méditerranéen (Walker et al., 2003 ; Grech-Angelini et al., 2016). *Rh. Sanguineus s.l.* est responsable de la transmission de l'anaplasmose, de la babésiose et de l'ehrlichiose chez les chiens (Dantas-Torres, 2008). Elle est également un vecteur des rickettsies du SFG « spotted-fever group », y compris *rickettsia conorii* et *rickettsia massiliae*, agents de la fièvre boutonneuse méditerranéenne humaine (Matsumoto et al., 2005 ; Bessas et al., 2016 ; Grech-Angelini et al., 2016), ainsi que de *C. burnetii* (Oskam et al., 2017). Dans cette étude, nous avons enregistré un taux très faible de *Rh. sanguineus s.l.* chez les bovins (1.26 %), résultat comparable à celui observé à Tiaret (0.30 %) (Boulkaboul, 2003) et à Alger (3.11 %)(Amanzougaghene, 2014), bien qu'il soit plus bas que celui observé à Constantine (26.6 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2019). Ceci est probablement dû au faible contact des bovins prélevés avec des chiens infestés.

*Rh. annulatus* est une tique monophasique, monotrope, mésophile très hygrophile, et plus adaptée au climat humide et tempéré du bassin méditerranéenne (Benchikh Elfegoun et al., 2017 ; EFSA, 2010). Elle parasite principalement les bovins, et occasionnellement les ovins, les caprins et les ongulés sauvages (walker et al., 2003). Cette espèce est connue comme vecteur de plusieurs agents pathogènes, notamment *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* et *Anaplasma marginale* chez les bovins (Estrada-Peña et al., 2004). Une fréquence élevée de *Rh. annulatus* chez les bovins a été publiée dans les régions du littoral algérien à climat humide telles que la wilaya d'Annaba (62.3 %) (Dendani, 1987), Jijel (79.96 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2007), El Taref (77.08 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2014). En revanche, cette espèce est rarement collectée dans les régions à climat semi-aride ou sec comme décrit à Sétif dans cette étude (0.28 %), ou bien à Tiaret (1.13 %) (Boulkaboul, 2003), à Mila (1.78 %)



(Benchikh Elfegoun et al., 2014). Aucune espèce de *Rh. annulatus* n'a été identifiée à Constantine (Benchikh-Elfegoun et al., 2019). En effet, la présence de *Rh. annulatus* dans ces zones semi-arides ou arides est probablement attribuée à l'achat de bovins infestés à partir des zones humides.

*Hae. punctata* est une tique triphasique, polytrophe, présente dans tout le bassin méditerranéen dans une grande variété d'habitats, à condition d'atteindre un degré d'humidité élevé (walker et al., 2003 ; Estrada-Peña et al., 2004). Les ovins sont les hôtes préférés de cette espèce, cependant, elle a été collectée également sur des bovins, des caprins, des chevaux, des antilopes et peut s'attacher à l'homme (walker et al., 2003 ; Estrada-Peña et al., 2004). *Hae. punctata* transmet le protozoaire *Theileria buffeli/orientalis*, agent de la theilériose bovine bénigne et *Babesia major* chez les bovins (Sergent et al., 1945; Estrada-Peña et al., 2004), ainsi que *Theileria ovis* et *Babesia motasi* chez les ovins (Estrada-Peña et al., 2004 ; Grech-Angelini et al., 2016). Dans notre étude, seulement deux tiques de l'espèce de *Hae. punctata* ont été prélevées sur les bovins prélevés, soit une fréquence de 0.28 %. Un taux faible a été également décrit à Tiaret (1.18 %) (Boulkaboul, 2003), à Mila (4,71 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2014), à Constantine (5.7 %) (Benchikh Elfegoun et al., 2019). Cela est probablement lié au climat semi-aride et sec de ces régions qui ne semble pas favorable au développement de cette espèce thermophile et hygrophile (walker et al., 2003 ; Estrada-Peña et al., 2004 ; Faouzi et al., 2018).

### **5.3 Détermination des espèces de tiques porteuses de *Coxiella burnetii* et évaluation du taux d'infection**

Dans cette étude, nous avons amplifié les gènes IS1111 et SOD de *C. burnetii* par PCR pour mettre en évidence sa présence chez les tiques analysées. La méthode de PCR amplifiant la séquence IS1111 est très sensible en raison de la présence multiple de ce gène dans le génome de *C. burnetii* (Klee et al., 2006 ; Boarbi et al., 2016). Cependant, c'est devenu actuellement inadéquat pour rechercher la présence de *C. burnetii* chez les tiques. En effet, les copies IS1111 présentes chez les bactéries de type *Coxiella* endosymbiotique peuvent être de 100 % identiques à celles retrouvées chez *C. burnetii* (Vilcins et al., 2009 ; Duron, 2015a). Par conséquent, IS1111 n'est pas spécifique à *C. burnetii* et la PCR basée uniquement sur cette séquence peut conduire à un résultat faux positif (Duron, 2015a). En effet, les *Coxiella* endosymbiotiques sont étroitement apparentées mais génétiquement distinctes de *C. burnetii*, fréquentes chez les tiques, avec environ deux tiers des espèces de tiques sont infectées (Duron et al., 2015b; Machado-Ferreira et al., 2016 ; Lalar et al., 2014). Les *Coxiella*

endosymbiotiques présentent dans tous les stades de vie de ces tiques avec une prévalence de 100 %, se transmettent d'une génération à l'autre par voie transovarienne et se maintiennent chez les tiques de manière trans-stadiale, plutôt que d'être acquis lors de prise d'un repas sanguin sur de vertébrés infectés. La plupart de ces *Coxiella* endosymbiotiques semblent confinées aux tiques, c'est-à-dire incapables d'infecter un hôte vertébré et présentent un risque d'infection beaucoup plus faible pour les vertébrés par rapport à *C. burnetii* (Duron et al., 2015c). D'ailleurs, lors du séquençage de cette bactérie, aucun gène de virulence reconnaissable n'a été trouvé, ce qui corrobore le fait que ce microorganisme n'est pas un agent pathogène mais plutôt un symbiote mutualiste des tiques (Smith et al., 2015 ; Gottlieb et al., 2015 ; Guizzo et al., 2017).

Nous avons utilisé des pools de tiques pour l'extraction d'ADN, ce qui offre la possibilité de tester un grand nombre de tiques collectées (Nourollahi-Fard et Khalili, 2011) et de réduire l'effort et le coût des tests (Clements, 2012). L'analyse moléculaire a montré que 52 des 159 pools de tiques étaient positifs par PCR ciblant le gène IS1111 des coxielles (EMV : 8.41% ; IC 95% : 6.38%-10.79%) et 14 étaient positifs à la fois par PCR amplifiant le gène IS1111 et SOD de *C. burnetii* (EMV : 2.05% ; IC 95% : 1.16%-3.29%). Par ailleurs, aucun échantillon ne s'est avéré positif pour le gène SOD et négatif pour le gène IS1111, ce qui suggère une bonne sensibilité de la technique PCR basée sur l'amplification du gène SOD pour détecter *C. burnetii*. Parmi les 14 pools de tiques infectés dans cette étude, 7 appartenaient à l'espèce *Rh. bursa* (EMV : 2.71% ; IC 95% : 1.17%-5.18%), 4 à l'espèce *Hy. detritum detritum* (EMV:2.23% ; IC 95% : 0.7%-5.11%) et 3 à l'espèce *Hy. marginatum* (EMV: 1.46% ; IC 95% : 0.36%-3.74%). Ce résultat est en accord avec des études réalisées en Algérie qui confirment la présence de *C. burnetii* chez *Rh. bursa* infestant les petits ruminants à Souk Ahras (Aouadi et al., 2017) et les bovins à Sidi Bel Abbès (Abdelkadir et al., 2019). Cependant, à notre connaissance, c'est pour la première fois que *C. burnetii* est détectée chez les espèces *Hy. marginatum*, *Hy. detritum detritum* infestant les bovins en Algérie. En effet, plusieurs études menées à travers le monde ont déjà rapporté la présence de *C. burnetii* chez *Rh. bursa* (Babudieri, 1959; Tarasevich, 1957; Ioannou et al., 2011; Satta et al., 2011; Psaroulaki et al., 2014; Aouadi et al., 2017; Varela-Castro et al., 2018; Abdelkadir et al., 2019; Mancini et al., 2019), *Hy. marginatum* (Psaroulaki et al., 2006; Babudieri, 1959; Toma et al., 2014; Mancini et al., 2019) et *Hy. detritum detritum* (Babudieri, 1959 ; Balashov et Daiter, 1973). Ces résultats ne sont pas surprenants, car plus de 40 espèces de tiques sont naturellement infectées par *C. burnetii* dans le monde (Maurin et Raoult, 1999; EFSA, 2010).

L'analyse de la PCR a montré que les espèces de tiques *Hy. lusitanicum*, *Rh. sanguineus s.l.*, *Rh. annulatus* et *Hae. punctata* ne sont pas infectées par *C. burnetii*. Cela pourrait être lié à leur faible nombre dans la présente étude.

*C. burnetii* a été détectée chez les tiques de l'espèce *Rh. bursa* au stade adulte et au stade nymphal sans aucune différence significative, ce qui pourrait suggérer que *Rh. bursa* assure la transmission trans-stadiale de *C. burnetii* de la nymphe à l'adulte. Ce constat corrobore les études précédentes qui démontrent que la plupart des tiques dures transmettent *C. burnetii* par voie transstadiale (Balashov et Daiter, 1973; Eldin et al., 2017).

#### **5.4 Prévalence des troupeaux infestés par des tiques porteuses de *Coxiella burnetii***

Parmi les 228 troupeaux bovins inspectés, 52 étaient infestés par au moins une seule tique, soit un taux d'infestation de 22.80 % (CI 95% : 17.36%-28.25%) et seulement 4 sont infestés par des tiques porteuses de *C. burnetii*, soit un taux de 1.75 % (IC 95% : 0.05%-3.46%). Il s'est avéré que ce taux est trop faible par rapport à la séroprévalence du troupeau obtenu dans nos études sérologiques sur les échantillons de sérum bovins (45.56 %) ainsi que sur ceux du lait de mélange (37 %). Ce qui indique que la transmission de *C. burnetii* est principalement aérienne et que les tiques peuvent occasionnellement agir comme vecteurs dans les élevages bovins.

## **6 Conclusion**

Les résultats de cette étude donnent un aperçu sur la composition en espèces de tiques et la distribution des bovins infestés par cet ectoparasite, mais aussi, sur la présence de *C. burnetii* chez les tiques prélevées du bovin dans la région de Sétif. Il a été conclu que 22.80 % des élevages bovins étaient infestés par sept espèces de tiques avec une nette prédominance des espèces *Rh. bursa*, *Hy. Marginatum* et *Hy. detritum detritum*. Ce travail a également mis en évidence l'infection de ces trois espèces de tiques dominantes par *C. burnetii* avec une prévalence globale estimée par EMV égale à 2.05 %. Enfin, des études complémentaires devraient être envisagées pour évaluer l'effet des tiques infectées sur la santé publique et le rôle des tiques dans l'épidémiologie de la fièvre Q. Ainsi des programmes éducatifs de prévention et de lutte contre les tiques pourront être envisagés.

## Chapitre IV :

Étude de la diversité génotypique de *Coxiella burnetii* infectant les  
bovins de la région de Sétif

## **Chapitre IV : Étude de la diversité génotypique de *Coxiella burnetii* infectant les bovins de la région de Sétif**

### **1 Introduction**

La caractérisation génotypique des isolats de *Coxiella burnetii* peut améliorer la capacité d'identifier une source d'infection, aider à établir des mesures de prévention et de contrôle, réduire le nombre de cas lors d'une épidémie (Arricau-Bouvery et al., 2006), réduire l'utilisation malveillante de cette bactérie et aider à identifier et à suivre la lignée virulente (Mioni et al., 2020). Un certain nombre de méthodes de génotypage moléculaire ont été décrites pour analyser la diversité génétique de *C. burnetii*. Récemment, des méthodes basées sur la PCR ont été développées, y compris le typage Multiple-Locus Variable Analysis (MLVA) et Multispacer Sequence Typing (MST) (Glazunova et al., 2005 ; Arricau-Bouvery et al., 2006). Le génotypage MLVA est basé sur l'amplification d'un nombre variable de copies d'ADN répétées en tandem sur plusieurs locus dans le génome de *C. burnetii*. Alors que le génotypage MST est basé sur l'étude de la variation de séquences de 10 régions intergéniques (espaces) situées entre deux cadres de lecture ouverts (ORF) (Glazunova et al., 2005 ; Arricau-Bouvery et al., 2006). Les deux méthodes de génotypage sont connues pour être fiables, reproductibles et très discriminants, ne nécessitant pas de culture préalable de *C. burnetii* dans des conditions de biosécurité niveau 3 et peuvent être mises en œuvre directement sur l'ADN extrait des échantillons cliniques et environnementaux (Kumsa et al., 2015).

### **2 Objectifs de l'étude**

Comme il existe des preuves de la présence de la fièvre Q chez les animaux domestiques et l'homme en Algérie (Portier et al., 1948 ; Pierrou et al., 1956 ; Dumas, 1984 ; Benslimani et al., 2005 ; Lacheheb et Raoult, 2009 ; Dechicha et al., 2010 ; Rahal et al., 2011 ; Yahiaoui et al., 2013 ; Abdelhadi et al., 2015 ; Bessas et al., 2016 ; Khaled et al., 2016 ; Leulmi et al., 2016 ; Agag et al., 2017 ; Aouadi et al., 2017 ; Benaïssa et al., 2017 ; Derdour et al., 2017 ; ; Ghaoui et al., 2018 ; Rahal et al., 2018 ; Abdelkadir et al., 2019 ; Djellata et al., 2019 ; Bellabidi et al., 2020), la caractérisation génotypique des souches de *C. burnetii* circulantes dans notre pays est très nécessaire pour accroître la richesse des données d'épidémiologie moléculaire de la fièvre Q. Par conséquent, le but de cette étude était d'identifier les génotypes MST de *C. burnetii* présents chez les bovins de la région de Sétif et de les comparer avec ceux des autres régions et pays.

### **3 Matériel et méthodes :**

L'analyse de génotypage de l'ADN de *Coxiella burnetii* est réalisée au niveau du laboratoire de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo, Italie.

#### **3.1 PCR quantitative en temps réel**

Dans le but de quantifier l'ADN de *C. burnetii*, tous les échantillons qui ont donné des résultats positifs par PCR conventionnelle, soit 13 échantillons de sang total, 18 échantillons de lait de mélange et 14 pools de tiques dures ont été analysés par PCR quantitative en temps réel (qPCR), en utilisant le kit commercial VetMAX™ *C. burnetii* Absolute Quant Kit (LSI, Lissieu, France), précédemment appelé LSI Taq-Vet *C. burnetii*, selon les indications du fabricant (annexe 6). La PCR en temps réel, permettant de visualiser l'augmentation de la fluorescence en fonction de la quantité d'amplicons générés au cours de la réaction, nous offre un résultat d'analyse dans un laps de temps réduit par rapport à la PCR conventionnelle. De plus, elle présente une sensibilité et spécificité meilleures que celles de la PCR classique. Il s'agit d'un qPCR duplex qui comprend une amorce ciblant la région répétitive de *C. burnetii* de type transposon (IS1111) et une amorce qui détecte un gène codé par l'hôte (GAPDH) utilisé comme un contrôle d'amplification interne. Les analyses qPCR ont été effectuées à l'aide de l'instrument 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems®USA). Un échantillon était considéré positif si la valeur du cycle seuil (Ct) du gène cible était inférieure à 45 et que l'amplification du contrôle interne était nécessaire pour éliminer les faux négatifs causés par l'inhibiteur de la PCR.

#### **3.2 Génotypage par Multispacer Sequence Typing (MST)**

Tous les échantillons hautement positifs ayant une quantité suffisante d'ADN de *C. burnetii* avec une valeur de cycle seuil inférieure à 35 (Ct <35) ont été sélectionnés pour le génotypage par Multispacer Sequence Typing (MST). Dix espaceurs intergéniques sélectionnés du génome de *C. burnetii* (Cox2, 5, 18, 20, 22, 37, 51, 56, 57 et 61) ont été amplifiés et séquencés selon la description de Glazunova et ses collaborateurs (Glazunova et al., 2005), avec quelques modifications (Di Domenico et al., 2014). Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage des espaceurs du génome de *C. burnetii* sont repris dans le tableau suivant (tableau 16).

**Tableau 16** : Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR et le séquençage des espaceurs intergéniques du génome de *Coxiella burnetii* (Glazunova et.,2005 ; Di Domenico et al., 2014).

Nom des espaceurs intergéniques	ORF	séquence nucléotidique (5'-3')	Longueur du fragment amplifié (pb)
Cox2	Hypothetical protein	Cox20766 CAACCCTGAATACCCAAGGA	397
	Hypothetical protein	Cox21004 GAAGCTTCTGATAGGCGGGA	
Cox5	Sulfatase domain protein	Cox77554 CAGGAGCAAGCTTGAATGCG	395
	Entericidin, putative	Cox77808 TGGTATGACAACCCGTCATG	
Cox18	Ribonuclease H	Cox283060 CGCAGACGAATTAGCCAATC	557
	DNA polymerase III, epsilon subunit	Cox283490TTCGATGATCCGATGGCCTT	
Cox20	Hypothetical protein	Cox365301 GATATTTATCAGCGTCAAAGCAA	631
	Hypothetical protein	Cox365803 TCTATTATTGCAATGCAAGTGG	
Cox22	Hypothetical protein	Cox378718 GGGAATAAGAGAGTTAGCTCA	383
	Amino acid permease family protein	Cox378965 CGCAAATTTCCGGCACAGACC	
Cox37	Hypothetical protein	Cox657471 GGCTTGTCTGGTGTAAGTGT	463
	Hypothetical protein	Cox657794ATTCCGGGACCTTCGTTAAC	
Cox51	Replicative DNA helicase, intein-containing	Cox824598 TAACGCCCGAGAGCTCAGAA	674
	Conserved Hypothetical protein-uridine kinase	Cox825124 GCGAGAACCGAATTGCTATC	
Cox56	Ompa-like transmembrane domain protein	Cox886418 CCAAGCTCTCTGTGCCCAAT	479
	Conserved Hypothetical protein	Cox886484 ATGCGCCAGAAACGCATAGG	
Cox57	Rhodanese-like domain protein	Cox 892828 CCTGGACCGAG AGCACAAAC	617
	Hypothetical protein	Cox 893316 GGTGGAAGGCGTAAGCCTTT	
Cox61	Dioxygenase, putative	Cox 956825 GAAGATAGAGCGGCAAGGAT	611
	Hypothetical protein	Cox 957249 GGGATTTCAACTTCCGATAGA	

### 3.2.1 Préparation du mélange réactionnel

Cinq microlitres de l'ADN extrait (5 µL) ont été amplifiés dans un mélange réactionnel de 50 µL contenant 200 nM de chaque amorce, 200 µM de désoxynucléotide triphosphates (dNTPs, Promega), 2,5 mM de solution MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems), 0,03 U/µL AmpliTaqGold™ (Applied Biosystems), 1× PCR Buffer II (Applied Biosystems) et de l'eau UP (Di Domenico et al., 2014). A cet effet, le volume par µL de chaque réactif est illustré au tableau 17.

**Tableau 17** : Composition du mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs	Concentration Initiale	Concentration finale	Volume par réaction
Amorce sens (Forward)	20 µM	200 nM	0.5 µL
Amorce anti-sens (Reverse)	20 µM	200 nM	0.5 µL
dNTP	10 mM	200 µM	1 µL
Tag polymérase	5 U/ul	0.03 U/ul	0.3 µL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM	5 µL
Tampon II	10X	1X	5 µL
Eau UP	/	/	32.7 µL
ADN extrait	/	/	5 µL
<b>Total</b>	/	/	<b>50 µL</b>

À propos des espaceurs intergéniques Cox 56 et 57, nous avons mélangé 600 nM de chaque amorce soit un volume par réaction de 1.5 µL, et nous avons réduit le volume de l'eau UP (30.7 µL) pour obtenir un volume total de mélange réactionnel de 50 µL.

### 3.2.2 Protocole de la PCR

Chaque PCR a été réalisée grâce au thermocycleur automatique GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Les conditions d'amplifications comportent une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 10 min, suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation à 95°C pendant 30 s, une étape d'hybridation à 57°C durant 30 s (60°C durant 30 s pour Cox 57) et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s. Après les 40 cycles d'amplification, une étape d'élongation finale a été effectuée à 72°C pendant 7 min. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % colorés au SYBR Safe DNA, visualisés sous un transilluminateur ultra-violet et photographiés.



### 3.2.3 Séquençage

Les produits de PCR ont été également purifiés à l'aide du kit de purification PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Allemagne) de manière identique à celle décrite au chapitre I (page 54 à 58) et envoyés au service de séquençage à Eurofins Genomics srl, Milan, Italie. Les données de séquences brutes ont été assemblées en utilisant SeqScape v2.5 (Applied Biosystems). Les séquences obtenues ont été comparées aux allèles codés de la base de données de référence disponible sur le site [http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/MST\\_Coxiella/mst/group\\_detail](http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/MST_Coxiella/mst/group_detail).

## 4 Résultats

Tous les échantillons positifs par PCR classique, du sang total (n=13), du lait de mélange (n=18) et des pools de tiques (n=14) sont également positifs par qPCR spécifique à *C. burnetii*. Parmi ceux-ci, sept échantillons du sang total et quatre échantillons de lait de mélange sont fortement concentrés en ADN de *C. burnetii* dont les valeurs du cycle seuil (Ct) sont inférieures à 35 (tableau 18). Ces échantillons seront génotypés par MST. Cependant, seulement un échantillon de sang total et deux échantillons de lait de mélange avec des valeurs de cycle seuil (Ct) inférieures à 29 ont donné un profil complet de génotypage MST où tous les espaceurs intergéniques sont amplifiés (tableau 18). Concernant les autres échantillons, nous avons observé un résultat positif par PCR d'au moins trois espaceurs intergéniques (tableau 18).

Après analyse de séquençage, la combinaison des séquences des espaceurs intergéniques obtenues a révélé la présence de génotype MST12 dans les échantillons de lait de mélange et MST32 dans les échantillons de sang (tableau 18). Un nouveau génotype MST (profil partiel) est également identifié dans le sang de deux vaches appartenant à la même ferme (ferme 2) avec des codes allèles de 3-5-5-5-1-6-5 pour les espaceurs Cox2-Cox5-Cox18-Cox22-Cox37-Cox57-Cox61 respectivement (tableau 18).

**Tableau 18** : Résultats de la quantification par qPCR et du génotypage par MST de l'ADN de *Coxiella burnetii* chez les bovins de la région de Sétif.

Code d'identification	Code de la ferme	Type de prélèvement	Valeur CT	Espaceur intergénique										Génotype MST
				Cox 2	Cox 5	Cox 18	Cox 20	Cox 22	Cox 37	Cox 51	Cox 56	Cox 57	Cox 61	
B15	Ferme 1	Sang total	31.6	NA	NA	NA	NA	5	NA	NA	12	3	NA	Non identifié
B16	Ferme 1	Sang total	31.5	3	5	1	NA	5	NA	NA	12	3	NA	MST32
B20	Ferme 2	Sang total	30.8	3	5	5	NA	5	NA	NA	NA	NA	5	Nouveau
B23	Ferme 2	Sang total	30.2	3	5	5	NA	5	1	NA	NA	6	5	Nouveau
B31	Ferme 3	Sang total	32.3	NA	5	1	NA	5	4	NA	NA	3	NA	MST32
B32	Ferme 3	Sang total	32.2	NA	5	1	NA	5	4	NA	12	3	NA	MST32
B37	Ferme 4	Sang total	26	3	5	1	6	5	4	5	12	3	2	MST32
M 122	Ferme 5	Lait de mélange	32.7	3	NA	NA	NA	5	4	NA	NA	NA	NA	Non identifié
M 125	Ferme 6	Lait de mélange	34.9	3	NA	NA	NA	5	4	NA	NA	NA	NA	Non identifié
M 157	Ferme 7	Lait de mélange	28.2	3	5	1	6	5	4	5	4	3	2	MST12
M 159	Ferme 8	Lait de mélange	28.3	3	5	1	6	5	4	5	4	3	2	MST12

NA : non amplifié, 1, 2,3,4,5, 6, 12 : Les codes allèles attribués à chaque espaceur amplifié, Ct : cycle threshold.

## 5 Discussion

La caractérisation moléculaire est un outil indispensable pour les enquêtes épidémiologiques menées lors de l'apparition des foyers épidémiques ou lors de la surveillance (Tilburg et al., 2012). Dans le cas de la fièvre Q, deux méthodes discriminantes sont couramment utilisées pour le génotypage de *C. burnetii* : MST et MLVA (Glazunova et al., 2005 ; Arricau-Bouvery et al., 2006). Dans la présente étude, nous avons utilisé le génotypage MST pour déterminer le ou les génotypes de *C. burnetii* présents dans nos échantillons de sang et dans le lait de mélange. Cette méthode s'est avérée plus laborieuse et moins discriminante que la MLVA. Cependant, elle a l'avantage d'utiliser une nomenclature standardisée et de disposer d'une base de données qui permet une comparaison facile des résultats entre les laboratoires (Santos et al., 2012). La méthode MST a permis d'identifier 30 génotypes différents et trois groupes monophylétiques parmi 173 isolats de *C. burnetii*, en se basant sur la combinaison des différentes séquences de 10 espaceurs intergéniques (Glazunova et al., 2005 ; Eldin et al., 2017). Les groupes monophylétiques étaient partiellement corrélés avec les types de plasmides. Le premier groupe contenait des souches avec le plasmide QpDV ou QpRS, le second ne contenait que des souches avec le plasmide QpH1 et le troisième groupe contenait des souches sans plasmide ou des souches avec QpH1. Le génotypage MST a réussi à établir des corrélations fiables des génotypes MST avec la répartition géographique, les manifestations cliniques et l'épidémiologie des souches. Bien que certains génotypes MST se trouvent sur les cinq continents, de nombreux autres sont limités à des régions spécifiques. Par conséquent, il a été qualifié de «méthode de génotypage» (Eldin et al., 2017).

Le génotypage MST montre la présence du génotype MST12 dans les échantillons de lait bovin de tank et MST32 et un nouveau génotype MST dans les échantillons de sang total bovin. Cette corrélation entre la nature de l'échantillon et le génotype MST est probablement liée au faible nombre des échantillons hautement concentrés en ADN de *C. burnetii* qui ont réussi à la détermination de génotype par MST. Les génotypes MST12 et MST32 appartiennent au groupe monophylétique II et sont étroitement liés sur la base d'une analyse phylogénétique (Hornstra et al., 2011). Le génotype MST12 a été détecté dans des échantillons cliniques humains (valvule cardiaque, sang humain, abcès rétrosternal, anévrisme, prothèse valvulaire et abcès de la rate) en France, en Suisse et au Sénégal ([http://ifr48.timone.univmrs.fr/mst/coxiella\\_burnetii/strains.html](http://ifr48.timone.univmrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html)), alors que chez les animaux, il a été trouvé dans le fromage de brebis en Italie (Galiero et al., 2016), dans des échantillons de poumon, de rate, des écouvillons vaginaux et placentas prélevés chez les petits ruminants en Italie (Di Domenico et al., 2018). Cependant, à

notre connaissance, c'est pour la première fois que le génotype MST12 est identifié dans des échantillons bovins. Le génotype MST 32 a été précédemment détecté dans des échantillons humains (une valvule cardiaque en Allemagne et une biopsie aortique en France), de placenta de chèvre en Autriche ([http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella\\_burnetii/strains.html](http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html)), de fromage de brebis en Italie (Galiero et al., 2016), dans des échantillons de foie, du contenu gastrique, des cotylédons ovins en Grèce (Chochlakis et al., 2018), dans des échantillons de rate, de cerveau, des écouvillons vaginaux, de poumon, de foie prélevés chez les petits ruminants et de lait individuel des vaches laitières en Italie (Di Domenico et al., 2018). Ces résultats suggèrent que les bovins pourraient représenter une source de fièvre Q à Sétif. Les codes allèles identifiés dans ce nouveau génotype MST sont 3-5-5-5-1-6-5 pour les espaceurs Cox2-Cox5-Cox18-Cox22-Cox37-Cox57-Cox61 respectivement. Ce profil diffère considérablement de tous ceux des génotypes décrits précédemment. Malheureusement, l'amplification par PCR n'est pas réussie pour tous les espaceurs (profil partiel) à cause de la quantité faible de l'ADN de *C. burnetii* dans nos échantillons sanguins, ce qui n'a pas permis de décrire le profil complet de ce nouveau génotype MST et de le télécharger dans la base de données MST ([https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella\\_burnetii/strains.html](https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html)). À cet effet, des études ultérieures devraient être réalisées pour identifier complètement ce génotype et comprendre son pouvoir pathogène, infectieux et zoonotique.

Les génotypes MST12 et MST32 ont été décrits pour la première fois en Algérie. D'autres études mettent en évidence différents génotypes citons : MST20 dans les placentas de vaches laitières ayant avorté (Rahal et al., 2018) et le foie de bovins (Ghaoui et al., 2019), MST33 dans des échantillons de sang des ovins et des caprins ainsi que dans le placenta des brebis, MST21 dans des échantillons de sang des chats et des chiens (Ghaoui et al., 2019). La présence de ces différents génotypes peut s'expliquer par l'importation des animaux, notamment les bovins et caprins à partir de plusieurs pays (Pays-Bas, Allemagne, France, Espagne, Autriche...) ainsi que leurs mouvements dans les pays voisins (Tunisie, Niger, Mali...), d'autant plus que notre pays ne pratique pas de contrôle sanitaire rigoureux au niveau des frontières en termes d'analyse sérologique et moléculaire de l'infection par *C. burnetii*.

## **6 Conclusion**

La présente étude fournit des informations sur la diversité génotypique de *C. burnetii* infectant les bovins en Algérie. L'analyse de génotypage par MST des échantillons de sang et de lait prélevés chez les bovins de la wilaya de Sétif a montré pour la première fois la présence des génotypes MST12, MST32 et un nouveau génotype MST (profil partiel). Les génotypes MST12 et MST32 ont été décrits auparavant dans des échantillons cliniques humains, suggérant que les bovins peuvent jouer un rôle important en tant que réservoir pour l'infection humaine par la fièvre Q dans la wilaya de Sétif. Des analyses supplémentaires utilisant un échantillonnage représentatif, couvrant tout le territoire national, ciblant plusieurs types de matrice de diagnostic et prélevés à partir d'une large gamme d'espèces d'animaux et l'homme, sont nécessaires pour confirmer ces résultats. L'identification complète de ce nouveau génotype est très importante pour construire une base de données de référence des génotypes en Algérie et connaître la source d'infection en cas de l'apparition d'une épidémie.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale-recommandations et perspectives

À travers cette recherche, une enquête séroépidémiologique transversale sur l'infection par *Coxiella burnetii*, chez les vaches de la région de Sétif, nous a permis d'estimer une séroprévalence de 11.36 % au niveau individuel et de 45.56 % au niveau de l'exploitation. Cette étude nous a également renseigné sur les différents facteurs de risque qui peuvent favoriser la transmission de la coxiellose chez les bovins tels que l'introduction de nouvelles vaches et le contact direct avec d'autres troupeaux. L'utilisation de désinfectants a été identifiée comme facteur protecteur contre la coxiellose bovine. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier le ou les désinfectants spécifiques et efficaces qui réduisent la charge de *C. burnetii* dans les fermes infectées afin de renforcer les mesures de contrôle. En outre, la connaissance des facteurs de risque est essentielle afin d'établir un programme prophylactique approprié contre la coxiellose pour éviter les conséquences tant sur la santé animale à cause des troubles de la reproduction, que sur la santé publique et sur le plan économique en raison des frais liés aux traitements de vétérinaires ou ceux de remplacement des animaux.

L'étude épidémiologique de type cas-témoin indique une association significative entre le fait que la vache soit infectée par *C. burnetii* et le fait d'être infertile au courant de l'année précédente. Cette étude vient montrer l'implication de *C. burnetii* dans les troubles d'infertilité. D'où l'intérêt de comprendre la pathogénie de *C. burnetii* et son mode d'action sur l'infertilité.

L'analyse phylogénétique de nos échantillons a révélé une similarité de 100 % entre notre souche et la souche NL3262 de *C. burnetii* isolée à partir de placentas de chèvres ayant avorté, responsable de la plus grande épidémie de fièvre Q dans le monde. Cette épidémie avait touché les Pays-Bas entre 2007 et 2010 avec plus de 4000 cas humains rapportés. Ainsi, des mesures strictes de biosécurité dans nos élevages sont préconisées et un programme de sensibilisation des éleveurs pour le risque lié à cette maladie doit être élaboré pour éviter l'apparition des flambées épidémiques pareilles dans notre pays. Par ailleurs, cette étude nous a permis d'inciter les services de santé publique de prendre en considération le diagnostic de cette infection dans le cas de grippe aiguë, pneumonie, hépatite, endocardite, avortement, notamment, chez les habitants des zones rurales qui sont en contact avec les ruminants domestiques ou les professionnels à risque tels les vétérinaires et le personnel des abattoirs.

Une enquête épidémiologique transversale sur la coxiellose bovine basée sur l'analyse sérologique et moléculaire sur 200 échantillons de lait de tank a montré que 37 % et 9 % des élevages de vaches laitières sont positifs par ELISA et PCR respectivement. Par conséquent, le lait constitue une source possible de dissémination de *C. burnetii* dans l'environnement. La surveillance de la coxiellose dans les exploitations de vaches laitières en testant le lait de tank par la technique sérologique ELISA et la technique moléculaire PCR est très utile, à condition de les combiner et de les répéter à intervalle de temps régulier.

L'enquête épidémiologique sur la diversité des tiques bovines nous a permis d'enregistrer un taux d'infestation par les tiques dures de 8.25% au niveau individuel et de 22.80 % au niveau du troupeau. Ces taux sont relativement bas par rapport à d'autres études réalisées en Algérie et c'est fort probablement dû à l'utilisation fréquente des acaricides dans la région de Sétif ces dernières années. Cette étude a permis d'identifier 7 espèces de tiques appartenant à 4 genres ou sous genres différents sur un effectif total de 712 tiques prélevées chez les bovins. *Rh. bursa*, *Hy. marginatum* et *Hy. detritum detritum* sont les plus fréquemment collectées avec un taux respectif de 37.92 %, 29.91 % et 26.40 %. *Hy. lusitanicum*, *Rh. sanguineus s.l.*, *Rh. annulatus* et *Hae. punctata* ont été également identifiées avec un taux respectif de 3.93 %, 1.26 %, 0.28 % et 0.28 %. Ces tiques peuvent transmettre plusieurs agents pathogènes aux animaux et aux humains, notamment ceux de la theilériose, des piroplasmoses, de la fièvre Q, des rickettsioses, de l'anaplasmose. D'où l'intérêt de la mise en œuvre des mesures préventives pour réduire la population des tiques telle le nettoyage et la désinfection régulière des bâtiments, le comblement des fissures des murs et l'élaboration d'un calendrier efficace des acaricides.

Enfin, L'ADN de *C. burnetii* a été détecté chez *Rh. bursa* (EMV=2.71 %), *Hy. detritum detritum* (EMV=2.23 %) et *Hy. marginatum* (EMV=1.46 %), avec une prévalence globale estimée par EMV égale à 2.05 %. D'où l'importance de bien choisir les acaricides qui sont efficaces contre ces espèces de tiques précisément. Les tiques infectées ont concerné 4 troupeaux bovins parmi 228 inspectés donnant une fréquence de 1.75 %.

L'analyse de génotypage par la méthode MST a montré la présence du génotype MST12 et MST32 dans nos échantillons de lait de tank et de sang respectivement. Un nouveau génotype MST (profil partiel) est également identifié dans le sang de deux vaches appartenant à la même ferme qui diffère des génotypes déjà décrits dans la littérature et présents dans la base de données MST ([https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella\\_burnetii/strains.html](https://ifr48.timone.univ-mrs.fr/mst/coxiella_burnetii/strains.html)). Les génotypes MST12 et MST32 ont déjà été détectés dans des échantillons cliniques humains



montrant ainsi que les bovins puissent jouer un rôle en tant que réservoir pour l'infection humaine par *C. burnetii* dans la wilaya de Sétif. D'autres études devraient être menées sur la coxiellose bovine en Algérie en combinant les données épidémiologiques avec les résultats de génotypage pour mieux comprendre quels sont les génotypes présentes et impliqués dans les infections animales et humaines.

# **Références bibliographiques**

- Abdelhadi, F.Z., Abdelhadi, S.A., Niar, A., Benallou, B., Meliani, S., Smail, N.L., Mahmoud, D.** Abortions in Cattle on the Level of Tiaret Area ( Algeria ). *Global Veterinaria.*, 2015, 14 (5), 638–645.
- Abdelkadir, K., Palomar, A.M., Portillo, A., Oteo, J.A., Ait-Oudhia, K., Khelef, D.** Presence of *Rickettsia aeschlimannii*, ‘*Candidatus Rickettsia barbariae*’ and *Coxiella burnetii* in ticks from livestock in Northwestern Algeria. *Ticks and Tick-borne Diseases.*, 2019, 10(4), 924-928.
- Adamu, S.G., Kabir, J., Umoh, J.U., Raji, M.A.** Seroprevalence of brucellosis and Q fever (Coxiellosis) in cattle herds in Maigana and Birnin Gwari agro-ecological zone of Kaduna State, Nigeria. *Tropical Animal Health and Production.*, 2018, 50(7), 1583-1589.
- Agag, S., Kaidi, R., Khelef, D.** Séroprévalence de la fièvre Q chez les bovins de la région de Bejaïa (Algérie). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays Tropicaux.*, 2017, 69 (4), 155-159.
- Agerholm, J.S.** *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica.*, 2013, 55(1), 13.
- Agerholm, J. S.** *Coxiella burnetii* and reproductive disorders in cattle. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.*, 2014, 28(2014), 150–150.
- Agger, J.F., Paul, S., Christoffersen, A. B., Agerholm, J.S.** Risk factors for *Coxiella burnetii* antibodies in bulk tank milk from Danish dairy herds. *Acta veterinaria scandinavica.*, 2013, 55(1), 80.
- Altay Çapın, G., Emre, Z., Canpolat, S., Vatanserver, Y., Düzgün, A.** Detection of *Coxiella burnetii* from ticks by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.*, 2013, 60(1), 263–268.
- Alvarez, J., Perez, A., Mardones, F.O., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Pagés, E., Mirat, F., Díaz, R., Carpintero, J., Domínguez, L.** Epidemiological factors associated with the exposure of cattle to *Coxiella burnetii* in the Madrid region of Spain. *Veterinary Journal.*, 2012, 194, 102–107.
- Amanzougaghene, N.** Étude épidémiologique sur les infections et co-infections par *Babesia spp* et *Anaplasma spp* chez le bovin dans la région d’Alger - Identification des tiques Ixodina. *Mémoire de Magister. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger, Algérie.*, 2014, 136-140.
- Amara, A. Ben, Bechah, Y., Mege, J.-L.** Immune response and *Coxiella burnetii* invasion, in : *Coxiella Burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium. Advances in Experimental Medicine and Biology.*, 2012, 984, 287–298.
- Anastácio, S., Carolino, N., Sidi-Boumedine, K., Da Silva, G.J.** Q fever dairy herd status determination based on serological and molecular analysis of bulk tank milk. *Transboundary and emerging diseases.*, 2016, 63(2), e293-e300.
- Anderson, A., Bijlmer, H., Fournier, P.-E., Graves, S., Hartzell, J., Kersh, G.J., Limonard, G., Marrie, T.J., Massung, R.F., McQuiston, J.H., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., Sexton, D.J.** Diagnosis and management of Q fever—United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports.*, 2013, 62(3), 1-29.
- Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Hoffman, R. L.** A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 1990, 2(4), 283-287.
- Angelakis, E., Raoult, D.** Q fever. *Veterinary Microbiology.*, 2010, 140 (3-4), 297–309.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Socolovschi, C., Mouffok, N., Bassene, H., Tall, A., Niangaly, H., Doumbo,**

- O., Znazen, A., Sarih, M., Sokhna, C., Raoult, D.** *Coxiella burnetii*-positive PCR in febrile patients in rural and urban Africa. *International Journal of Infectious Diseases.*, 2014, 28, 107–110.
- Antunes, S., Couto, J., Ferrolho, J., Rodrigues, F., Nobre, J., Santos, A.S., Margarida Santos-Silva, M., de la Fuente, J., Domingos, A.** *Rhipicephalus bursa* sialotranscriptomic response to blood feeding and babesia ovis infection: Identification of candidate protective antigens. *Frontiers in cellular and infection microbiology.*, 2018, 8, 1–17.
- Aouadi, A., Leulmi, H., Boucheikhchoukh, M., Benakhla, A., Raoult, D., Parola, P.** Molecular evidence of tick-borne hemoprotozoan-parasites (*Theileria ovis* and *Babesia ovis*) and bacteria in ticks and blood from small ruminants in Northern Algeria. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.*, 2017, 50, 34-39.
- Apanaskevich, D.A., Santos-Silva, M. M., Horak, I.G.** The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H.(Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H.(E.) franchinii Tonelli Rondelli*, 1932 (Acari: Ixodidae) with a first description of its immature stages. *Folia parasitologica.*, 2008, 55(1), 61-74.
- Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Moutoussamy, A., Ladenise, K., Rodolakis, A.** Étude de l'excrétion de *Coxiella burnetii* dans un modèle expérimental caprin et décontamination des lisiers par la cyanamide calcique. *Rencontres Recherche Ruminants.*, 2001, 8, 153–156.
- Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A.** Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Veterinary Research.*, 2005, 36 (3), 327–349.
- Arricau-Bouvery, N., Hauck, Y., Bejaoui, A., Frangoulidis, D., Bodier, C.C., Souriau, A., Meyer, H., Neubauer, H., Rodolakis, A., Vergnaud, G.** Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. *BMC Microbiology.*, 2006, 6(1), 1–14.
- Asadi, J., Kafi, M., Khalili, M.** Seroprevalence of Q fever in sheep and goat flocks with a history of abortion in Iran between 2011 and 2012. *Veterinaria Italiana.*, 2013, 49(2), 163-168.
- Asmaa, N.M., ElBably, M.A., Shokier, K.A.** Studies on prevalence, risk indicators and control options for tick infestation in ruminants. *Beni-suef university journal of basic and applied sciences.*, 2014, 3(1), 68-73
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Francisco, R.F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R.A., García-Pérez, A.L.** 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.*, 2011, 77(20), 7405-7407.
- Astobiza, I., Barandika, J. F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R. A., & García-Pérez, A. L.** *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Research in veterinary science.*, 2011, 91(3), e58-e63.
- Astobiza, I., Tilburg, J.J.H.C., Piñero, A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.W.** Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants in northern Spain. *BMC Veterinary Research.*, 2012a, 8(1), 241.
- Astobiza, I., Ruiz-Fons, F., Pinero, A., Barandika, J.F., Hurtado, A., Garcia-Perez, A.L.,** Estimation of *Coxiella burnetii* prevalence in dairy cattle in intensive systems by serological and molecular analyses of bulk-tank milk samples. *Journal of dairy science.*, 2012b, 95(4), 1632-1638.
- Astobiza, I., Barandika, J.F., Juste, R.A., Hurtado, A., García-Pérez, A.L.** Evaluation of the efficacy of

oxytetracycline treatment followed by vaccination against Q fever in a highly infected sheep flock. The Veterinary Journal.,2013, 196(1), 81–85.

**Babudieri, B.** Q fever: a zoonosis. Advance Veterinary Science., 1959, 5, 81–154.

**Balashov, Y.S., Daiter, A.B.** Bloodsucking arthropods and rickettsiae. Sci Leningr., 1973, 251.

**Banazis, M.J., Bestall, A.S., Reid, S.A., Fenwick, S.G.** A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*. Veterinary Microbiology., 2010, 143(2-4), 337-345.

**Barandika, J.F., Alvarez-Alonso, R., Jado, I., Hurtado, A., García-Pérez, A.L.** Viable *Coxiella burnetii* in hard cheeses made with unpasteurized milk. International Journal of Food Microbiology.,2019, 303,42–45.

**Barlozzari, G., Sala, M., Iacoponi, F., Volpi, C., Polinori, N., Rombolà, P., Vairo, F., Macri, G., Scarpulla, M.** Cross-sectional serosurvey of *Coxiella burnetii* in healthy cattle and sheep from extensive grazing system in central Italy. Epidemiology and Infection., 2020, 148, e9, 1-8.

**Beare, P.A., Samuel, J.E., Howe, D., Virtaneva, K., Porcella, S.F., Heinzen, R.A.** Genetic diversity of the Q fever agent, *Coxiella burnetii*, assessed by microarray-based whole-genome comparisons. Journal of bacteriology., 2006, 188(7), 2309-2324.

**Beare, P.A., Unsworth, N., Andoh, M., Voth, D.E., Omsland, A., Gilk, S.D., Williams, K.P., Sobral, B.W., Kupko, J.J., Porcella, S.F., Samuel, J.E., Heinzen, R.A.** Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. Infection and immunity., 2009, 77(2), 642-656.

**Behymer, D. E., Biberstein, E. L., Riemann, H. P., Franti, C. E., Sawyer, M.,Ruppanner, R., Crenshaw, G. L.** Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle: challenge of immunity after vaccination. American journal of veterinary research., 1976, 37(6), 631-634.

**Bellabidi, M., Benaissa, M.H., Bissati-Bouafia, S., Harrat, Z., Brahmi, K. and Kernif, T.** *Coxiella burnetii* in camels (*Camelus dromedarius*) from Algeria: seroprevalence, molecular characterization, and ticks (Acari: Ixodidae) vectors. Acta Tropica., 2020, 105443.

**Benaissa, M.H., Ansel, S., Mohamed-Cherif, A., Benfodil, K., Khelef, D., Youngs, C.R., Kaidi, R., Ait-Oudhia, K.** Seroprevalence and risk factors for *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) population in Algeria. Onderstepoort Journal of Veterinary Research.,2017, 84(1), 1-7.

**Benchikh-Elfegoun, M. C., Benakhla, A., Bentounsi, B., Bouattour, A., Piarroux, R.** Identification et cinétique saisonnière des tiques parasites des bovins dans la région de Taher (Jijel) Algérie. Annales de Médecine Vétérinaire.,2007, 151, 209-214.

**Benchikh Elfegoun, M.C., Gharbi, M., Djebir, S., Kohil, K.** Dynamique d'activité saisonnière des tiques ixodidés parasites des bovins dans deux étages bioclimatiques du nord-est algérien. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux.,2014, 66(4), 117-122

**Benchikh Elfegoun, M.C., Gharbi, M., Merzekani, Z., Kohil, K., 2018.** Piropasmoses bovines dans les provinces de Skikda et d'Oum El Bouaghi (nord-est de l'Algérie) : étude épidémiologique et estimation des pertes de production laitière. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux., 2018, 70(3), 105-110.

**Benchikh Elfegoun, M.C., Kohil, K., Gharbi, M., Afoutni, L., Benachour, M.L.** Cinétique d'infestation par les tiques des bovins de la région subhumide de Constantine en Algérie. Revue d'élevage et de médecine

vétérinaire des pays tropicaux.,2019, 72(1), 41-45.

**Benichou j.** methods of ajustment for estimating the attrubiable risk in case-control studies: a review. Statics in médecine. 1991, 10, 1753-1773.

**Benslimani, A., Fenollar, F., Lepidi, H., Raoult, D.** Bacterial zoonoses and infective endocarditis, Algeria. Emerging infectious diseases.,2005, 11(2), 216–224.

**Berri, M., Laroucau, K., Rodolakis, A.** The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology., 2000. 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. Veterinary Record.,2001, 148(16), 502–505.

**Berri, M., Souriau, A., Crosby, M., Rodolakis, A.** Shedding of *Coxiella burnetii* in ewes in two pregnancies following an episode of *Coxiella* abortion in a sheep flock. Veterinary Microbiology.,2002, 85(1), 55-60

**Berri, M., Rekiki, A., Boumedine, K.S., Rodolakis, A.** Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant’s clinical samples using multiplex PCR. BMC Microbiology., 2009, 9(1), 130.

**Bessas, A., Leulmi, H., Bitam, I., Zaidi, S., Ait-Oudhia, K., Raoult, D., Parola, P.** Molecular evidence of vector-borne pathogens in dogs and cats and their ectoparasites in Algiers, Algeria. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases., 2016, 45, 23-28.

**Bielawska-Drózd, A., Cieřlik, P., Mirski, T., Bartoszcze, M., Knap, J.P., Gawel, J., Zakowska, D.** Q fever - Selected issues. Annals of Agricultural and Environmental Medicine., 2013, 20(2), 222–232.

**Biggerstaff, B.J.** PooledInfRate, Version 4.0: a Microsoft® Office Excel© Add-In to compute prevalence estimates from pooled samples. Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, CO, USA., 2009.

**Bildfell, R.J., Thomson, G.W., Haines, D.M., McEwen, B.J., Smart, N.** *Coxiella burnetii* infection is associated with placentitis in cases of bovine abortion. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation., 2000, 12(5), 419–425.

**Biswas, S., Bandyopadhyay, S., Dimri, U., H. Patra, P.** Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: A revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. Veterinary Quarterly., 2013, 33(2), 68–81.

**Bitam, I., Parola, P., Matsumoto, K., Rolain, J. M., Baziz, B., Boubidi, S. C., Harrat, Z., Belkaid, M., Raoult, D.** First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. Annals of the New York Academy of Sciences., 2006, 1078(1), 368-372.

**Blain, S.** Q fever control in dairy goats. Point Vétérinaire., 2006, 37(266), 36-40.

**Boarbi, S., Mori, M., Rousset, E., Sidi-Boumedine, K., Van Esbroeck, M., Fretin, D.** Prevalence and molecular typing of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk in Belgian dairy goats, 2009-2013. Veterinary Microbiology., 2014, 170(1-2), 117–124.

**Boarbi, S., Fretin, D., Mori, M.** *Coxiella burnetii* , agent de la fièvre Q. Canadian journal of microbiology., 2016, 62(2), 102-122.

**Bolaños-Rivero, M., Carranza-Rodríguez, C., Rodríguez, N.F., Gutiérrez, C., Pérez-Arellano, J. L.** Detection of *Coxiella burnetii* DNA in Peridomestic and Wild Animals and Ticks in an Endemic Region (Canary

- Islands, Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(9), 630-634.
- Borji, S., Jamshidi, A., Khanzadi, S., Razmyar, J.** Detection of *Coxiella burnetii* and sequencing the IS1111 gene fragment in bulk tank milk of dairy herds. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*., 2015, 6(2), 21-28.
- Boroduske, A., Trofimova, J., Kibilds, J., Papule, U., Sergejeva, M., Rodze, I., Grantina-Ievina, L.** *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in dairy cattle and associated risk factors in Latvia. *Epidemiology & Infection*., 2017, 145(10), 2011-2019.
- Böttcher, J., Vossen, A., Janowetz, B., Alex, M., Gangl, A., Randt, A., Meier, N.** Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd. *Veterinary Microbiology*., 2011, 151(3-4) , 291–300.
- Bouhous, A., Aissi, M., Harhoura, K.** Prevalence of Ixodidae in sheep brought for slaughter in Adrar municipal abattoir, Southwest Algeria. *Scientia Parasitologica*., 2011, 12(4), 197–201.
- Boukaboul, A.** Parasitisme des tiques (Ixodidae) des bovins à Tiaret, Algérie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*., 2003, 56(3-4), 157-162.
- Boulos, A., Rolain, J.M., Maurin, M., Raoult, D.** Measurement of the antibiotic susceptibility of *Coxiella burnetii* using real time PCR. *International Journal of Antimicrobial Agents*., 2004, 23(2), 169–174.
- Bourdeau P.** les tiques d'importance vétérinaire et médicale. 2eme Partie. Principales espèces de tiques dures (ixodidae et Amblyommidae). *Point Vétérinaire*., 1993, 25, 27-41.
- Bouvery, N.A., Souriau, A., Lechopier, P., Rodolakis, A.** Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: excretion routes. *Veterinary Research*., 2003, 34(4), 423–433.
- Brennan, R.E., Samuel, J.E.** Evaluation of *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real-time PCR assay. *Journal of clinical microbiology*., 2003, 41(5), 1869-1874.
- Brooke, R.J., Kretzschmar, M.E.E., Mutters, N.T., Teunis, P.F.** Human dose response relation for airborne exposure to *Coxiella burnetii*. *BMC infectious disease*., 2013.13(1), 488.
- Burnet, F.M., Freeman, M.** Experimental Studies on the Virus of" Q" Fever. *Medical Journal of Australia*., 1937, 2, 299-305.
- Cabassi, C.S., Taddei, S., Donofrio, G., Ghidini, F., Piancastelli, C., Flammini, C.F., Cavirani, S.** Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy. *New Microbiologica*., 2006, 29, 211–214.
- Cantas, H., Muwonge, A., Sareyyupoglu, B., Yardimci, H., Skjerve, E.** Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Veterinary Research*., 2011, 7(1), 13.
- Capo, C., Lindberg, F.P., Meconi, S., Zaffran, Y., Tardei, G., Brown, E.J., Raoult, D., Mege, J.L.** Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between alphavbeta3 integrin and CR3. *Journal of Immunology*., 1999, 163(11), 6078–6085.
- Capo, C., Mege, J.** Role of innate and adaptive immunity in the control of Q fever. In *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium*. Springer, Dordrecht., 2012, 984, 273-286.
- Capuano, F., Landolfi, M.C., Monetti, D.M.** Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. *Veterinary Record*., 2001, 149(22), 669– 671.

- Carbonero, A., Guzmán, L.T., Montaña, K., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Saa, L.R.** *Coxiella burnetii* seroprevalence and associated risk factors in dairy and mixed cattle farms from Ecuador . Preventive Veterinary Medicine., 2015, 118(4), 427–435.
- Castellà, J., Estrada-Peña, A., Almería, S., Ferrer, D., Gutiérrez, J., Ortuño, A.** A survey of ticks (Acari: Ixodidae) on dairy cattle on the island of Menorca in Spain. Experimental and applied acarology., 2001, 25(10-11), 899-908.
- Ceylan, E., Berktas, M., Keles, I., Agaoglu, Z.** Seroprevalence of Q Fever in Cattle and Sheep in the East of Turkey. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances (AJAVA)., 2009, 4(3), 114–121.
- Chochlakis, D., Santos, A.S., Giadinis, N.D., Papadopoulos, D., Boubaris, L., Kalaitzakis, E., Psaroulaki, A., Kritas, S.K., Petridou, E.I.** Genotyping of *Coxiella burnetii* in sheep and goat abortion samples. BMC Microbiol., 2018, 18 (1), 1–9.
- Clemente, L., Barahona, M.J., Andrade M.F., Botelho, A.** Diagnosis by PCR of *Coxiella burnetii* in aborted fetuses of domestic ruminants in Portugal. Veterinary Record., 2009, 164, 373–374.
- Clements, A. N.** The biology of mosquitoes. Transmission of viruses and interactions with bacteria, volume 3. Cabi publishing Wallingford, England., 2012.
- Coche, B.** La fièvre Q. bovine en France. Aspects pratiques et importance de la sérologie. Le Point vétérinaire: revue d'enseignement post-universitaire et de formation permanente., 1981, 12(56), 95-100.
- Cohen, J.** A coefficient of agreement for nominal scales. Educational and psychological measurement., 1960, 20(1), 37-46.
- Cooper, A., Layton, R., Owens, L., Ketheesan, N., Govan, B.** Evidence for the classification of a crayfish pathogen as a member of the genus *Coxiella*. Letters in applied microbiology., 2007, 45(5), 558-563.
- Cooper, A., Hedlefs, R., McGowan, M., Ketheesan, N., Govan, B.** Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in beef cattle in Queensland. Australian Veterinary Journal., 2011, 89(7), 260-264.
- Cox, H.R., Beli, E.J.** The cultivation of *Rickettsia diaporica* in tissue culture and in the tissues of developing chick embryos. Public Health Reports., 1939, (1896-1970), 2171-2178.
- Cox, H.R., Tesar, W.C., Irons, J.V.** Q Fever in the United States: IV. Isolation and Identification of *Rickettsias* in an Outbreak Among Stock Handlers and Slaughterhouse Workers. Journal of the American Medical Association., 1947, 133(12), 820-821.
- Czaplicki, G., Houtain, J.Y., Mullender, C., Porter, S.R., Humblet, M.F., Manteca, C., Saegerman, C.** Apparent prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* (Q fever) in bulk tank milk from dairy herds in southern Belgium. The Veterinary Journal., 2012, 192(3), 529-531.
- Dabaja, M.F., Greco, G., Villari, S., Vesco, G., Bayan, A., Bazzal, B. El, Ibrahim, E., Gargano, V., Sciacca, C., Lelli, R., Ezzedine, M., Mortada, H., Tempesta, M., Mortada, M.** Occurrence and risk factors of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in Lebanon. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases., 2019, 64, 109–116.
- Dantas-Torres, F.** The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. Veterinary Parasitology., 2008, 152, 173-185.
- Dahmani, M., Davoust, B., Rousseau, F., Raoult, D., Fenollar, F., Mediannikov, O.** Natural anaplasmatose infection in *Rhipicephalus bursa* ticks collected from sheep in the French Basque Country. Ticks and tick-borne diseases., 2016, 8(1), 18-24.



- Davis, G.E., Cox, H.R., Parker, R.R., Dyer, R.E.** a filter-passing infectious agent isolated from ticks. Public Health Reports., 1938, 53(52), 2259-2311.
- De Biase, D., Costagliola, A., Del Piero, F., Di Palo, R., Coronati, D., Galiero, G., Uberti, B.D., Lucibelli, M.G., Fabbiano, A., Davoust, B., Raoult, D., Paciello, O.** *Coxiella burnetii* in Infertile Dairy Cattle With Chronic Endometritis. Veterinary pathology., 2018, 55 (4), 539–542.
- de Bruin, A., van der Plaats, R.Q.J., de Heer, L., Paauwe, R., Schimmer, B., Vellema, P., van Rotterdam, B.J., van Duynhoven, Y.T.H.P.** Detection of *Coxiella burnetii* DNA on Small-Ruminant Farms during a Q Fever Outbreak in the Netherlands. Applied and Environmental Microbiology., 2012, 78(6), 1652–1657.
- de Cremoux, R., Rousset, E., Touratier, A., Audusseau, G., Nicollet, P., le Ribaud, D., David, V., Le Pape, M.** Assessment of vaccination by a phase I *Coxiella burnetii*-inactivated vaccine in goat herds in clinical Q fever situation. FEMS Immunology and Medical Microbiology., 2012, 64(1), 104–106.
- De Kok, J. B., d'Oliveira, C., Jongejan, F.** Detection of the protozoan parasite *Theileria annulata* in *Hyalomma* ticks by the polymerase chain reaction. Experimental and applied acarology., 1993, 17(11), 839-846.
- de Ruiz, H. L. D.** Q fever in Colombia, SA A serological survey of human and bovine populations. Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B., 1977, 24(4), 287-292.
- Debin, M.** La Fièvre Q En Guyane Francaise actualités et Recherche d'un réservoir animal. Thèse Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France., 2007, 48.
- Dechicha, A., Gharbi, S., Kebbal, S., Chatagnon, G., Tainturier, D., Ouzrout, R., Guetarni, D.** Serological survey of etiological agents associated with abortion in two Algerian dairy cattle breeding farms. journal of veterinary medicine and animal health. 2010., 2(1), 001-005.
- Dendani N.** Etude des piroplasmoses bovines (sensu lato) et leurs vecteurs dans la région d'Annaba. Thèse Docteur Vétérinaire. Institut vétérinaire de Constantine, Algérie., 1987, 78.
- Denison, A.M., Thompson, H.A., Massung, R.F.** IS1111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: Characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates. BMC microbiology., 2007. 7(1), 91.
- Derdour, S.Y., Hafsi, F., Azzag, N., Tennah, S., Laamari, A., China, B., Ghalmi, F.** Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. Journal of Veterinary Research., 2017, 61(3), 337-343.
- Derrick, E.H.** “ Q” Fever, a New Fever Entity: Clinical Features, Diagnosis and Laboratory Investigation. Medical Journal of Australia., 1937. 2, 281-299.
- Derrick, E.H.** A Mystery Fever Invades Brisbane. Historical records of Australian science. , 1971, 2, 39–51.
- Derrick, E.H.** “ Q” fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. Reviews of infectious diseases., 1983, 5(4), 790–800.
- Desnues, B., Imbert, G., Raoult, D., Mege, J.-L., Ghigo, E.** Role of specific antibodies in *Coxiella burnetii* infection of macrophages. Clinical Microbiology and Infection., 2009, 15(2), 161-162.
- Djellata, N., Yahimi, A., Hanzen, C., Saegerman, C. Kaidi, R.** Prévalences, facteurs associés à un risque augmenté ou diminué d'exposition à *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* et *Toxoplasma gondii* chez la vache laitière ayant avorté en Algérie. Revue Scientifique et Technique. Office International des Epizooties., 2019
- Di Todaro N, Piazza C, Otranto D, Giangaspero A.** Ticks infesting domestic animals in Italy: current acarological studies carried out in Sardinia and Basilicata regions. Parassitologia., 1999, 41(1), 39-40.
- Dohoo, I.R., Ducroc, C., Fourichon, C., Donald, A., Hurnik, D.** An overview of techniques for dealing with

- large numbers of independent variables in epidemiologic studies. Preventive Veterinary Medicine., 1996, 29(3), 221–239.
- Di Domenico, M., Curini, V., De Massis, F., Di Provvido, A., Scacchia, M., Camma, C.** *Coxiella burnetii* in Central Italy: novel genotypes are circulating in cattle and goats. Vector-Borne and Zoonotic Diseases., 2014, 14(10), 710-715.
- Di Domenico, M., Curini, V., Di Lollo, V., Massimini, M., Di Gialleonardo, L., Franco, A., Caprioli, A., Battisti, A., Cammà, C.** Genetic diversity of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants in central Italy. BMC veterinary research., 2018, 14(1), 14, 8–14.
- Dorko, E., Pilipčinec, E., Rimárová, K., & Kostovcikova, J.** Serological study of Q fever in sheep in the territory of Eastern Slovakia. Annals of Agricultural and Environmental Medicine., 2010, 17(2), 323-325.
- Dorko, E., Rimárová, K., Pilipčinec, E.** Influence of the environment and occupational exposure on the occurrence of Q fever. Central European journal of public health., 2012, 20 (3), 208–214.
- Dos Santos, J. P., Lima-Ribeiro, A. M. C., Oliveira, P. R., dos Santos, M. P., Júnior, Á. F., Medeiros, A. A., & Tavares, T.C.F.** Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in goats in Uberlândia , Minas Gerais , Brazil. Tropical Animal Health and Production., 2012, 44,101–106.
- Dumas, N.** Rickettsioses et chlamydioses au Hoggar (République Algérienne): sondage épidémiologique. Bulletin de la Société de pathologie exotique., 1984, 77(3), 278-283.
- Duron, O.** The IS1111 insertion sequence used for detection of *Coxiella burnetii* is widespread in *Coxiella*-like endosymbionts of ticks. FEMS Microbiology Letters. 2015a., 362(17), fnv132.
- Duron O., Noël V., McCoy K.D., Bonazzi M., Sidi-Boumedine K., Morel O., Vavre F., Zenner L., Jourdain E., Durand P., Arnathau C., Renaud F., Trape J.F., Biguezoton A.S., Cremaschi J., Dietrich M., Léger E., Appelgren A., Dupraz M., Gómez-Díaz E., Diatta G., Dayo G.K., Adakal H., Zoungrana S., Vial L., Chevillon C.** The recent evolution of a maternally-inherited endosymbiont of ticks led to the emergence of the Q fever pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS pathogens., 2015b, 11(5), e1004892.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S., Jourdain, E.** The importance of ticks in Q fever transmission: what has (and has not) been demonstrated?. Trends in parasitology., 2015c, 31(11), 536-552.
- Edingloh, M., Merck, C.C., Manz, E.** Multiplex PCR for the diagnostic detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk. Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift., 1999, 112(1), 5-9.
- EFSA, Panel on Animal Health and Welfare (AHAW).** Scientific Opinion on Q fever., EFSA Journal, 2010, 8, 1–114. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1595>. (consulté le 15 septembre 2018).
- Elandalousi, R.B., Ghram, A., Maaroufi, A., Mnif, W.** Séroprévalence des maladies abortives zoonotiques chez les ruminants au nord de la Tunisie. Research fr., 2015, 2, 1419.
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M.** From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change. Clinical microbiology reviews., 2017, 30(1), 115-190.
- Emery, M.P., Ostlund, E.N., Ait Ichou, M., Ballin, J.D., McFarling, D., McGonigle, L.** *Coxiella burnetii* serology assays in goat abortion storm. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation., 2014, 26(1), 141-145.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R.** Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. Zaragoza: University of Zaragoza, 2004, 131.

- Estrada-Peña, A., Palomar, A. M., Santibanez, P., Sanchez, N., Habela, M. A., Portillo, A., Romero, I., Oteo, J. A.** Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in ticks, Southwestern Europe, 2010. *Emerging infectious diseases.*, 2012, 18(1), 179.
- Ezatkah, M., Alimolaei, M., Khalili, M., Sharifi, H.** Seroepidemiological study of Q fever in small ruminants from Southeast Iran. *Journal of infection and public health.*, 2015, 8(2), 170-176.
- Faouzi, M.1, Ahmed, B., Saida, M.** Inventory of ticks on dogs in rural areas of the northeast of Algeria and its relationship with influences some ecological and climatic parameters. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences.*, 2018, 32(2), (175-182).
- Ferrolho, J., Antunes, S., Santos, A. S., Velez, R., Padre, L., Cabezas-Cruz, A., Santos-Silva, M.M., Domingos, A.** Detection and phylogenetic characterization of *Theileria spp.* and *Anaplasma marginale* in *Rhipicephalus bursa* in Portugal. *Ticks and tick-borne diseases.*, 2016, 7(3), 443-448.
- Fèvre, E.M., Bronsvoort, B.M.D.C., Hamilton, K.A., Cleaveland, S.** Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends in microbiology.*, 2006, 14(3), 125-131.
- Fournier, P.E., Marrie, T.J., Raoult, D.** Diagnosis of Q fever. *Journal of clinical microbiology.*, 1998, 36(7), 1823-1834.
- Fournier, P.-E., Etienne, J., Harle, J.-R., Habib, G., Raoult, D.** Myocarditis, a rare but severe manifestation of Q fever: report of 8 cases and review of the literature. *Clinical infectious diseases.*, 2001, 32(10), 1440-1447.
- Fournier, P.-E., Raoult, D.** Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *Journal of Clinical Microbiology.*, 2003, 41(11), 5094-5098.
- Freick, M., Enbergs, H., Walraph, J., Diller, R., Weber, J., Konrath, A.** *Coxiella burnetii*: Serological reactions and bacterial shedding in primiparous dairy cows in an endemically infected herd—impact on milk yield and fertility. *Reproduction in Domestic Animals.*, 2017, 52(1), 160–169.
- Galiero, A., Fratini, F., Cammà, C., Di Domenico, M., Curini, V., Baronti, I., Turchi, B., Cerri, D.** Occurrence of *Coxiella burnetii* in goat and ewe unpasteurized cheeses: Screening and genotyping. *International journal of food microbiology.*, 2016, 237, 47–54.
- Garcia-Vazquez Z., Rosario-Cruz R., Ramos-Aragon A., Cruz-Vazquez C., MapesSanchez G.** Neospora caninum seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology.*, 2005, 134, 61–65.
- Garcia-Ispuerto, I., López-Helguera, I., Tutusaus, J., Serrano, B., Monleón, E., Badiola, J. J., López-Gatius, F.** *Coxiella burnetii* Shedding During the Peripartum Period and Subsequent Fertility in Dairy Cattle. *Reproduction in domestic animals.*, 2013, 48(3), 441-446.
- Garcia-Ispuerto, I., Tutusaus, J., López-Gatius, F.** Does *Coxiella burnetii* affect reproduction in cattle? A clinical update. *Reproduction in Domestic Animals.*, 2014, 49(4), 529–535.
- Garcia-Ispuerto, I., López-Helguera, I., Tutusaus, J., Mur-Novales, R., López-Gatius, F.** Effects of long-term vaccination against *Coxiella burnetii* on the fertility of high-producing dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica.*, 2015, 63, 223–233.
- Gardon, J., Héraud, J., Laventure, S., Ladam, A., Capot, P., Fouquet, E., Favre, J., Weber, S., Hommel, D., Hulin, A., Couratte, Y., Talarmin, A.** Suburban Transmission of Q Fever in French Guiana: Evidence of a Wild Reservoir. *The Journal of infectious diseases.*, 2002, 184(3), 278-284.
- Ghashghaei, O., Nourollahi-Fard, S.R., Khalili, M., Sharifi, H.** A survey of ixodid ticks feeding on cattle and

molecular detection of *Coxiella burnetii* from ticks in Southeast Iran. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences., 2017, 41(1), 46-50.

**Ghaoui, H., Bitam, I., Ait-Oudhia, K., Achour, N., Saad-Djaballah, A., Saadnia, F.Z., Kedjour, S., Fournier, P.E., Raoult, D.** *Coxiella burnetii* infection with women's febrile spontaneous abortion reported in Algiers. New Microbes New Infection., 2018, 26, 8–14.

**Ghaoui, H.** Contribution à l'étude des souches de *Coxiella burnetii* isolées chez l'homme et différentes espèces animales en Algérie. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Alger, Algérie., 2019, 27-28.

**Ghigo, E., Colombo, M.I., Heinzen, R.A.** The *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole, in: *Coxiella Burnetii*: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium. Springer., 2012, 141–169.

**Gillespie, S., Hawkey, P.M.** Principles and practice of clinical bacteriology. John Wiley & Sons., 2006.

**Giménez, D.F.**, Gram Staining of *Coxiella burnetii*. Journal of bacteriology. 1965, 90(3), 834–835.

**Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kov, E., Marrie, T.J., Raoult, D.** *Coxiella burnetii* Genotyping. Emerging Infectious Diseases., 2005, 11(8), 1211–1217.

**Gonder, J.C., Kishimoto, R.A., Castello, M.D., Pedersen, C.E., Larson, E.W.** Cynomolgus monkey model for experimental q fever infection. Journal of Infectious Diseases., 1979, 139(2), 191-196.

**Gottlieb, Y., Lalar, I., Klasson, L.** Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. Genome biology and evolution., 2015, 7(6), 1779-1796.

**Grech-Angelini, S., Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J.F., Marco, S., Maestrini, O., Uilenberg, G.** Ticks (Acari: Ixodidae) infesting cattle and some other domestic and wild hosts on the French Mediterranean island of Corsica. Parasites and Vectors ., 2016, 9(1), 582.

**Greub, G.** Fièvre Q : une zoonose souvent méconnue . Revue Médicale Suisse., 2013, 9, 879–884.

**Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H.** Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. Veterinary research. , 2006, 37(6), 827–833.

**Guatteo, R., Beaudeau, F., Joly, A., Seegers, H.** *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. Veterinary research., 2007a, 38(6), 849-860.

**Guatteo, R., Beaudeau, F., Ledoux, D., Le Drean, E., Seegers, H.** Risk of false-negative results when delaying PCR from sampling for *Coxiella burnetii* detection in dairy cows. Revue de médecine vétérinaire (Toulouse)., 2007a. 8(12), 641.

**Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F.** Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *Coxiella burnetii* inactivated vaccine. Vaccine., 2008, 26, 4320–4328.

**Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F.** Shedding and serological patterns of dairy cows following abortions associated with *Coxiella burnetii* DNA detection. Veterinary Microbiology., 2012, 155, 430–433.

**Guizzo, M.G., Parizi, L.F., Nunes, R.D., Schama, R., Albano, R.M., Tirloni, L., Oldiges, D.P., Vieira, R.P., Oliveira, W.H.C., Leite, M.D.S., Gonzales, S.A., Farber, M., Martins, O., Vaz, I.D.S., Oliveira, P.L.** A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. Scientific reports., 2017, 7(1), 17554.

**Galluzzo, P., Villari, S., Geraci, F., Sciacca, C., Grippi, F., Currò, V., Chiarenza, G.** Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in dairy cattle from Sicily. Veterinaria italiana., 2019, 55(3), 247-252.

**Gürtler, L., Bauerfeind, U., Blümel, J., Burger, R., Drosten, C., Gröner, A., Heiden M, Hildebrandt M., Jansen B., Offergeld R., Pauli G., Seitz R., Schlenkrich U., Schottstedt V., Strobel, J., Willkommen, H.**

- Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. transfusion medicine hemotherapy., 2014,41 (1), 60-72.
- Hackstadt, T., Williams, J.C.** Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1981, 78(5), 3240-3244.
- Hansen, M.S., Rodolakis, A., Cochonneau, D., Agger, J.F., Christoffersen, A.B., Jensen, T.K., Agerholm, J.S.** *Coxiella burnetii* associated placental lesions and infection level in parturient cows. The Veterinary Journal., 2011, 190(2), e135-e139.
- Harris, R.J., Storm, P.A., Lloyd, A., Arens, M., Marmion, B.P.** Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. Epidemiology & Infection., 2000, 124(3), 543-549.
- Hässig, M., Lubsen, J.** Relationship between abortions and seroprevalences to selected infectious agents in dairy cows. Journal of Veterinary Medicine, Series B.,1998, 45(1-10), 435-441.
- Hässig, M., Lubsen, J.** Relationship between abortions and seroprevalences to selected infectious agents in dairy cows. Journal of Veterinary Medicine, Series B., 1998, 45(1-10), 435-441.
- Hatchette, T., Campbell, N., Whitney, H., Hudson, R., Marrie, T.J.** Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in selected populations of domestic ruminants in Newfoundland. The Canadian veterinary journal., 2002, 43(5), 363–364.
- Hazlett, M.J., McDowall, R., DeLay, J., Stalker, M., McEwen, B., van Dreumel, T., Spinato, M., Binnington, B., Slavic, D., Carman, S., Cai, H.Y.** A prospective study of sheep and goat abortion using real-time polymerase chain reaction and cut point estimation shows *Coxiella burnetii* and *Chlamydophila abortus* infection concurrently with other major pathogens. Journal of veterinary diagnostic investigation., 2013., 25(3), 359-368.
- Hechemy, K.E.** History and prospects of *Coxiella burnetii* research. In: Toman R, Heinzen RA, Samuel JE, Mege J-L eds. *Coxiella burnetii*: recent advances and new perspectives in research of the Q Fever bacterium. Dordrecht: Springer;1-11., 2012.
- Heinzen, R.A., Hackstadt, T., Samuel, J.E.** Developmental biology of *Coxiella burnetii*. Trends in Microbiology., 1999, 7(4). 149–154.
- Hellenbrand, W., Breuer, T., Petersen, L.** Changing Epidemiology of Q Fever in. Emerg. Infect. Dis. in Germany, 1947-1999. Emerging Infectious Disease., 2001, 7, 789-796.
- Herremans, T., Hogema, B.M., Nabuurs, M., Peeters, M., Wegdam-Blans, M., Schneeberger, P., Nijhuis, C., Notermans, D.W., Galama, J., Horrevorts, A., van Loo, I.H.M., Vlamincx, B., Zaaier, H.L., Koopmans, M.P., Berkhout, H., Socolovschi, C., Raoult, D., Stenos, J., Nicholson, W., Bijlmer, H.** Comparison of the performance of IFA, CFA, and ELISA assays for the serodiagnosis of acute Q fever by quality assessment. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease., 2013, 75,16–21.
- Higgins, D., Marrie, T.J.** Seroepidemiology of Q Fever among Cats in New Brunswick and Prince Edward Island. Annals of the New York Academy of Sciences., 1990. 590, 271–274.
- Hoover, T.A., Vodkin, M.H., Williams, J.C., 1992. A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. Journal of Bacteriology. 174(17), 5540–5548.
- Ho, T., Htwe, K. K., Yamasaki, N., Zhang, G. Q., Ogawa, M., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K.** Isolation of *Coxiella burnetii* from dairy cattle and ticks, and some characteristics of the isolates in Japan. Microbiology and immunology.,1995, 39(9), 663-671.

- Horigan, M.W., Bell, M.M., Pollard, T.R., Sayers, A.R., Pritchard, G.C.** Q fever diagnosis in domestic ruminants: Comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 2011, 23(5), 924–931.
- Hornstra, H.M., Priestley, R.A., Georgia, S.M., Kachur, S., Birdsell, D.N., Hilsabeck, R., Gates, L.T., Samuel, J.E., Heinzen, R.A., Kersh, G.J., Keim, P., Massung, R.F., Pearson, T.** Rapid typing of *Coxiella burnetii*. *PLoS ONE* ., 2011, 6(11), e26201.
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S.** Applied logistic regression, (John Wiley & Sons, New York)., 2000, 375.
- Howe, D., Melnicáková, J., Barák, I., Heinzen, R. A.** Maturation of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole requires bacterial protein synthesis but not replication. *Cellular microbiology.*, 2003. 5(7), 469-480.
- Htwe, K.K., Amano, K., Sugiyama, Y., Yagami, K., Minamoto, N., Hashimoto, A., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K.** Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* in domestic and companion animals in Japan. *Veterinary Record.*, 1992, 131, 490.
- Huijsmans, C.J.J., Schellekens, J.J.A., Wever, P.C., Toman, R., Savelkoul, P.H.M., Janse, I., Hermans, M.H.A.** Single-Nucleotide-Polymorphism Genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q Fever Outbreak in The Netherlands . *Applied and Environmental Microbiology.*, 2011. 77(5), 2051–2057.
- Humphres, R.C., Hinrichs, D.J.** Role of antibody in *Coxiella burnetii* infection. *Infection and Immunity.*, 1981, 31(2), 641–645.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A.** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology.*, 1988. 26(11), 2465–2466.
- Hussien, M.O., Enan, K.A., Alfaki, S.H., Gafar, R.A., Taha, K.M., Rahim, A., El, M.** Seroprevalence of *Coxiella burnetii* in Dairy Cattle and Camel in Sudan. *International Journal of Infection.*, 2017, 4 (3), e42945.
- Ioannou, I., Sandalakis, V., Kassinis, N., Chochlakis, D., Papadopoulos, B., Loukaidis, F., Tselentis, Y., Psaroulaki, A.** Tick-borne bacteria in mouflons and their ectoparasites in Cyprus. *Journal of Wildlife Diseases.*, 2011, 47(2), 300-306.
- Isken, L.D., Kraaij-Dirkzwager, M., Vermeer-de Bondt, P.E., Rümke, H.C., Wijkmans, C., Opstelten, W., Timen, A.** Implementation of a Q fever vaccination program for high-risk patients in the Netherlands. *Vaccine.*, 2013. 31, 2617–2622.
- Jäger, C., Lautenschläger, S., Willems, H., Baljer, G.** *Coxiella burnetii* plasmid types QpDG and QpH1 are closely related and likely identical. *Veterinary Microbiology.*, 2002, 89(2-3), 161–166.
- Jin J., Zhou S., Xu Q., An J.** Identification of risk factors in epidemiologic study based on ROC curve and network. *Scientific reports.*, 2017, 7, 46655.
- Jodelko, A., Szymańska-Czerwińska, M., Kycko, A., Niemczuk, K.** Evaluation of the possibility of *C. burnetii* transmission by the alimentary route in a guinea pig model. *Journal of Veterinary Research.*, 2019, 63 (3), 311–315.
- Johnson, S.A.M., Kaneene, J.B., Asare-Dompreh, K., Tasiame, W., Mensah, I.G., Afakye, K., Simpson, S. V., Addo, K.** Seroprevalence of Q fever in cattle, sheep and goats in the Volta region of Ghana. *Veterinary medicine and science.*, 2019, 5, 402–411.
- Jourdain, E., Duron, O., Barry, S., González-Acuña, D., Sidi-Boumedine, K.** Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella* -like bacteria. *infection Ecology and Epidemiology.*, 2015, 5(1), 29230.

- Kaiser, M.N., Hoogstraal, H., Watson, G.E.** Ticks (Ixodoidea) on migrating birds in Cyprus, fall 1967 and spring 1968, and epidemiological considerations. *Bulletin of Entomological research.*, 1974, 64(1), 97-110.
- Kamga-Waladjo, A.R., Gbati, O.B., Kone, P., Lapo, R.A., Chatagnon, G., Bakou, S.N., Pangui, L.J., Diop, P.E.H., Akakpo, J.A., Tainturier, D.** Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. *Tropical Animal Health and Production.*, 2010, 42(5), 953–959.
- Kersh, G.J., Fitzpatrick, K.A., Self, J.S., Biggerstaff, B.J., Massung, R.F.** Long-term immune responses to *Coxiella burnetii* after vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology.*, 2013a., 20(2), 129–133.
- Kersh, G.J., Fitzpatrick, K.A., Self, J.S., Priestley, R.A., Kelly, A.J., Ryan Lash, R., Marsden-Haug, N., Nett, R.J., Bjork, A., Massung, R.F., Andersona, A.D.** Presence and Persistence of *Coxiella burnetii* in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Applied and Environmental Microbiology.*, 2013b, 79, 1697–1703.
- Khaled, H., Sidi-Boumedine, K., Merdja, S., Dufour, P., Dahmani, A., Thiéry, R., Rousset, E., Bouyoucef, A.** Serological and molecular evidence of Q fever among small ruminant flocks in Algeria. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases.*, 2016. 47, 19–25.
- Khalili, M., Sakhaee, E.** An update on a serologic survey of Q fever in domestic animals in Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.*, 2009, 80(6), 1031–1032.
- Kim, S.G., Kim, E.H., Lafferty, C.J., Dubovi, E.** *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerging infectious diseases.*, 2005, 11(4), 619-621.
- Kirkan, Ş., Kaya, O., Tekbiyik, S., Parin, U.** Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science.*, 2008, 32, 215–220.
- Kirkbride, C. A.** Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 1992,4(2), 175-180.
- Klaassen, C.H.W., Nabuurs-Franssen, M.H., Tilburg, J.J.H.C., Hamans, M.A.W.M., Horrevorts, A.M.** Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerging Infectious Disease.*, 2009, 15, 613-614.
- Klaasen, M., Roest, H.J., Van Der Hoek, W., Goossens, B., Secka, A., Stegeman, A.** *Coxiella burnetii* seroprevalence in small ruminants in the Gambia. *PLoS One.*, 2014, 9(1), e85424.
- Klee, S.R., Tyczka, J., Ellerbrok, H., Franz, T., Linke, S., Baljer, G., Appel, B.** Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. *BMC Microbiology.*, 2006, 6(1), 2.
- Klemmer, J., Njeru, J., Emam, A., El-Sayed, A., Moawad, A.A., Henning, K., Elbeskawy, M.A., Sauter-Louis, C., Straubinger, R.K., Neubauer, H., El-Diasty, M.M.** Q fever in Egypt: Epidemiological survey of *Coxiella burnetii* specific antibodies in cattle, buffaloes, sheep, goats and camels. *PLoS One.*, 2018, 13(2), e0192188.
- Krauss, H., Schmeer, N., Schiefer, H.G.** Epidemiology and significance of Q fever in the Federal Republic of Germany. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology.*, 1987, 267(1), 42-50.
- Koh, X.P., Chiou, C.S., Ajam, N., Watanabe, H., Ahmad, N., Thong, K.L.** Characterization of *Shigella sonnei* in Malaysia, an increasingly prevalent etiologic agent of local shigellosis cases. *BMC Infectious Diseases.*, 2012, 12, 122.
- Koudri, M., Ait amrane, A., Selles Sidi Mohammed, A., Khellil C., Smail, F., Belhamiti, T.B.** Survey on

- species composition of Ixodidae tick infesting cattle in Tiaret (Algeria). *Tropical Agriculture*., 2018, 95(1), 102–105.
- Koka, H., Sang, R., Kutima, H.L., Musila, L.** *Coxiella burnetii* Detected in Tick Samples from Pastoral Communities in Kenya . *BioMed Research International*., 2018, 1–5.
- Kuley, R., Smith, H.E., Janse, I., Harders, F.L., Baas, F., Schijlen, E., Nabuurs-Franssen, M.H., Smits, M.A., Roest, H.I.J., Bossers, A.** First complete genome sequence of the Dutch veterinary *Coxiella burnetii* strain NL3262, originating from the largest global Q fever outbreak, and draft genome sequence of its epidemiologically linked chronic human isolate NLhu3345937. *Genome Announc.*, 2016, 4(2), e00245-16.
- Kumsa, B., Socolovschi, C., Almeras, L., Raoult, D., Parola, P.** Occurrence and genotyping of *Coxiella burnetii* in ixodid ticks in oromia, Ethiopia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*., 2015, 93(5), 1074–1081.
- Lacheheb, A., Raoult, D.** Seroprevalence of Q-fever in Algeria. *Clinical Microbiology and Infection*., 2009, 15(2), 167–168.
- Lalzar, I., Friedmann, Y., Gottlieb, Y.** Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environmental microbiology*., 2014, 16(12), 3657-3668.
- Landis, J.R., Koch, G.G.** The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*., 1977, 159-174.
- Lange, S., Klaus, G.** Seroepidemiological studies on the detection of Q fever in sheep in middle Thuringia. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*., 1992, 105(10), 333–335.
- Lanyon, S.R., Hill, F.I., Reichel, M.P., Brownlie, J.** Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal*., 2014, 199(2), 201–209.
- Layez, C., Brunet, C., Lépolard, C., Ghigo, E., Capo, C., Raoult, D., Mege, J.L.** Foxp3 +CD4 +CD25 + regulatory T cells are increased in patients with *Coxiella burnetii* endocarditis. *FEMS FEMS Immunology and Medical Microbiology*., 2012, 64(1), 137–140.
- Leulmi, H., Aouadi, A., Bitam, I., Bessas, A., Benakhla, A., Raoult, D., Parola, P.** Detection of *Bartonella tamiae* , *Coxiella burnetii* and *rickettsiae* in arthropods and tissues from wild and domestic animals in northeastern Algeria. *Parasites and Vectors*., 2016, 9, 27.
- Lockhart, M.G., Graves, S.R., Banazis, M.J., Fenwick, S.G., Stenos, J.** A comparison of methods for extracting DNA from *Coxiella burnetii* as measured by a duplex qPCR assay. *Letters in Applied Microbiology*., 2011, 52(5), 514–520.
- López-Gatius, F., Almeria, S., Garcia-Ispuerto, I.** Serological screening for *Coxiella burnetii* infection and related reproductive performance in high producing dairy cows. *Research in veterinary science*., 2012, 93(1), 67-73.
- Lorenz, H., Jäger, C., Willems, H., Baljer, G.** PCR detection of *Coxiella burnetii* from different clinical specimens, especially bovine milk, on the basis of DNA preparation with a silica matrix. *Applied and Environmental Microbiology*., 1998, 64(11), 4234–4237.
- Lorthios, P.** Hygiénisation de fumiers d’ovins lors du compostage, in: Colloque" Le Compostage à La Ferme Des Effluents d’élevage", Paris., 1998.



- Machado-Ferreira, E., Vizzoni, V. F., Balsemão-Pires, E., Moerbeck, L., Gazeta, G. S., Piesman, J., Voloch, C.M., Soares, C.A.** *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. *Parasitology research.*, 2016, 115(12), 4691-4699.
- Macías-Rioseco, M., Riet-Correa, F., Miller, M.M., Sondgeroth, K., Fraga, M., Silveira, C., Uzal, F.A., Giannitti, F.** Bovine abortion caused by *Coxiella burnetii* : report of a cluster of cases in Uruguay and review of the literature. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 2019, 31(4), 634–639.
- Madariaga, M. G., Rezai, K., Trenholme, G. M., Weinstein, R. A.** Q fever: a biological weapon in your backyard. *The Lancet infectious diseases.*, 2003, 3(11), 709-721.
- Malosse, N.** La fièvre Q : risque zoonotique. Thèse de doctorat. Thèse Docteur Vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, France., 2008, 12, 17.
- Mancini, F., Vescio, M. F., Toma, L., Di Luca, M., Severini, F., Cacciò, S. M., Mariano, C., Nicolai, G., Laghezza Masci, V., Fausto, A.M., Pezzotti, P., Ciervo, A.** Detection of tick-borne pathogens in ticks collected in the suburban area of Monte Romano, Lazio Region, Central Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità.*, 2019, 55(2), 143-150.
- Marrie, T.J.** Q fever - a review. *The Canadian veterinary journal.*, 1990, 31(8), 555–563.
- Marushchak, L. V., Deriabin, O.N., Dedok, L., Volosyanko, E., Garcavenko, T.** Development of a PCR Kit for Detection of *Coxiella burnetii* in Ukraine. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.*, 2019, 1–7.
- Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., Chessa, G., Cillara, G., Chisu, V., Tola, S.** Occurrence, distribution, and role in abortion of *Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy. *Veterinary microbiology.*, 2004, 99(3-4), 301-305.
- Matsumoto, K., Ogawa, M., Brouqui, P., Raoult, D., Parola, P.** Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. *Medical and veterinary entomology.*, 2005, 19(3), 263-270.
- Maurin, M., Raoult, D.** Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews.*, 1999, 12(4), 518–553.
- Mboussou, Y.** Complications périnatales associées à une exposition à la fièvre Q : étude épidémiologique à l'île de la Réunion. *Médecine humaine et pathologie.* universite bordeaux II, France , 2017.
- 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.** *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiology and Infection.*, 2010, 138(1), 21–27.
- McCaul, T.F., Williams, J.C.** Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: Structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations. *Journal of Bacteriology.*, 1981, 147(3), 1063–1076.
- McNemar, Q.** Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika.*, 1947, 12(2), 153-157.
- Meddour Bouderdia K., Meddour A.** Clés d'identification des Ixodina (Acarina) d'Algerie. *Sciences and Technologie.*, 2006, 24, 32–42.
- Mediannikov, O., Fenollar, F., Socolovschi, C., Diatta, G., Bassene, H., Molez, J.F., Sokhna, C., Trape, J.F., Raoult, D.** *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. *PLoS neglected tropical diseases.*, 2010, 4(4), e654.
- Mege, J.L., Maurin, M., Capo, C., Raoult, D.** *Coxiella burnetii*: The “query” fever bacterium. A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. *FEMS Microbiology Reviews.*, 1997, 19(4), 209–217.

- Meunier, J.** Ruminant Milk QFever LSI Kit, Technical card, Laboratoire Service International, Lissieu, France. 2008.
- Micusan, V. V., Borduas, A.G.** Biological properties of goat immunoglobulins G. *Immunology.*, 1977, 32(4), 373-381.
- Mihalca, A. D., Dumitrache, M. O., Magdas, C., Gherman, C., Domsa, C., Mircean, V., Ghira, I.V., Pocora, V., Ionescu, D.T., Sikó Barabási, S., Cozma, V., Sándor, A.D.** Synopsis of the hard ticks (Acari: Ixodidae) of Romania with update on host associations and geographical distribution. *Experimental and applied acarology*, 2012, 58(2), 183-206.
- Milazzo, A., Hall, R., Storm, P.A., Harris, R.J., Winslow, W., Marmion, B.P.** Sexually Transmitted Q Fever. *Clinical Infectious Diseases.*, 2002, 33, 399–402.
- Milhano, N., de Carvalho, I. L., Alves, A. S., Arroube, S., Soares, J., Rodriguez, P., de Sousa, R.** Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks and tick-borne diseases.*, 2010, 1(4), 172-177.
- Miller HK, Priestley RA, Kersh GJ.** Transmission of *Coxiella burnetii* by ingestion in mice. *Epidemiology and Infection.*, 2020, 148, e21, 1–8.
- Million, M., Lepidi, H., Raoult, D.** Fièvre Q: actualités diagnostiques et thérapeutiques. *Médecine et maladies infectieuses.*, 2009, 39(2), 82–94.
- Mioni, M.D.S.R., Sidi-Boumedine, K., Morales Dalanezi, F., Fernandes Joaquim, S., Denadai, R., Reis Teixeira, W.S., Bahia Labruna, M., Megid, J.** New Genotypes of *Coxiella burnetii* Circulating in Brazil and Argentina. *Pathogens.*, 2020, 9(1), 30.
- Molina, V., Risalde, M.A., Sánchez-Cordón, P.J., Pedrera, M., Romero-Palomo, F., Luzzago, C., Gómez-Villamandos, J.C.** Effect of infection with BHV-1 on peripheral blood leukocytes and lymphocyte subpopulations in calves with subclinical BVD. *Research in Veterinary Science.*, 2013, 95(1), 115–122.
- Mollet, C., Drancourt, M., Raoult, D.** Determination of *Coxiella burnetii* rpoB sequence and its use for phylogenetic analysis. *Gene.*, 1998, 207, 97–103.
- Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., Mégraud, F.** Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces. *Journal of Clinical Microbiology.*, 1997, 35(4), 995–998.
- Morita, C., Katsuyama, J., Yanase, T., Ueno, H., Muramatsu, Y., Hohdatsu, T., Koyama, H.** Seroepidemiological survey of *Coxiella burnetii* in domestic cats in Japan. *Microbiology and immunology.*, 1994, 38, 1001–1003.
- Mottola, G., Ghigo, E.** *Coxiella burnetii*, l'agent de la fièvre Q, bloque la formation du phagolysosome. *Medecine/Sciences.*, 2013. 29(5), 455–457.
- Mtshali, K., Nakao, R., Sugimoto, C., Thekiso, O.** Occurrence of *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia* species and *Anaplasma phagocytophilum*-like bacterium in ticks collected from dogs and cats in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association.*, 2017, 88(1), 1-6.
- Muramatsu, Y., Maruyama, M., Yanase, T., Ueno, H., Morita, C.** Improved method for preparation of samples for the polymerase chain reaction for detection of *Coxiella burnetii* in milk using immunomagnetic separation. *Veterinary microbiology.*, 1996, 51, 179–185.

- Muskens, J., Van Engelen, E., Van Maanen, C., Bartels, C., Lam, T.J.G.M.,** Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Veterinary Record.*, 2011, 168(3), 79-79.
- Ndhlovu, D.N., Makaya, P.V., Penzhorn, B.L.** Tick infestation, and udder and teat damage in selected cattle herds of Matabeleland South, Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research.*, 2012, 76(2), 235-248.
- Natale, A., Bucci, G., Capello, K., Barberio, A., Tavella, A., Nardelli, S., Marangon, S., Ceglie, L.** Old and new diagnostic approaches for Q fever diagnosis: Correlation among serological (CFT, ELISA) and molecular analyses. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.*, 2012, 35, 375–379.
- Ndeereh, D., Muchemi, G., Thaiyah, A., Otiende, M., Angelone-Alasaad, S., Jowers, M.J.** Molecular survey of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks at wildlife–livestock interfaces in Kenya. *Experimental and Applied Acarology.*, 2017. 72(3), 277-289.
- Nicollet, P., Valognes, A.** Current review of Q fever diagnosis in animals. *Bulletin De l'Academie Veterinaire De France.*, 2007, 160, 289–296.
- Nielsen K. T., Nielsen S. S., Agger J. F., Christoffersen A. B. et Agerholm J. S.** Association between antibodies to *Coxiella burnetii* in bulk tank milk and perinatal mortality of Danish dairy calves. *Acta veterinaria Scandinavica.*, 2011, 53(1), 64.
- Nielsen, S.Y., Andersen, A.M.N., Mølbak, K., Hjøllund, N.H., Kantsø, B., Kroghfelt, K.A., Henriksen, T.B.** No excess risk of adverse pregnancy outcomes among women with serological markers of previous infection with *Coxiella burnetii*: Evidence from the Danish National Birth Cohort. *BMC Infectious Diseases.*, 2013, 13, 87.
- Niemczuk, K., Szymańska-Czerwińska, M.O.N.I.K.A., Zarzecka, A., Konarska, H.A.N.N.A.** Q fever in a cattle herd and humans in the south-eastern Poland. Laboratory diagnosis of the disease using serological and molecular methods. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.*, 2011, 55(4), 593-598.
- Niemczuk, K., Szymańska-Czerwińska, M., Śmietanka, K., Bocian, Ł.** Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. *Veterinary Microbiology.*, 2014, 171, 147–152.
- Noda, A.A., Rodríguez, I., Miranda, J., Contreras, V., Mattar, S.** First molecular evidence of *Coxiella burnetii* infecting ticks in Cuba. *Ticks and tick-borne diseases.*, 2016, 7(1), 68-70.
- Nogareda, C., Almería, S., Serrano, B., García-Ispuerto, I., López-Gatius, F.** Dynamics of *Coxiella burnetii* antibodies and seroconversion in a dairy cow herd with endemic infection and excreting high numbers of the bacterium in the bulk tank milk. *Research in Veterinary Science.*, 2012, 93, 1211–1212.
- Nokhodian, Z., Feizi, A., Moradi, A., Yaran, M., Hoseini, S.G., Ataei, B., Hosseini, M.** Detection and risk factors of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle based on bulk tank milk samples in center of Iran. *Preventive veterinary medicine.*, 2016, 134, 139-144.
- Nourollahi-Fard, S.R., Khalili, M., 2011.** PCR-Detection of *Coxiella burnetii* in Ticks Collected from Sheep and Goats in Southeast Iran. *Iranian journal of arthropod-borne diseases.*, 2011, 5(1), 1–6.
- Nusinovici, S., Hoch, T., Brahim, M.L., Joly, A., Beaudeau, F.** The Effect of Wind on *Coxiella burnetii* Transmission Between Cattle Herds: a Mechanistic Approach. *transboundary and emerging diseases.*, 2015, 64(2), 585–592.

- Obaidat, M.M., Kersh, G.J.** Prevalence and Risk Factors of *Coxiella burnetii* Antibodies in Bulk Milk from Cattle, Sheep, and Goats in Jordan. *Journal of food protection.*, 2017, 80(4), 561-566.
- Obaidat, M. M., Malania, L., Imnadze, P., Roesss, A. A., Bani Salman, A. E., & Arner, R. J.** 2019. Seroprevalence and Risk Factors for *Coxiella burnetii* in Jordan. *The American journal of tropical medicine and hygiene.*, 2019, 101 (1), 40–44.
- Ogo, N.I., de Mera, I.G.F., Galindo, R.C., Okubanjo, O.O., Inuwa, H.M., Agbede, R.I.S., La Fuente, J. De.** Genetic characterization of *Coxiella burnetii* in *Amblyomma variegatum* ticks from North-central Nigeria: Public health importance. *Veterinary World.*, 2013, 6(10), 818-822.
- Oskam, C.L., Gofton, A.W., Greay, T.L., Yang, R., Doggett, S., Ryan, U.M., Irwin, P.J.** Molecular investigation into the presence of a *Coxiella* sp. in *Rhipicephalus sanguineus* ticks in Australia. *Veterinary microbiology.*, 2017, 201, 141-145.
- World Organization for Animal Health (OIE).** Chapter 2.1.16. Q fever. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* OIE, Paris, 2018, 1–118. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.01.16\\_Q\\_FEVER.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.16_Q_FEVER.pdf) 467 (Accessed 18 September 2018).
- Pape, M., Bouzalas, E.G., Koptopoulos, G.S., Mandraveli, K., Arvanitidou-Vagiona, M., Nikolaidis, P., Alexiou-Daniel, S.** The serological prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep and goats in northern Greece. *Clinical Microbiology and Infection.*, 2009, 15, 146–147.
- Parisi, A., Fraccalvieri, R., Cafiero, M., Miccolupo, A., Padalino, I., Montagna, C., Capuano, F., Sottili, R.** Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Veterinary microbiology.*, 2006, 118(1-2), 101-106.
- Parker, N.R., Barralet, J.H., Bell, A.M.** Seminar Q fever. *Lancet.*, 2006, 367, 679–688.
- Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A. B., Agerholm, J. S.** Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine.*, 2012., 107(1-2), 57-64.
- Paul, S., Agger, J.F., Agerholm, J.S., Markussen, B.** Prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* seropositivity in Danish beef and dairy cattle at slaughter adjusted for test uncertainty. *Preventive Veterinary Medicine.*, 2014, 113(4), 504–511.
- Peter, O., Dupuis, G., Burgdorfer, W., Peacock, M.** Evaluation of the complement fixation and indirect immunofluorescence tests in the early diagnosis of primary Q fever. *European Journal of Clinical Microbiology.*, 1985, 4(4), 394–396.
- Pexara, A., Solomakos, N., Govaris, A.** Q fever and prevalence of *Coxiella burnetii* in milk, *Trends in Food Science and Technology.*, 2018, 71(2018), 65–72.
- Pfaffl, M.W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research.*, 2001, 29(9), e45.
- Philip, C.B.** Comments on the name of the Q fever organism. *Public Health Reports.*, 1948, 63(2).58.
- Philip, C.B., Hoogstraal, H., Reiss-Gutfreund, R., Clifford, C.M.** Evidence of rickettsial disease agents in ticks from Ethiopian cattle. *Bulletin of the World Health Organization.*, 1966, 35(2), 127–131.
- Pierrou, M., Mimoune, G., Vastel, G.** une importante epidemie de fièvre q (175 cas)-observée a Batna (algerie). *Presse Medicale.*, 1956, 64(21), 471–473.
- Piñero, A., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Barandika, J.F., Atxaerandio, R., García-Pérez, A.L.** Changes in

- the dynamics of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle: An approach to match field data with the epidemiological cycle of *Coxiella burnetii* in endemic herds. *Journal of Dairy Science.*, 2014, 97, 2718–2730.
- Plummer, P.J., McClure, J.T., Menzies, P., Morley, P.S., Van den Brom, R., Van Metre, D.C.** Management of *Coxiella burnetii* infection in livestock populations and the associated zoonotic risk: A consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, 2018, 32 (5), 1481–1494.
- Pluta, S., Hartelt, K., Oehme, R., Mackenstedt, U., Kimmig, P.** Prevalence of *Coxiella burnetii* and Rickettsia spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases.*, 2010, 1(3), 145–147.
- Poncelet, J.-L.** Les maladies transmises par les tiques chez les ovins. *Bulletin du Groupe Technique Vétérinaire.*, 1993, 5, 29-35.
- Porter, S.R., Czaplicki, G., Mainil, J., Guattéo, R., Saegerman, C.** Q Fever: current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *International Journal of Microbiology.*, 2011, 2011, 01-22.
- Portier, A., Vollenweider, P., Grestle, E.** Sur un cas de Q fever (rick- ettsiose de Burnet-Derrick). *Alger Medicales.*, 1948, 51, 168–171.
- Potgieter, L.N.** Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice.*, 1995, 11(3), 501–520.
- Psaroulaki, A., Ragiadakou, D., Kouris, G., Papadopoulos, B., Chaniotis, B., Tselentis, Y., 2006.** Ticks, tick-borne rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek Island of Cephalonia. *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 2006, 1078(1), 389-399.
- Psaroulaki, A., Chochlakis, D., Angelakis, E., Ioannou, I., Tselentis, Y., 2014.** *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.*, 2014, 108(10), 625-631.
- Rady, M., Glavits, R., Nagy, G. Y.** Demonstration in Hungary of Q fever associated with abortions in cattle and sheep. *Acta Veterinaria Hungarica.*, 1985, 33(3-4), 169-176.
- Raele, D. A., Galante, D., Pugliese, N., De Simone, E., Cafiero, M. A.** *Coxiella*-like endosymbiont associated to the “Anatolian brown tick” *Rhipicephalus bursa* in Southern Italy. *Microbes and infection.*, 2015, 17(11-12), 799-805.
- Rahal, K., Bennadji, A., Dahmani, A., Dechicha, A., Khaled, H., Merdja, S., Lounes, N., Roussete, E., Sidi Boumedine, K., Thiery, R.** Séroprévalence apparente de la Brucellose, Chlamydieuse et fièvre Q chez les ovins de la région de Ksar Boukhari. *Recl. 4èmes Journées Vétérinaires Blida.*, 2011, 4, 1–16.
- Rahal, M., Tahir, D., Eldin, C., Bitam, I., Raoult, D., Parola, P.** Genotyping of *Coxiella burnetii* detected in placental tissues from aborted dairy cattle in the north of Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.*, 2018, 57, 50–54.
- Rahimi, E., Doosti, A., Ameri, M., Kabiri, E., Sharifian, B.** Detection of *Coxiella burnetii* by nested PCR in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. *Zoonoses and public health.*, 2010, 57(7-8), e38-e41.
- Rahman, M., Alam, M., Islam, M., Bhuiyan, A. K., & Rahman, A. K. M.** Serological and molecular evidence of Q fever in domestic ruminants in Bangladesh. *Veterinary medicine international.*, 2016, 9098416.
- Raoult, D., Laurent, J.C., Mutillod, M.** Monoclonal antibodies to *Coxiella burnetii* for antigenic detection in cell cultures and in paraffin-embedded tissues. *American Journal of Clinical Pathology.*, 1994, 101(3), 318–320.
- Raoult, D., Marrie, T.J., Mege, J.L.** Natural history and pathophysiology of Q fever. *The Lancet infectious*

diseases., 2005, 5(4), 219-226.

**Reusken, C., van der Plaats, R., Opsteegh, M., de Bruin, A., Swart, A.** *Coxiella burnetii* (Q fever) in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* at livestock farms and urban locations in the Netherlands; could *Rattus* spp. represent reservoirs for (re)introduction? . Preventive Veterinary Medicine., 2011, 101, 124–130.

**Rockhill B., Newman B. Weinberg C.** Use and misuse of population attributable fractions. American Journal of Public Health., 1998, 88(1), 15–19.

**Rodolakis, A.** Q fever, state of art: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. Small Ruminant Research., 2006, 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.** Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. Journal of dairy science., 2007, 90(12), 5352-5360.

**Rodolakis, A.** Q fever in dairy animals. Annals of the New York Academy of Sciences., 2009; 1166, 90-93.

**Roest, H.I.J., Tilburg, J.J.H.C., Van der Hoek, W., Vellema, P., Van Zijderveld, F.G., Klaassen, C.H.W., Raoult, D.** The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. Epidemiology & Infection., 2011, 139(1), 1-12.

**Rolain, J. M., Raoult, D., Marmion, B. P., Harris, R. J., Storm, P., Ayres, J. G.** Molecular detection of *Coxiella burnetii* in blood and sera during Q fever. Qjm, an international journal of medicine., 2005, 98(8), 615-620.

**Rousset, E., Russo, P., Pepin, M., Raoult, D.** La fièvre Q: une zoonose encore mystérieuse. **Bulletin Groupe Technique Vétérinaire.**, 2000, (7), 139-143.

**Rousset, E.** Epidémiologie de la fièvre Q animale. Situation en France. Medecine et Maladies Infectieuses., 2001, 31(2), 233–246.

**Rousset, E., Eon, L., Russo, P., Pepin, M., Aubert, M.** La fièvre Q: épidémiologie d'une zoonose. Bulletin Groupe Technique Vétérinaire., 2002.17, 9–15.

**Rousset, E., Durand, B., Berri, M., Dufour, P., Prigent, M., Russo, P., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A., Aubert, M.** Comparative diagnostic potential of three serological tests for abortive Q fever in goat herds. Veterinary Microbiology., 2007, 124, 286–297.

**Rousset, E., Berri, M., Durand, B., Dufour, P., Prigent, M., Delcroix, T., Touratier, A., Rodolakis, A.** *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. Applied and Environmental Microbiology., 2009, 75(2), 428–433.

**Rousset, E., Prigent, M., Ameziane, G., Brugidou, R., Martel, I., Grob, A., Gall, G.L., Kerninon, S., Delaval, J., Chassin, A.** Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. Euroreference., 2012, 8, 21–28.

**Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J. F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R. A., García-Pérez, A. L.** Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. BMC veterinary research., 2010, 6(1), 3.

**Rustscheff, S., Norlander, L., Macellaro, A., Sjöstedt, A., Vene, S., Carlsson, M.** A case of Q fever acquired in Sweden and isolation of the probable ethiological agent, *Coxiella burnetii* from an indigenous source. *Scandinavian journal of infectious diseases.*, 2000, 32, 605–607.

**Ryan, E.D., Kirby, M., Collins, D.M., Sayers, R., Mee, J.F., Clegg, T.** Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q

- fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiology and Infection.*, 2011, 139, 1413–1417.
- Sajid, M.S., Iqbal, Z., Khan, M.N., Muhammad, G., Khan, M.K.** Prevalence and associated risk factors for bovine tick infestation in two districts of lower Punjab, Pakistan. *Preventive veterinary medicine.*, 2009, 92(4), 386-391.
- Samish, M., Pipono, E.** Development of infectivity in *Hyalomma detritum* (Schulze, 1904) tick infected with *Theileria annulata* (Dschunkowzky and Luhs, 1904). *Parasitology.*, 1978, 77, 375–379.
- Sánchez, J., Souriau, A., Buendía, A.J., Arricau-Bouvery, N., Martínez, C.M., Salinas, J., Rodolakis, A., Navarro, J.A.** Experimental *Coxiella burnetii* Infection in Pregnant Goats: a Histopathological and Immunohistochemical Study. *Journal of Comparative Pathology.*, 2006, 135, 108–115.
- Santos, A.S., Tilburg, J.J., Botelho, A., Barahona, M.J., Nuncio, M.S., Nabuurs-Franssen, M.H., Klaassen, C.H.** Genotypic diversity of clinical *Coxiella burnetii* isolates from Portugal based on MST and MLVA typing. *International Journal of Medical Microbiology.*, 2012, 302(6), 253-256.
- Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P., Santos-Reis, M., Fonseca, C., Formosinho, P., Vilela, C., Bacellar, F.** The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology.*, 2011, 55(1), 85-121.
- Satta, G., Chisu, V., Cabras, P., Fois, F., Masala, G.** Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. *Journal of medical microbiology.*, 2019, 60(1), 63-68.
- Schelling, E., Diguimbaye, C., Daoud, S., Nicolet, J., Boerlin, P., Tanner, M., Zinsstag, J.** Brucellosis and Q-fever seroprevalences of nomadic pastoralists and their livestock in Chad. *Preventive Veterinary Medicine.*, 2003, 61(4), 279–293.
- Schmeer, N.** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the demonstration of IgG1, IgG2 and IgM antibodies in bovine Q fever infection. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene. Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology.*, 1985, 259(1), 20-34.
- Schneeberger, P. M., Wintenberger, C., Van der Hoek, W., & Stahl, J. P.** Q fever in the Netherlands—2007–2010. what we learned from the largest outbreak ever. *Médecine et maladies infectieuses.*, 2014, 44(8), 339-353.
- Schramek, S., Mayer, H.** Different sugar compositions of lipopolysaccharides isolated from phase I and pure phase II cells of *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity.*, 1982, 38(1), 53–57.
- Scolamacchia, F., Handel, I.G., Fèvre, E.M., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvoort, B.M.D.C.** Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. *PLoS One.*, 2010, 5(1), e8623.
- Sekeyová, Z., Roux, V., Raoult, D.** Intraspecies diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by com 1 and muc Z sequence comparison. *FEMS Microbiology Letters.*, 1999, 180, 61–67.
- Selim, A., Elhaig, M.** Q fever in domestic small ruminant. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.*, 2016, 11, 1–8.
- Senevet, G.** Les espèces algériennes du genre *Hyalomma*. *Archives de l'Institut Pasteur, Afrique du Nord.*, 1922, 2, 393-418.

- Senevet, G., Rossi, P.** Contribution à l'étude des Ixodidés (XII note). Étude saisonnière des Ixodidés de la région de Bouira (Algérie). Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie.,1924, 223-232.
- Sergent, E.** Etudes sur les piroplasmoses bovines. Institut Pasteur d'Algérie., 1945, 816.
- Sergent, E.** Les travaux scientifiques de l'Institut Pasteur en Algérie de 1900 à 1902. Presses universitaires de France., 1964, 548.
- Sentaosa, E., El Karkouri, K., Michelle, C., Raoult, D., Fournier, P.E.** Draft genome sequence of *Rickettsia aeschlimannii*, associated with *Hyalomma marginatum* ticks. Genome announcements., 2014,2(4),e00666-14.
- Seo, M. G., Ouh, I. O., Lee, S. H., Kim, J. W., Rhee, M. H., Kwon, O. D., Kim, T.H., Kwak, D.** Prevalence of *Coxiella burnetii* in cattle at South Korean national breeding stock farms. PloS one., 2017 12(5), e0177478.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., Ward, N.L., Tettelin, H., Davidsen, T.M., Beanan, M.J., Deboy, R.T., Daugherty, S.C., Brinkac, L.M., Madupu, R., Dodson, R.J., Khouri, H.M., Lee, K.H., Carty, H.A., Scanlan, D., Heinzen, R.A., Thompson, H.A., Samuel, J.E., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F.** Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proceedings of the National Academy of Sciences., 2003, 100(9), 5455–5460.
- Shannon, J.G., Cockrell, D.C., Takahashi, K., Stahl, G.L., Heinzen, R.A.** Antibody-mediated immunity to the obligate intracellular bacterial pathogen *Coxiella burnetii* is Fc receptor- and complement-independent. BMC Immunology., 2009. 10, 26
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E.** Molecular epidemiology of Q fever: a review of *Coxiella burnetii* genotyping methods and main achievements. Gene., 2011, 34, 176.
- Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Henning, K., Ziller, M., Niemczuck, K., Roest, H., Thiéry, R.** Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. EFSA Supporting Publications., 2017, 7(5), 48E.
- Smith, D.J.W., Derrick, E.H.** Studies in the Epidemiology of Q Fever. 1. The Isolation of Six Strains of *Rickettsia burnetii* from the Tick *Haemaphysalis humerosa*. Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science., 1940, 18, 103–118.
- Sobral, D., Schwarz, S., Bergonier, D., Brisabois, A., Feßler, A.T., Gilbert, F.B., Kadlec, K., Lebeau, B., Loisy-Hamon, F., Treilles, M.** High throughput multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) of *Staphylococcus aureus* from human, animal and food sources. PLoS One., 2012, 7, e33967.
- Sohrabi, S., Yakhchali, M., Ghashghai, O.** Hard ticks (Acarina: Ixodidae) diversity in the natural habitat of Iranian domestic ruminants: a provincial study in Kermanshah. Journal of Veterinary Research, 2013, 68(1), 39-46.
- Smith R.** Veterinary Clinical Epidemiology. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995, 98–100.
- Smith, D.R.** Mutation rates in plastid genomes: They are lower than you might think . Genome biology and evolution.,2015, 7(5), 1227-1234.
- Sprong, H., Tjisse-Klasen, E., Langelaar, M., De Bruin, A., Fonville, M., Gassner, F., Takken, W., Van Wieren, S., Nijhof, A., Jongejan, F., Maassen, C.B.M., Scholte, E.J., Hovius, J.W., Emil Hovius, K., Špitalská, E., Van Duynhoven, Y.T.** Prevalence of *coxiella burnetii* in ticks after a large outbreak of Q Fever. Zoonoses and public health., 2012, 59(1), 69-75.
- Spyridaki, I., Psaroulaki, A., Loukaides, F., Antoniou, M., Hadjichristodolou, C., Tselentis, Y.** Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: Detection by nested



- polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene., 2002, 66(1), 86–90.
- Srikumaran, S., Kelling, C.L., Ambagala, A.** Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. Animal Health Research Reviews., 2007, 8(2), 215–229.
- Stein, A., Raoult, D.** Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology., 1992, 30(9), 2462–2466.
- Stein, A., Raoult, D.** Lack of pathotype specific gene in human *Coxiella burnetii* isolates. Microbial pathogenesis., 1993, 15(3), 177–185.
- Sting, R., Kopp, J., Mandl, J., Seeh, C., Seemann, G., Kimmig, P., Schmitt, K., Mentrup, T.** Studies of *Coxiella burnetii* infections in dairy herds with special regard to infections in men. Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift., 2002, 115(9-10), 360-365.
- Subramanian, G., Sekeyova, Z., Raoult, D., Mediannikov, O.** Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. Ticks and tick-borne diseases., 2012, 3(5-6), 406-410.
- Sulyok, K.M., Kreizinger, Z., Hornstra, H.M., Pearson, T., Szigeti, A., Dán, Á., Balla, E., Keim, P.S., Gyuranecz, M.** Genotyping of *Coxiella burnetii* from domestic ruminants and human in Hungary: Indication of various genotypes. BMC Veterinary Research., 2014, 10, 107.
- Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., Homan, W.L.** Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. FEMS Microbiology Letters., 2006, 254, 268–274.
- Szymańska-Czerwińska, M., Jodelko, A., Niemczuk, K.** Occurrence of *Coxiella burnetii* in Polish dairy cattle herds based on serological and PCR tests. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases., 2019, 67(2019), 101377.
- Tarasevich, I. V.** Studies on experimental Q fever in *Hyalomma plumbeum plumbeum* Panz. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii., 1957, 28(6), 45.
- Tatsumi, N., Baumgartner, A., Qiao, Y., Yamamoto, I., Yamaguchi, K.** Detection of *Coxiella burnetii* in market chicken eggs and mayonnaise. Annals of the New York Academy of Sciences., 2006, 1078, 502–505.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Joly, A., Beaudeau, F.** Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. Epidemiology and Infection., 2012, 140, 1710–1713.
- Taurel, A.F., Guatteo, R., Lehebel, A., Joly, A., Beaudeau, F.** Vaccination using phase I vaccine is effective to control *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy cattle herds. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases., 2014, 37, 1–9.
- Thompson, H.A., Hoover, T.A., Vodkin, M.H., Shaw, E.I.** Do chromosomal deletions in the lipopolysaccharide biosynthetic regions explain all cases of phase variation in *Coxiella burnetii* strains? An update. Annals of the New York Academy of Sciences., 2003, 990, 664–670.
- Thompson, M., Myktyczuk, N., Gooderham, K., Schulte-Hostedde, A.** Prevalence of the bacterium *Coxiella burnetii* in wild rodents from a canadian natural environment park. Zoonoses Public Health. 2012., 59(8), 553–560.
- Thrusfield, M.** Veterinary Epidemiology, 3rd edn., Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. 2007, 230–238.
- To, H., Htwe, K.K., Kako, N., Kim, H.J., Yamaguchi, T., Fukushi, H., Hirai, K.** Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. Journal of veterinary medical science., 1998, 60(7),

859–861.

**Tilburg, J.J., Roest, H.J., Nabuurs-Franssen, M.H., Horrevorts, A.M., Klaassen, C.H.** Genotyping reveals the presence of a predominant genotype of *Coxiella burnetii* in consumer milk products. *Journal of clinical microbiology.*, 2012, 50(6), 2156–2158.

**Toledo, A., Jado, I., Olmeda, S., Casado-Nistal, M., Gil, H., Escudero, R., Anda, P.** Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.*, 2009a, 9(5), 465-468.

**Toledo, A., A. S. Olmeda, R. Escudero, I. Jado, F. Valca´rce, M. A. Casado-Nistal, M. Rodriguez-Vargas, H. Gil, and P. Anda. 2009.** Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *The American journal of tropical medicine and hygiene.*, 2009b, 81(1), 67-74.

**Toma B., Dufour B., Sanaa M., Benet J.J., Shaw A., Moutou F. et Louza A.** Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures. Alfort, France. 2eme Edit. 68p., 2001.

**Toma, L., Cecere, J.G., Bianchi, R., Luca, M. Di, Khoury, C., Quarchioni, E., Manzia, F., Rezza, G., Ciervo, A.** Detection of Microbial Agents in Ticks Collected from Migratory Birds in Central Italy. *Vector-borne and zoonotic diseases.*, 2014, 14(3), 199-205.

**Torina, A., Khoury, C., Caracappa, S., Maroli, M.** Ticks infesting livestock on farms in Western Sicily, Italy. *Experimental and applied acarology.*, 2006, 38(1), 75-86.

**Tozer, S.J.** Epidemiology , Diagnosis and Prevention of Q fever in Queensland. The University of Queensland , Australia, 2015.

**Tramuta, C., Lacerenza, D., Zoppi, S., Gorla, M., Dondo, A., Ferroglio, E., Nebbia, P., Rosati, S.** Development of a set of multiplex standard polymerase chain reaction assays for the identification of infectious agents from aborted bovine clinical samples. *ournal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 2011, 23(4), 657–664.

**Tukur, H.B., Ajogi, I., Kabir, J., Umoh, J.U.** Seroprevalence of *Coxiella Burnetti* in Cattle and Its Risk Factors in Kaduna Metropolis , Kaduna State , Nigeria. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS).*, 2014, 7(2), 1–5.

**Turcotte, M. È.** Prévalence et facteurs de risque de l’infection par *Coxiella burnetii* chez les ruminants d’élevage au Québec. Faculté de médecine vétérinaire. Université de Montréal, Canada, 2015.

**Valcárcel, F., González, J., Jaime, J. T., Olmeda, A.S.** Long term study of ixodid ticks feeding on red deer (*Cervus elaphus*) in a meso-Mediterranean climate. *Experimental and Applied Acarology.*, 2016, 69(1), 61-72.

**Valencia, C.E., Appel, V.A., Ruíz, G.A., Salazar, H.** Identification and prevalence of ticks (ACARI: Ixodidae) in bovines in five municipalities of the Popayán plateau (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.*, 2017, 30(3), 239-247.

**Valla, G., Bizzarri, D., Ferrari, G., Bussacchini, M.** Prevalence of *Coxiella burnetii* in bulk milk in herds of dairy cows and possible correlation with Italian reproductive problems. *Large Animal Review.*, 2014, 20(2), 51-56.

**Van den Brom, R., Van Engelen, E., Lutikholt, S., Moll, L., Van Maanen, K., Vellema, P.** *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from dairy goat and dairy sheep farms in The Netherlands in 2008. *Veterinary Record.*, 2012, 170(12), 310-310.

**Van den Brom, R., van Engelen, E., Roest, H.I.J., van der Hoek, W., Vellema, P.** *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: An opinionated review. *Veterinary Microbiology.*, 2015, 181, 119–129.

- Vanderburg, S., Rubach, M.P., Halliday, J.E., Cleaveland, S., Reddy, E.A., Crump, J.A.** Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a One Health systematic review. *PLoS neglected tropical diseases.*, 2014, 8(4), e2787.
- Van Engelen, E., Schotten, N., Schimmer, B., Hautvast, J.L.A., Van Schaik, G., van Duijnhoven, Y.T.H.P.** Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Preventive veterinary medicine.*, 2014, 117(1), 103-109.
- Van Nguyen, S., Hirai, K.** Differentiation of *Coxiella burnetii* isolates by sequence determination and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of isocitrate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiology Letters.*, 1999, 180, 249–254.
- Van Schaik, G., Schukken, Y.H., Nielen, M., Dijkhuizen, A.A., Barkema, H.W., Benedictus, G.** Probability of and risk factors for introduction of infectious diseases into Dutch SPF dairy farms: a cohort study. *Preventive veterinary medicine.*, 2002, 54, 279–289.
- van Schaik, E. J., Samuel, J. E.** Phylogenetic diversity, virulence and comparative genomics. In *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium*. Springer, Dordrecht. 2012, 13-38.
- Vardi, M., Petersil, N., Keysary, A., Rzotkiewicz, S., Laor, A., Bitterman, H.** Immunological arousal during acute Q fever infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.*, 2011, 30, 1527–1530.
- Varela-Castro, L., Zuddas, C., Ortega, N., Serrano, E., Salinas, J., Castellà, J., Castillo-Contreras, R., Carvalho, J., Lavín, S., Mentaberre, G.** On the possible role of ticks in the eco-epidemiology of *Coxiella burnetii* in a Mediterranean ecosystem. *Ticks and tick-borne diseases.*, 2018, 9(3), 687-694.
- Vassiliades G.** contribution à la connaissance de la tique africaine : *Rhipicephalus sanguineus*. Koch, 1844., 1964, 14, 71-104.
- Vidic, B., Mihajlovic, B., Galic, M., Pavlovic, R., Bobos, S.** The finding of antibodies for *Coxiella burnetii* in cows having clinical indications of Q-fever. *Acta Veterinaria (Yugoslavia).*, 1990, 40, 27–30.
- Vilcins, I.M.E., Old, J.M., Deane, E.** Molecular detection of *Rickettsia*, *Coxiella* and *Rickettsiella* DNA in three native Australian tick species. *Experimental and Applied Acarology.*, 2009, 49(3), 229-242.
- Villari, S., Galluzzo, P., Arnone, M., Alfano, M., Geraci, F., Chiarenza, G.** Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection (Q fever) in sheep farms located in Sicily (Southern Italy) and related risk factors. *Small ruminant research*, 2018, 164, 82–86.
- Vishwanath, S., Hackstadt, T.** Lipopolysaccharide phase variation determines the complement-mediated serum susceptibility of *Coxiella burnetii*. *Infection and Immunity.*, 1988, 56(1), 40–44.
- Vodkin, M.H., Williams, J.C., Stephenson, E.H.** Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. *Microbiology.* 1986, 132, 455–463.
- Walker, J. B., Keirans, J. E., and Horak, I. G.** The genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae): a guide to the brown ticks of the World. *Tropical Animal Health and Production.*, 2000, 32, 417–418.
- Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M.** Ticks of domestic animals in Africa. A guide to identification of species. Edinburgh: Bioscience Reports., 2003. 221.
- Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G., Preston**

- P.M.** Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species. Edinburgh, Bioscience Reports., 2014, 74-217.
- Walter, S. D., Hildreth, S. W., Beaty, B. J.** Estimation of infection rates in populations of organisms using pools of variable size. American Journal of Epidemiology., 1980, 112(1), 124-128.
- Walter, M.C., Öhrman, C., Myrtenäs, K., Sjödin, A., Byström, M., Larsson, P., Macellaro, A., Forsman, M., Frangoulidis, D.** Genome sequence of *Coxiella burnetii* strain Namibia. Standards in genomic sciences., 2014, 9(1), 22.
- Wapenaar, W., Barkema, H.W., O’Handley, R.M., Bartels, C.J.** Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in bulk milk to estimate the prevalence of *Neospora caninum* on dairy farms in Prince Edward Island, Canada. The Canadian veterinary journal., 2007, 48(5), 493.
- Wardrop, N.A., Thomas, L.F., Cook, E.A.J., de Glanville, W.A., Atkinson, P.M., Wamae, C.N., Fèvre, E.M.** The Sero-epidemiology of *Coxiella burnetii* in Humans and Cattle, Western Kenya: Evidence from a Cross-Sectional Study. PLOS Neglected Tropical Diseases., 2016, 10(10), e0005032.
- Webster, J.P., Lloyd, G., Macdonald, D.W.** Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. Parasitology., 1995, 110, 31–35.
- Wentworth, B.B.** Historical review of the literature on Q fever. Bacteriology Review., 1955, 19, 129–135.
- Werede, H., Afera, B.** Prevalence of Ixodid Ticks on Bovine of Werieleke Wereda , Tigray. Acta Parasitologica Globalis., 2018, 5 (2): 146-150, 2014.
- Wielders, C.C., Wuister, A.M., de Visser, V.L., de Jager-Leclercq, M.G., Groot, C.A., Dijkstra, F., van Gageldonk-Lafeber A.B., van Leuken J.P., Wever P.C., van der Hoek W., Schneeberger, P.M.** Characteristics of hospitalized acute Q fever patients during a large epidemic, The Netherlands. PLoS One., 2014, 9(3), e91764.
- Wilde, J., Eiden, J., Yolken, R.** Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. Journal of Clinical Microbiology., 1990, 28, 1300–1307.
- Willems, H., Thiele, D., Krauss, H.** Plasmid based differentiation and detection of *Coxiella burnetii* in clinical samples. European journal of epidemiology., 1993, 9(4), 411–418.
- Willems, H., Thiele, D., Frölich-Ritter, R., Krauss, H.** Detection of *Coxiella burnetii* in cow’s milk using the polymerase chain reaction (PCR). Journal of Veterinary Medicine, Series B., 1994, 41, 580–587.
- Willems, H., Ritter, M., Jäger, C., Thiele, D.** Plasmid-homologous sequences in the chromosome of plasmidless *Coxiella burnetii* scurry Q217. Journal of Bacteriology., 1997, 179(10), 3293–3297.
- Willems, H., Jager, C., Baljer, G.** Physical and genetic map of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. Journal of Bacteriology., 1998, 180(15), 3816–3822.
- Williams, J.C.** Infectivity, virulence, and pathogenicity of *Coxiella burnetii* for various hosts. Q fever: the biology of *Coxiella burnetii*., 1991, 21–71.
- Woldehiwet, Z.** Q fever (Coxiellosis): Epidemiology and pathogenesis. e search in Veterinary Science., 2004, 77, 93–100.
- Yahiaoui, W.I., Afri-Bouzebda, F., Bouzebda, Z., Dahmani, A.** Sondage sérologique de la fièvre Q chez les ovins par la méthode ELISA et prévalence des avortements dans la région de Ksar El Boukhari (Algérie). Tropicicultura., 2013, 32(1), 22–27.

**Yohannes, G.** Review on Q fever in Small Ruminants and its Public Health Importance. Biomedical Journal of Scientific and Technical Research., 2019, 9, 1–10.

**Zhang, G. Q., Nguyen, S. V., To, H., Ogawa, M., Hotta, A., Yamaguchi, T., Kim, H. J. , Fukushi, H. , Hirai, K.** Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. Journal of clinical microbiology., 1998, 36(1), 77-80.

**Zhang, Y., Zhang, G., Hendrix, L. R., Tesh, V. L., Samuel, J. E.** *Coxiella burnetii* induces apoptosis during early stage infection via a caspase-independent pathway in human monocytic THP-1 cells. PloS one., 2012, 7(1), e30841.

**Yousfi-Monod, R., Aeschlimann, A.** Recherches sur les tiques (Acarina, Ixodidae), Parasites de Bovidés dans l'Ouest algérien: Inventaire systématique et dynamique saisonnière. Annales de parasitologie humaine et comparée., 1986, 61(3), 341-358.

# **Annexes**

### **Annexe 1 : Matériel utilisé lors de l'échantillonnage**

- Pince mouchète
- blouse, gants, bavettes et lunettes de protection
- Tubes secs Vacutainer® (Référence : 369032, Lot : 5264178).
- Tubes EDTA Vacutainer® (Référence : AF10019BB, Lot : 5264178).
- Aiguilles à prélèvement sanguin Vacutainer®.
- Porte aiguilles.
- Alcool chirurgical.
- Gants.
- Coton.
- Pots en plastique stériles pour la collecte de lait.
- Glacière avec pains de glace.
- Centrifugeuse à vitesse variable entre 1000 et 14000 T/min
- Eppendorf.
- micropipette de 1000 µl
- Marqueur indélébile
- Congélateur -20°C
- Forceps pour enlever les tiques
- Tubes stériles de 5 ml remplis d'éthanol 70% pour conserver les tiques.

### **Annexe 2 : Matériel utilisé dans les tests sérologiques ELISA**

- Pipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl et 200 µl.
- Embouts de pipette à usage unique.
- Eau distillée ou désionisée.
- Système de lavage manuel.
- Cylindres gradués.
- Bêchers.
- Portoir pour tubes.
- Réservoir à réactifs pour pipettes multicanaux.
- Couvercle.
- Marqueur indélébile
- Container pour déchets
- Microplaque de prédilution.

- Parafilm
- Mixeur vortex
- Minuteur électronique
- kit ELISA commercial « ID Screen Q Fever Indirect Multi-species Kit » (ID.vet Innovative Diagnostics, Grabels, France)
- Incubateur de microplaques ( $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).
- lecteur de plaques ELISA (BioTEK MQX200 UQuant, Winooski, 132 Vermont, USA) connecté un ordinateur piloté par le logiciel GEN 5<sup>TM</sup> version 2.00 (BioTEK, Winooski, 132 Vermont, USA).

### **Annexe 3 : Matériels, équipements, consommables et réactifs des tests moléculaires**

#### **1. Matériels et équipements**

- Bains-marie (thermomixer) (GFL)
- Plaque de travail pour tubes PCR (96 x 0.2 ml).
- Microcentrifugeuse avec rotor pour microtubes de 1.5 ml et 2 ml.
- Balance analytique (OHAUS<sup>®</sup>)
- Congélateur  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$
- Cabinet décontaminé à la lumière UV (DNA-free) pour extraction d'ADN
- Minuteur électronique
- Micropipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 10  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  et 1000  $\mu\text{l}$ .
- Ciseaux
- Microcentrifugeuse à vitesse variable entre 1000 et 14000 T/min avec rotor pour tubes eppendorf
- Mixeur vortex
- Marqueur indélébile
- Four micro-onde (PANASONIC);
- Portoirs
- Fiole Erlenmeyer
- Dispositif d'électrophorèse composé de cuve d'électrophorèse horizontale, peigne et générateur de courant électrique
- Transilluminateur à ultra-violet (UVITEC Cambridge, UK).
- Thermocycleur automatique (SimpliAmp<sup>TM</sup> Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Singapour).



- Thermocycleur 7500 Fast Real-Real PCR (Applied Biosystems®USA).
- Séquenceur

## **2. Consommables**

- Blouses, gants, bavettes et lunettes de protection à usage unique.
- Scalpels stériles.
- Bistouri à lame stérile.
- Cône de pipettes stériles avec filtre aérosol contre la contamination de 0,1µl -10 µl, 20µl, 200µl ,100µl-1000µl.
- Embouts de pipettes à usage unique.
- Tubes de microcentrifugation pour la lyse et l'élution de 2 ml.
- Tubes PCR eppendorf 0.2 ml ou 0.5 ml translucide.
- Container pour déchets contaminés
- Parafilm
- Désinfectant spray à base d'hypochlorite à 2%.
- Spatule pour enlever la crème du lait
- Coton-tige pour enlever des résidus de crème du lait collés à la paroi des tubes.
- Papier filtre stérile pour sécher les tiques.
- Scalpel stérile à usage unique pour couper les tiques.
- Tubes stériles de 10 ml pour porter les tiques.

## **3. Réactifs**

- Éthanol (96 – 100%) pour préparer les kits
- Eau distillée.
- Agarose (BioReagent, for molecular biology, low EEO, Sigma-Aldrich Roche diagnostics GmbH Allemagne)
- TAE 1X (Tris, Acétate, EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, USA)
- DNA
- Colorant du gel SYBR Safe DNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Tampon de charge (Gel Loading Buffer for NA electrophoresis, Sigma-Aldrich Roche diagnostics GmbH Allemagne).
- Marqueur de poids moléculaire (DNA Molecular Weight Marker VIII, Sigma-Aldrich Roche diagnostics GmbH Allemagne).
- kit d'extraction d'ADN DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, Hilden, Allemagne).
- kit de purification d'ADN QIAquick Spin PCR purification (Qiagen®, Hilden, Allemagne).

- kit de séquençage Big Dye Terminator (APPLIED BIOSYSTEMS<sup>®</sup>, USA)
- kit de PCR quantitative en temps réel ( VetMAX<sup>™</sup> *C. burnetii* Absolute Quant Kit, LSI, Lissieu, France).
- Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Sigma-Aldrich P3813-5X10PAK)
- Dodécylsulfate de Sodium (SDS) ( BIO-RAD 161-0301).

#### **Annexe 4 : ID Screen Q Fever Indirect Multi-species Kit (ID.vet Innovative Diagnostics, Grabels, France)**

**Code de produit : FQS –MS , N du lot : 1117, référence :C32-EXP 11/2019**

#### **Description et Principe**

Les cupules sont sensibilisées avec une souche *C. burnetii* phases I et II, isolée en France à partir du placenta d'un avortement bovin. Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les cupules. Les anticorps spécifiques de *C. burnetii*, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps.

Après lavage, un conjugué anti-multi-espèces marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les cupules. Il se fixe aux anticorps, formant un complexe antigène anticorps-conjugué HRP. Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB). La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester:

- en présence d'anticorps dans l'échantillon, il apparaît une coloration bleue qui devient jaune après blocage.
- en l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparaît pas de coloration. La lecture est réalisée à 450 nm

#### **Composants du kit**

<b>Réactifs*</b>
Microplaques sensibilisées avec un antigène en phase I et en phase II de <i>C. burnetii</i>
Conjugué Concentré (10X)
Contrôle Positif
Contrôle Négatif
Tampon de dilution 2
Tampon de dilution 3
Solution de lavage concentrée (20X)
Solution de révélation
Solution d'arrêt (0,5 M)

\* *La composition du kit est indiquée sur l'étiquette de dessus de kit.*

1. Le conjugué, les contrôles et la solution de révélation doivent être stockés à 5°C (± 3°C).

2. Les autres réactifs peuvent être stockés entre +2°C et +26°C.
3. Les composants portant la même dénomination (*solution de lavage, tampons de dilution*) peuvent être utilisés dans l'ensemble de la gamme IDvet.

### **Matériel nécessaire mais non fourni**

1. Pipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 10 µl, 100 µl et 200 µl.
2. Embouts de pipette à usage unique.
3. Lecteur de microplaques à 96 puits.
4. Eau distillée ou désionisée.
5. Système de lavage manuel ou automatique

### **Remarques et précautions d'emploi**

1. Ne pas pipeter à la bouche.
2. La solution de révélation peut être irritante pour la peau.
3. La solution d'arrêt (0,5 M) peut être nocive en cas d'ingestion et peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau (**R22-43**). Eviter le contact avec la peau (**S24-37**).
4. Ne pas exposer la solution de révélation à une lumière vive ni à des agents oxydants.
5. Décontaminer tous les réactifs avant élimination.

### **Préparation des échantillons**

Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle, puis de les transférer dans la plaque ELISA avec une pipette multicanaux.

### **Préparation de la Solution de lavage**

Si nécessaire, ramener la Solution de lavage concentrée (**20X**) à température ambiante (21°C ± 5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux. Préparer la Solution de lavage (**1X**) par dilution au 1/20<sup>ème</sup> de la Solution de lavage (**20X**) dans de l'eau distillée/désionisée.

### **Mode opératoire**

Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C ± 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au Vortex.

Les protocoles présentés sont protocole sérum ou plasma.

1. les échantillons sont testés à une dilution finale de 1 : 50 comme suit:

- a) Dans une microplaque de prédilution à 96 puits, ajouter
  - 245 µl de Tampon de dilution 2 dans chaque puits.
  - 5 µl de **Contrôle négatif** dans les puits A1 et B1.
  - 5 µl de **Contrôle positif** dans les puits C1 et D1.
  - 5 µl de chaque échantillon à tester dans les puits restants.
- b) Dans une microplaque ELISA, transférer:
  - 100 µl de **Contrôle négatif** pré-dilué dans les puits A1 et B1.
  - 100 µl de **Contrôle positif** pré-dilué dans les puits C1 et D1.
  - 100 µl de chaque échantillon pré-dilué à tester dans les puits restants.
2. Couvrir la plaque et Incuber **45 min ± 4 min** à 21°C (± 5°C).
3. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de **Solution de lavage**. Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
4. Préparer le **Conjugué 1X** en diluant le **Conjugué 10X** au 1/10ème en **Tampon de dilution 3**.
5. Distribuer 100 µl de **Conjugué 1X** dans chaque cupule.
6. Incuber **30 min ± 3 min** à 21°C (± 5°C).
7. Vider les puits. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300 µl de **Solution de lavage**.
8. Distribuer 100 µl de **Solution de révélation** dans chaque cupule.
9. Incuber **15 min ± 2 min** à 21°C (± 5°C) à l'obscurité.
10. Distribuer 100 µl de **Solution d'arrêt** dans chaque cupule pour arrêter la réaction.
11. Mesurer et enregistrer les densités optiques à 450 nm.

### Validation: échantillons sérum

Le test est validé si: la valeur moyenne de densité optique des Contrôles Positifs ( $DO_{CP}$ ) est supérieure à 0.350.  **$DO_{CP} > 0.350$**

le rapport entre la moyenne des Contrôles Positifs ( $DO_{CP}$ ) et la moyenne des Contrôles Négatifs ( $DO_{CN}$ ) est supérieur à 3.  **$DO_{CP} / DO_{CN} > 3$**

### Interprétation

Pour chaque échantillon, calculer le pourcentage S/P:

$$DO \text{ échantillon S/P \%} = \frac{DO \text{ échantillon} - DONC}{DO_{CP} - DONC} \times 100$$

**Pour sérum ou plasma caprin, ovin et bovin**

SERUMS	
Résultat	Statut
S/P % ≤ 40%	NEGATIF
40% < S/P % ≤ 50%	DOUTEUX
50% < S/P % ≤ 80%	POSITIF
S/P % > 80%	FORTEMENT POSITIF

**Annexe 5 : PrioCHECK™ Ruminant QFever Ab Plate Kit (LSI, Lissieu, France)**

Test immunoenzymatique de détection spécifique des anticorps anti- *C. burnetii* dans le sérum et le lait de ruminant.

Références Catalogue ELISACOXLS2, ELISACOXLS5

Partie N° 100020257 Pub. N° MAN0007465 Rév. A.0

Technique	Espèce	Matrice	Test	Protocole
ELISA indirect monocupule - Plaques sécables	Bovin	Sérum	Individuel	Incubation courte
	Ovin Caprin	Lait	Individuel de mélange	Incubation longue

**⚠ AVERTISSEMENT!** Lire les fiches de données de sécurité (FDS) et suivre les consignes de manipulation. Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés. Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

**⚠ AVERTISSEMENT! RISQUES BIOLOGIQUES POTENTIELS.** Lire les informations de sécurité relatives aux risques biologiques du produit disponibles sur [thermofisher.com](http://thermofisher.com). Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés.

**Informations générales**

L'antigène utilisé dans le Applied Biosystems™ PrioCHECK™ Ruminant Q Fever Ab Plate Kit a été isolé par l'INRA de Nouzilly à partir de ruminants domestiques (antigène phase I et II). C'est une souche ovine responsable d'avortements chez les ovins. Les validations réalisées par l'INRA et en interne par nos équipes démontrent que PrioCHECK™ Ruminant Q Fever Ab Plate Kit présente une sensibilité améliorée par rapport aux kits ELISA « Nine Mile » pour la détection des animaux excréteurs de *C. burnetii*.

## Principe du test

Le test est basé sur le principe d'un **ELISA indirect**.

1. Les échantillons et les contrôles sont déposés dans la plaque sensibilisée avec de l'antigène *C. burnetii*. Les anticorps spécifiques anti-*C. burnetii* éventuellement présents se lient à l'antigène.
2. Après lavage, un conjugué protéine G marqué à la peroxydase est ajouté et se fixe sur les anticorps préalablement fixés sur les microcupules.
3. Le conjugué non fixé est éliminé par lavage avant addition d'un substrat chromogène. L'apparition d'une coloration bleue est la conséquence de l'oxydation du substrat par la peroxydase du conjugué.
4. Après arrêt de la réaction, la coloration devient jaune. La lecture des résultats est réalisée par un lecteur de plaques ELISA.

**L'apparition d'une coloration jaune indique un échantillon positif. La coloration de chaque puits est proportionnelle au taux d'anticorps spécifiques présent dans l'échantillon.**

## Réactifs du kit et conservation

Composant	Description	ELISACOXL S2 (192 tests)	ELISACOXL S5 (480 tests)	Conservation
1-Coated microplate Q Fever	Plaque sensibilisée Fièvre Q, 12 barrettes de 8 cupules	2 unités	5 unités	5±3°C <sup>(1)</sup>
2a - Serum Negative C. Q Fever	Contrôle négatif sérum Fièvre Q (NC)	250 µL	600 µL	5±3°C
2b - Milk Negative C. Q Fever	Contrôle négatif lait Fièvre Q (NC)	5 mL	12 mL	
3 - Positive C. Q Fever	Contrôle positif Fièvre Q (PC)	250 µL	600 µL	
4-Conjugate (100x) Q Fever	Conjugué (100x) Fièvre Q (rouge), protéine GHRP concentrée 100 fois	500 µL	900 µL	5±3°C <sup>(2)</sup>
A - Wash (10x)	Solution de lavage, 10 fois concentrée	125 mL	250 mL	5±3°C
B1 - Sample DB Q Fever	Diluant échantillon Fièvre Q (vert)	120 mL	250 mL	
B2-Conjugate DB Q Fever	Diluant conjugué Fièvre Q	50 mL	100 mL	
C - Substrate	Solution Substrat	24 mL	60 mL	
D - Stop	Solution d'arrêt	24 mL	60 mL	
Adhésifs de plaques		4	10	TA <sup>(3)</sup>

(1). Les barrettes non utilisées peuvent être stockées dans le sachet fermé avec dessicant (fournis dans le kit) à 5±3°C jusqu'à la date de péremption du kit.

(2). La solution de conjugué diluée est à utiliser immédiatement après préparation.

(3). Température ambiante.

## Matériel et réactifs requis pour l'analyse non fournis dans le kit

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur [thermofisher.com](http://thermofisher.com).

Eau distillée ou déionisée	Micropipettes monocanales et multicanaux
Plaques de prédilution	Réservoirs à usage unique
Incubateur de microplaque (37±2°C)	Lecteur ELISA équipé d'un filtre à 450 nm ou de
Embouts de pipette à usage unique	filtres à 450 et 620 nm

### Précautions d'emploi

- Ne pas mélanger des réactifs provenant de différents lots de kits.
- Eviter la contamination des réactifs en utilisant du matériel de prélèvement à usage unique.
- Ne pas pipeter les réactifs avec la bouche.

### Préparation des échantillons

**Sérum** : des sérums individuels frais, réfrigérés (8 jours à 5±3°C) ou congelés (1 an à < 16°C) sont utilisables. Les échantillons et les contrôles préalablement homogénéisés sont testés dilués au **1:400**.

**Lait** : des laits (individuels ou de mélange) frais, réfrigérés (8 jours à 5±3°C) ou congelés (1 an à < -16°C) sont utilisables avec ou sans ajout de conservateur. Les échantillons et les contrôles préalablement homogénéisés sont testés dilués au **1:20**.

NOTE : Il est fortement conseillé d'utiliser un traceur interne pour chaque manipulation.

Une référence interne (Réf. : RFQS) est disponible pour l'application sérum ou lait.

### Préparation des réactifs

- Les réactifs **1 - Coated microplate Q Fever, B1 - Sample DB Q Fever, B2 Conjugate DB Q Fever, C - Substrate et D - Stop** sont prêts à l'emploi.
- Les réactifs **2a - Serum Negative C. Q Fever, 2b - Milk Negative C. Q Fever et 3 - Positive C. Q Fever** (pour l'application sérum seulement) sont à tester comme les échantillons.
- **Milk Positive Control Q Fever** : Le Milk Positive Control Q Fever est préparé à partir d'une solution au **1:20** du réactif **3 - Positive C. Q Fever**.  
Exemple : 10 µL du réactif **3 - Positive C. Q Fever** + 190 µL du réactif **2b - Milk Negative C. Q Fever**. Mélanger après dilution. La solution **Milk Positive Control Q**

**Fever** est à utiliser **immédiatement** après préparation et à tester comme un échantillon.

- La solution de lavage **A - Wash (10x)** est à diluer au **1:10 dans de l'eau distillée /déionisée**. Exemple : pour une barrette : 2 mL de solution **A - Wash (10x)** dans 18 mL d'eau, pour une plaque : 25 mL de solution **A - Wash (10x)** dans 225 mL d'eau. Mélanger après dilution. La solution **Wash diluée** peut être conservée 1 mois à  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

**NOTE:** Du fait d'une forte concentration en sels, des cristaux peuvent se former dans la solution **A - Wash (10x)**. Les cristaux peuvent être dissous sous agitation. Il est recommandé d'homogénéiser la solution avant dilution.

- Le réactif **4 - Conjugate (100x) Q Fever** est à diluer au **1:100** dans le réactif **B2 - Conjugate DB Q Fever**. Mélanger après dilution. La **solution Conjugate Q Fever diluée** est à utiliser **immédiatement** après préparation.

### Réalisation du test ELISA

**NOTE:** Porter les réactifs à température ambiante ( $21\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) avant la réalisation du test. La zone de tolérance des temps d'incubation est de  $\pm 10\%$ . Il est recommandé d'utiliser des réservoirs à usage unique pour la distribution des composants.

1. Distribution des contrôles et des échantillons Sérum: les échantillons et les contrôles sérums sont testés dilués au 1:400 en B1 - Sample DB Q Fever:

A. Dans une plaque de prédilution, prédiluer les sérums à analyser et les contrôles au 1:20 en B1 - Sample DB Q Fever:

- Déposer **5  $\mu\text{L}$  de chaque sérum** sur la plaque de prédilution. Conserver le même ordre que celui qui sera utilisé sur la plaque sensibilisée.
- Ajouter ensuite **95  $\mu\text{L}$  du réactif B1 - Sample DB Q Fever** dans les cupules contenant les contrôles et les échantillons. Agiter doucement la plaque.
- Laisser les sérums dilués s'équilibrer dans le réactif **B1 - Sample DB Q Fever** à température ambiante pendant 5 minutes avant le transfert dans la plaque sensibilisée.

**NOTE:** Les sérums prédilués peuvent être conservés 24 heures à  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ .

B. Pour obtenir la dilution finale des sérums au 1:400, réaliser une 2<sup>ème</sup> dilution au 1:20 en B1 - Sample DB Q Fever dans la plaque sensibilisée :

- Déposer **5  $\mu\text{L}$  du réactif 2a - Serum Negative C. Q Fever pré-dilué au 1:20** dans les cupules A1 et B1 (par exemple).
- Déposer **5  $\mu\text{L}$  du réactif 3 - Positive C. Q Fever pré-dilué au 1:20** dans les cupules C1 et



D1 (par exemple).

- Déposer **5 µL d'échantillon pré-dilué au 1:20** dans les cupules suivantes.
- Distribuer **95 µL du réactif B1 - Sample DB Q Fever** dans les cupules contenant les contrôles et les échantillons.

Agiter doucement et couvrir la plaque à l'aide d'un adhésif de plaque. **Incuber la plaque 1 heure à 37±2°C.**

Lait : les échantillons et les contrôles laits sont testés dilués au 1:20 en B1 - Sample DB Q Fever :

- Déposer **5 µL** du réactif **2b - Milk Negative C. Q Fever** dans les cupules A1 et B1 (par exemple).
- Déposer **5 µL** de la solution **Milk Positive Control Q Fever** (voir "Préparation des réactifs") dans les cupules C1 et D1 (par exemple).
- Déposer **5 µL de lait à analyser** dans les cupules suivantes.
- Distribuer **95 µL du réactif B1 - Sample DB Q Fever** dans les cupules contenant les contrôles et les échantillons.

Agiter doucement et couvrir la plaque à l'aide d'un adhésif de plaque. **Incuber la plaque 1 nuit (16 à 18h) à 5±3°C.**

### Lavages

Vider la plaque et réaliser **3 lavages** avec la solution Wash diluée (voir "Préparation des réactifs") à raison de 300 µL par cupule. Vider et tapoter la plaque sur un papier absorbant pour éliminer toute trace de liquide. Les lavages sont réalisables, au choix, manuellement ou au laveur automatique. Ne pas laisser sécher les plaques.

### Conjugué

Distribuer **100 µL de solution Conjugate Q Fever diluée** (voir "Préparation des réactifs") dans chaque cupule. Agiter doucement et couvrir la plaque à l'aide d'un nouvel adhésif de plaque. **Incuber la plaque 1 heure à 37±2°C.**

### Lavages

Réitérer l'étape LAVAGES définie précédemment.

### Révélation

Distribuer **100 µL de solution C - Substrate** dans chaque cupule. Agiter doucement la plaque (2 secondes). Incuber **10 minutes à température ambiante (21±4°C) et à l'obscurité.** Ne pas couvrir la plaque.

Distribuer **100 µL de solution D - Stop** dans chaque cupule et dans le même ordre que la solution C - Substrate. Agiter doucement la plaque (2 secondes).

### Lecture

Essuyer le dessous des plaques, avec un chiffon doux pour éliminer d'éventuelles poussières. Lire la plaque au maximum 30 minutes après l'arrêt de la réaction, à **450 nm** en monochromatisme ou à **450–620 nm** en bichromatisme.

### Calcul des résultats

Calculer la DO moyenne du **PC** ( $DO_{mPC}$ ), et celle du **NC** ( $DO_{mNC}$ ).

Pour chaque échantillon, calculer le ratio Echantillon/Positif (E/P) :

$$E/P = (DO_{Ech} - DO_{mNC}) / (DO_{mPC} - DO_{mNC})$$

$$\text{Titre} = E/P \times 100$$

NOTE: Pour les échantillons négatifs, il est possible d'obtenir des E/P négatifs.

### Validation du test

Le test est validé si :

$$DO_{mPC} > 0.400 \text{ et } DO_{mPC} / DO_{mNC} > 2$$

### Interprétation des résultats

**Tableau 1** Sérum

Résultats	Interprétation
Titre $\leq$ 40	Négatif
40 < Titre $\leq$ 100	Positif +
100 < Titre $\leq$ 200	Positif ++
200 < Titre $\leq$ 300	Positif +++
Titre > 300	Positif ++++

**Tableau 2** Lait individuel

Résultats	Interprétation
Titre $\leq$ 40	Négatif
40 < Titre $\leq$ 100	Positif +
100 < Titre $\leq$ 200	Positif ++
Titre > 200	Positif +++

**Tableau 3** Lait de mélange

Résultats	Interprétation
Titre ≤ 30	Négatif
30 < Titre ≤ 100	Positif +
100 < Titre ≤ 200	Positif ++
Titre > 200	Positif +++

**Annexe 6 : kit de PCR en temps réel (Applied Biosystems™ VetMAX™ *Coxiella burnetii* Absolute Quant Kit, Qiagen, Allemagne).**

PCR temps réel TaqMan® pour la détection et la quantification de *C. burnetii*, bactérie responsable de la fièvre Q

**Référence Catalogue FQPAQ** Partie N° 100020366 Pub. N° MAN0007807 Rév. B.0

Technique	Espèce(s)	Acides nucléiques isolés à partir des matrices	Test
PCR temps réel (ADN) – Duplex – IPC endogène	Bovins Petits ruminants (ovins, caprins)	Ecouvillons (cervicaux, vaginaux et placentaires) Lait Mucus vaginal Liquide fœtal Organes (placenta ou tissu fœtal)	Individuel Mélange de 3 prélèvements (dépendant des matrices)

**AVERTISSEMENT !** Lire les fiches de données de sécurité (FDS) et suivre les consignes de manipulation. Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés. Les fiches de données de sécurité (FDS) sont disponibles à l'adresse [thermofisher.com/support](http://thermofisher.com/support).

**AVERTISSEMENT ! RISQUES BIOLOGIQUES POTENTIELS.** Lire les informations de sécurité relatives aux risques biologiques du produit disponibles sur [thermofisher.com](http://thermofisher.com). Porter des lunettes de sécurité, des gants et des vêtements appropriés.

### Informations sur le produit

#### Description du produit

La fièvre Q (Query fever) est une zoonose due à *C. burnetii*, une bactérie strictement intracellulaire, qui peut infecter de très nombreuses espèces animales ainsi que l'homme. Chez les ruminants, cette maladie est principalement associée à l'apparition de troubles de la

reproduction. *C. burnetii* cause prématurité, faible poids à la naissance et avortements. **Applied Biosystems™ VetMAX™ *C. burnetii* Absolute Quant Kit** est un outil de diagnostic moléculaire de la fièvre Q. Il permet la détection spécifique de la bactérie *C. burnetii* par la technique de PCR en temps réel. Il peut être utilisé en application qualitative (présence ou absence de la bactérie) ou quantitative absolue (concentration en bactérie par unité d'échantillon).

Chaque échantillon d'ADN obtenu après extraction est analysé en monocupule : la même cupule est utilisée pour la détection spécifique de l'ADN bactérien de *C. burnetii* et pour la détection d'un IPC (Internal Positive Control). La positivité de l'IPC traduit à la fois l'efficacité de l'extraction et l'absence d'inhibiteur dans les échantillons.

Il est utilisable sur ADN bactériens extraits à partir d'écouvillons (cervicaux, vaginaux et placentaires), de lait, de mucus vaginal, de liquide fœtal ou d'organes (placenta ou tissu fœtal). Pour les écouvillons uniquement, l'analyse peut être effectuée en mélange de 3 échantillons. Les protocoles complets d'extractions des ADN à partir de ces matrices sont disponibles sur demande au Support Technique.

**Réactifs du kit et conservation VetMAX™ *C. burnetii* Absolute Quant Kit** se présente sous la forme d'un coffret regroupant les différents composants. À réception, le kit doit être conservé dans sa totalité entre  $-30^{\circ}\text{C}$  et  $-10^{\circ}\text{C}$ . Après décongélation à la première utilisation, suivre les recommandations de conservation du tableau suivant pour chaque composant :

Composant	Description	Volume (100 réactions)	Conservation	
			A réception	Après première utilisation
<b>3 - Mix Cox b (tubes vert)</b>	Mix pour PCR TaqMan®. Il contient : • Le système de détection pour la cible <i>C. burnetii</i> : primers forward et reverse, ainsi qu'une sonde TaqMan® marquée FAM™ - TAMRA™. • Le système de détection pour l'IPC : primers forward et reverse, ainsi qu'une sonde TaqMan® marquée VIC™ - NFQ (NFQ = Non-Fluorescent Quencher). • Le buffer et l'enzyme de PCR, ainsi que de l'Uracil N-Glycosylase	2 × 1000 µL	$-30^{\circ}\text{C}$ à $-10^{\circ}\text{C}$	$+2^{\circ}\text{C}$ à $+8^{\circ}\text{C}$ 4
4. b - Standard PC. Cox b. (1) (Tube marron)	Le standard de quantification <i>C. burnetii</i> du kit. Il s'agit d'ADN plasmidique prêt à être dilué pour constituer la gamme standard de quantification. Son utilisation permet de quantifier de façon absolue l'échantillon inconnu	. 100 µL	$-30^{\circ}\text{C}$ à $-10^{\circ}\text{C}$	$-30^{\circ}\text{C}$ à $-10^{\circ}\text{C}$

- (1) Le tube de 4b - Standard PC. Cox b. est à utiliser avec précaution, sa forte concentration en ADN cible peut être source de contamination.

### **Témoins d'extraction et d'amplification**

**VetMAX™ *C. burnetii* Absolute Quant Kit** contient 1 témoin permettant la validation de l'amplification des ADN bactériens et la quantification des échantillons :

4b - Standard PC. Cox b. : contrôle positif quantifié en *C. burnetii*

Contrôle positif déjà extrait à amplifier lors de la PCR temps réel. Un résultat positif compris dans l'intervalle accepté de Ct est utilisé pour valider l'amplification de la cible *C. burnetii* par PCR temps réel.

Ce standard est quantifié à  $3.00 \times 10^7$  copies GE/mL. La dilution du standard en gamme puis l'amplification de cette gamme lors de la PCR temps réel permet la quantification des échantillons.

La validation de l'extraction des acides nucléiques pour chaque échantillon s'effectue grâce à la détection d'un IPC endogène (Internal Positive Control), présent dans chaque échantillon. Un résultat IPC positif avec une valeur conforme dans un échantillon permet de valider l'extraction de cet échantillon qu'il soit positif ou négatif pour le pathogène recherché : élimination des faux négatifs et vérification de l'effet des inhibiteurs.

### **Il est recommandé de réaliser deux contrôles négatifs pour valider le bon déroulement de l'analyse :**

#### **NCS : contrôle négatif d'extraction**

C'est un témoin composé des réactifs utilisés lors de l'extraction, sans ajout d'échantillon (il peut être remplacé par le tampon utilisé lors de la préparation des échantillons ou par de l'eau DNase/RNase-free), qui subit le même traitement que les échantillons extraction des acides nucléiques puis PCR temps réel.

Un résultat négatif en *C. burnetii* et en IPC permet de valider l'absence de contamination au cours l'extraction et la PCR temps réel.

#### **NC : contrôle négatif d'amplification**

Ce témoin consiste de 20 µL du mix de PCR temps réel et de 5 µL d'eau DNase/RNase-free subissant la PCR temps réel.

Un résultat négatif pour toutes les cibles (*C. burnetii* et IPC) permet de valider l'absence de contamination au cours de la préparation des réactions pour la PCR

### **Matériel et réactifs requis pour la PCR temps réel non fournis dans le kit**

Sauf indication contraire, tous les produits sont disponibles sur thermofisher.com.

- Micropipettes de précision (gamme de 1 µL à 1000 µL) avec pointes DNase/RNase-free à filtre
- Eau DNase/RNase-free
- Tampon TE 1X
- Tampon PBS 1X
- Un thermocycleur de PCR temps réel capable de détecter les fluorophores suivants :
  - FAM™ (maximum d'émission : λ515 nm)
  - VIC™ (maximum d'émission : λ554 nm)
- Consommables de qualité optique compatible avec le thermocycleur utilisé :
  - Plaques PCR 96 puits, barrettes PCR (8 ou 12 puits), microtubes ou capillaires
  - Films ou bouchons adaptés à la fermeture

### Procédure d'analyse

Le volume réactionnel de la PCR temps réel est de 25 µL :

- **3 - Mix Cox b.** : 20 µL par analyse
- **ADN extrait** : 5 µL par analyse

Pour une application quantitative : préparer la gamme de quantification à partir de **4b - Standard PC. Cox b.**

### Extraction des ADNs

Il est nécessaire d'isoler les ADNs à partir des échantillons pour l'analyse par PCR temps réel. Pour faciliter la quantification des échantillons non liquides, il est recommandé de travailler à partir d'éluât d'écouvillon ou de surnageant de broyat d'organe réalisés dans 1 mL de PBS 1X.

NOTE : Pour connaître des méthodes d'extractions compatibles et validées avec VetMAX™ *C. burnetii* Absolute Quant Kit, merci de contacter le Support Technique.

### Préparation de la gamme de quantification

Prendre les mesures de précaution adaptées lors de la réalisation de cette étape pour éviter la contamination du mix de PCR temps réel **3 - Mix Cox b.**

Diluer en cascade au 1:10 l'ADN de **4b - Standard PC. Cox b.**, préférentiellement en tampon TE 1X pour une meilleure conservation (ou en eau DNase/RNase-free), pour constituer les 5 points de la gamme :

Point de la gamme	Concentration	Réalisation du point de gamme
Point 1 (Standard PC. Cox b.10-1)	$3.00 \times 10^6$ copies GE(2)/mL	20 $\mu$ L de 4b - Standard PC. Cox b. + 180 $\mu$ L de TE 1X
Point 2 (Standard PC. Cox b.10-2) = EPC Cox b.(1)	$3.00 \times 10^5$ copies GE/mL	20 $\mu$ L de Standard PC. Cox b. 10-1 + 180 $\mu$ L de TE 1X
Point 3 (Standard PC. Cox b.10-3)	$3.00 \times 10^4$ copies GE/mL	20 $\mu$ L de Standard PC. Cox b. 10-2 + 180 $\mu$ L de TE 1X
Point 4 (Standard PC. Cox b.10-4)	$3.00 \times 10^3$ copies GE/mL	20 $\mu$ L de Standard PC. Cox b. 10-3 + 180 $\mu$ L de TE 1X
Point 5 (Standard PC. Cox b.10-5)	$3.00 \times 10^2$ copies GE/mL	20 $\mu$ L de Standard PC. Cox b. 10-4 + 180 $\mu$ L de TE 1X
Facteur de dilution en cascade : 1:10		

(1) Dans le cas d'application qualitative, il n'est pas nécessaire de déposer l'intégralité de la gamme de quantification. Un unique point de dilution de cette gamme

sera utilisé comme contrôle d'amplification : l'EPC Cox b. (=ADN standard Cox b.  $3.00 \times 10^5$

(2) Génome Equivalent.

Aliquoter les ADN standards sous 30  $\mu$ L et les stocker à en dessous de  $-16^\circ\text{C}$  pendant la durée de conservation du kit. Il est conseillé de ne pas effectuer plus de 3 cycles de congélation/décongélation des ADN standards.

### Préparation de la PCR temps réel

1. Créer un plan d'analyse pour la distribution des mix et échantillons. Éloigner si possible la gamme de quantification ou l'EPC des autres échantillons.
2. Homogénéiser le tube **3 - Mix Cox b.** par agitation douce, puis centrifuger brièvement.
3. Distribuer **20  $\mu$ L** de **3 - Mix Cox b.** par puits de la plaque PCR, barrette PCR ou capillaire utilisé.
4. Ajouter les ADN des échantillons et contrôles à chaque mix réactionnel, selon le plan d'analyse prédéfini :

Type d'analyse	Composant	Volume d'échantillon
Echantillon pour analyse	ADN extraits de l'échantillon	5 $\mu$ L
Gamme de quantification	Gamme de dilutions de 4b - Standard PC. Cox b.	5 $\mu$ L
Contrôle positif d'amplification(1)	EPC Cox b. (= standard PC. Cox b. 10-2)	5 $\mu$ L
Contrôle négatif d'extraction (NCS)	NCS extrait	5 $\mu$ L
Contrôle négatif d'amplification (NC)	Eau DNase/RNase-free	5 $\mu$ L

(1) Ce point remplace la gamme de quantification pour les applications qualitatives.

5. Fermer la plaque PCR, les barrettes PCR ou les capillaires avec un film adhésif ou des bouchons adaptés.

### Amplification par PCR en temps réel

1. Créer les détecteurs suivants sur le thermocycleur :

Reporter	Quencher	
COXB ( <i>C.burnetii</i> )	FAM <sup>TM</sup>	TAMRA <sup>TM</sup> (1)
IPC COXB	VIC <sup>TM</sup>	NFQ (Non-Fluorescent Quencher)
Référence passive : ROX <sup>TM</sup> (1)		

(1) Les fluorophores TAMRA™ et ROX™ sont à renseigner obligatoirement pour l'analyse par PCR temps réel si le thermocycleur est capable de les détecter.

Pour les autres thermocycleurs, l'absence de détection de ces fluorophores ne remet pas en cause l'analyse par PCR temps réel.

2. Attribuer pour chaque échantillon le détecteur **COXB** et le détecteur **IPC COXB** dans le puits utilisé pour l'analyse.

3. Attribuer les valeurs de quantification (copies/mL) à chaque point de la gamme de quantification.

4. Créer le programme de PCR temps réel suivant pour l'analyse :

Répétitions de l'étape	Température	Durée	
Etape 1	×1	50°C	2 minutes (02'00")
Etape 2	×1	95°C	10 minutes (10'00")
Etape 3	×45	95°C	15 secondes (00'15")
60°C(1)	1 minute (01'00")		

(1) Collecte des données de fluorescence durant la phase 60°C – 1 minute

5. Placer la plaque PCR, les barrettes PCR ou les capillaires dans le thermocycleur et démarrer la PCR temps réel

### Analyse des résultats

Analyse des données brutes

Se référer aux recommandations du fournisseur du thermocycleur pour l'analyse des données brutes.

1. Placer les lignes seuils (threshold) de manière indépendante pour chaque cible de la PCR temps réel.

2. Interpréter les résultats en fonction des valeurs de Ct des échantillons pour chaque détecteur selon les recommandations ci-après.

Validation du test

Validation des tests qualitatifs

La validation du test qualitatif passe par l'acceptation des critères suivants :

Détecteur COXB	Détecteur IPC COXB	Validation	
EPC Cox b.	$Ct = Ct_{QC\ COXB\ de\ Standard\ PC.\ Cox\ b.10-2} \pm 3Ct(1)$	$Ct < 45$ ou $Ct > 45(2)$	PCR validée
NCS	$Ct > 45$	$Ct > 45$	Phase d'extraction validée (absence de contamination)
NC	$Ct > 45$	$Ct > 45$	Réactifs PCR validés (absence de contamination)

(1) Se référer aux valeurs indiquées dans le paragraphe 2.1 « EPC » du Certificat d'Analyse du lot utilisé pour l'essai.

(2) La valeur d'IPC dans l'EPC n'est pas à prendre en compte pour la validation du test.



## Critères complémentaires de validation des tests quantitatifs

Si non effectué auparavant, sur le logiciel de PCR temps réel du thermocycleur, attribuer les valeurs de quantification (copies/mL) à chaque point de la gamme de quantification. La validation du test quantitatif passe par l'acceptation des critères suivants, **en plus des critères de validation des tests qualitatifs** :

	Détecteur COXB	Efficacité PCR	Coefficient de corrélation R2	Interprétation
Gamme de standard de quantification	Au moins 4 points de la gamme sur 5 validés selon les conditions : Ct = Ct QC COXB de Standard PC. Cox b. $\pm 3Ct_{(1)}$	Comprise entre 85% et 115%	R2 > 0.980	Gamme de quantification validée

- (1) Se référer aux valeurs des différents points de gamme indiquées dans le paragraphe 2.1 « EPC » du Certificat d'Analyse associé au lot utilisé pour l'essai. Possibilité d'éliminer un point aberrant à l'intérieur de la gamme, mais pas aux bornes.

## Interprétation des résultats

### Application qualitative

Pour chaque échantillon analysé, interpréter les résultats comme décrit ci-dessous :

Détecteur COXB	Détecteur IPC COXB	Interprétation
Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45	<i>C. burnetii</i> détectée
Ct > 45	Ct < 45	<i>C. burnetii</i> non détectée
Ct > 45	Ct > 45	Non validé

### Application quantitative

Calcul de la concentration dans l'extrait d'ADN

**Pour la quantification absolue d'un extrait d'ADN dans lequel la cible *Coxiella burnetii* a été détectée :**

1. S'assurer que la gamme de quantification est validée.
2. Utiliser le logiciel de PCR temps réel afin de calculer pour chaque échantillon la quantité de cible *C. burnetii* grâce aux valeurs de la gamme de quantification.

Calcul de la concentration dans l'échantillon liquide avant purification des acides nucléiques. Le calcul s'effectue à partir de la quantification de l'extrait d'ADN obtenu lors de la PCR (en copies/mL), le **volume de prise d'essai pour l'extraction (PE)** exprimée en  $\mu\text{L}$  et le **volume d'élution (VE)** de la méthode d'extraction exprimé en  $\mu\text{L}$  :

**Quantification échantillon liquide (copies *C. burnetii* / mL) =** Quantification PCR (copies/mL)  $\times$  [VE ( $\mu\text{L}$ ) / PE ( $\mu\text{L}$ )]

Calcul de la quantification des organes à partir de la quantification du surnageant d'organe broyé.

Quantification par mg d'organe en fonction de la **quantification du surnageant d'organe**

**broyé** (copies/mL), du volume de **tampon utilisé pour le broyage (VB)** en mL et **de la quantité de prélèvement (PR)** en mg :

**Quantification organe (copies *C. burnetii* / mg)** = Quantification surnageant organe broyé (copies/mL) × [VB (mL) / PR (mg)]

### **Conduite à tenir pour les échantillons non validés**

Pour la suite des analyses telle que décrite ci-dessous, il est important lors du calcul de la quantification des échantillons de prendre en compte les facteurs de dilution appliqués au cours du processus.

- 1.** Diluer l'ADN de l'échantillon non valide comme indiqué : dilution de l'ADN au 1:10 en tampon TE 1X.
- 2.** Faire une nouvelle analyse PCR temps réel sur 5 µL de cette dilution.
- 3.** Si l'ADN dilué est positif en *C. burnetii* ou négatif en *C. burnetii* avec un résultat IPC conforme, le résultat obtenu est alors validé.
- 4.** Si l'ADN dilué est négatif en *C. burnetii* avec un résultat IPC non conforme, le résultat obtenu est toujours non valide. Dans ce cas, renouveler l'extraction de l'échantillon en le pré-diluant au 1:10 dans du tampon PBS 1X avant extraction.
- 5.** Si le résultat est toujours non validé, répéter l'analyse sur un nouveau prélèvement.

# **Publication scientifique**



# Seroprevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* infection in cattle in northeast Algeria

Salah Eddine Menadi<sup>1</sup> · Alessandra Mura<sup>2</sup> · Cinzia Santucci<sup>2</sup> · Farida Ghalmi<sup>1</sup> · Fella Hafsi<sup>1</sup> · Giovanna Masala<sup>2</sup>

Received: 16 June 2019 / Accepted: 11 September 2019  
© Springer Nature B.V. 2019

## Abstract

A cross-sectional study was conducted to determine the seroprevalence and the risk factors associated with *C. burnetii* infection in cattle in the state of Setif in northeastern Algeria from March 2016 to April 2018. A total of 678 cows animals aged at least 24 months and belonging to 90 herds were randomly selected. A serum sample from each cow was tested for antibodies against *C. burnetii* using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A structured questionnaire focusing on risk factors for *C. burnetii* infection was administered to farm owners involved in the study. The individual animal prevalence was 11.36% (77/678) (95%CI 8.97–13.75%), the herd prevalence was 45.56% (41/90) (95%CI 35.27–55.84%), and the within-herd prevalence ranged from 9.09 to 57.14% (mean 23.71%; Q1 11.11%, Q2 or median 20%, Q3 30%). Multivariable logistic regression analysis revealed that contact with other herds (odds ratio (OR) 1.95, 95 CI 1.12–3.42) and purchased animals (OR 2.05, 95 CI 1.14–3.68) was identified as risk factors for seropositivity to *C. burnetii*, while the use of disinfectants (OR 0.32, 95 CI 0.14–0.72) was identified as protective factor. The results from the present study indicate that *C. burnetii* is circulating into cattle herds in the region of Setif in Northeastern of Algeria. It is recommended to implement good hygienic practices and measures of biosecurity to reduce the spread of infection between cattle herds and possible exposure of humans.

**Keywords** *Coxiella burnetii* · Cows · Seroprevalence · Risk factors · ELISA · Setif

## Introduction

Q fever in humans or coxiellosis in animals is a ubiquitous worldwide zoonosis with the exception of New Zealand. The causal agent is *Coxiella burnetii*, which is a Gram-negative obligate intracellular bacterium, belonging to Coxiellaceae family, order Legionellales of the gamma subdivision of Proteobacteria (Bielawska-Drózd et al. 2013).

*C. burnetii* can infect a wide range of animals, including mammalian and non-mammalian animals (Parker et al. 2006). Domestic ruminants are recognized as the primary reservoirs of *C. burnetii* for human infection (Kirkan et al. 2008; Roest

et al. 2011; Alvarez et al. 2012), which shed the bacteria mainly with birth products, vaginal discharges, urine, milk, and feces (Guatteo et al. 2006, 2007; Rousset et al. 2009; Angelakis and Raoult 2010; EFSA 2010). *C. burnetii* transmits mainly to humans or animals through inhalation of infected aerosols or dust, while its oral transmission remains controversial (Porter et al. 2011). Furthermore, ticks play a role in the maintenance of *C. burnetii* infection among wildlife and in the transmission of *C. burnetii* from wildlife to domestic ruminants (EFSA 2010). However, its role in transmission of Q fever to humans is rarely documented (Porter et al. 2011). The infection is mostly asymptomatic in ruminants. However, during clinical expression, it is mainly manifested by reproductive disorders including abortion, stillbirth, premature delivery, and delivery of weak offspring, particularly in small ruminants, as well as, infertility, metritis, and mastitis in cattle (Agerholm 2013; Porter et al. 2011). In humans, Q fever can be asymptomatic, as an acute form with fever, atypical pneumonia, and hepatitis, or it can progress to chronic form with long-term sequelae including fatigue, abortion, and heart disease (Vanderburg et al. 2014; Wielders et al. 2014).

✉ Salah Eddine Menadi  
s.menadi@etud.ensv.dz

<sup>1</sup> Research Laboratory Management of Local Animal Resources, Higher National Veterinary School “RABIE BOUCHAMA”, Street Issad Abbes, Oued Smar 16270, Algiers, Algeria

<sup>2</sup> Zoonosis Laboratory, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy

Several surveys have been performed in many countries to evaluate the prevalence of *C. burnetii* in cattle, which ranges from 0 to 100% for animal level and from 4.4 to 100% for herd level (Guatteo et al. 2011). Limited serological studies on bovine coxiellosis were carried out in different Algerian regions targeting a small number of cows and adopting different sampling strategies (Dechicha et al. 2010; Abdelhadi et al. 2015; Agag et al. 2017; Derdour et al. 2017). To date, no epidemiological survey has targeted the Setif region in Algeria. However, Lacheheb and Raoult (2009) showed a high seroprevalence among the human inhabitants of Setif (15.5%) with a significantly higher seroprevalence among inhabitants of rural areas (20%). Therefore, the main objectives of this study are to estimate the apparent seroprevalence of *C. burnetii* infection in cows at herd and animal levels and to identify risk factors associated with *C. burnetii* seropositivity in the Setif region of Algeria.

## Material and methods

### Study area

The present study was conducted from March 2016 to April 2018 in the Setif high plains in northeastern Algeria. The region covers about 6550 km<sup>2</sup>, lies between eastern longitudes of 4° 73'–6° 02' and northern latitudes of 35° 61'–36° 59', and has an altitude that vary between 900 and 2000 m above sea level. The climate is semi-arid Mediterranean, characterized by cold rainy winters and hot dry summers. The temperatures often exceed 40 °C in summer and fall below 0 °C in winter, with frequent snowfall and frequent frost. The mean annual rainfall was of 350 mm from 1984 to 2014. The study area contains about 161,952 cattle, of which 79,354 are

dairy cows, distributed across 4465 dairy herds (Agricultural Services direction of Setif 2015) (Fig. 1).

### Study design and sampling

The study was designed as cross-sectional targeting a convenient sample of cows aged 24 months old and over selected by simple random sampling method from a cattle population that exists in the Setif area. Firstly, to estimate the number of sampled animals, we used the formula for simple random samples recommended by Thrusfield (2007):

$$N = \frac{(1.96)^2 P(1-P)}{L^2}$$

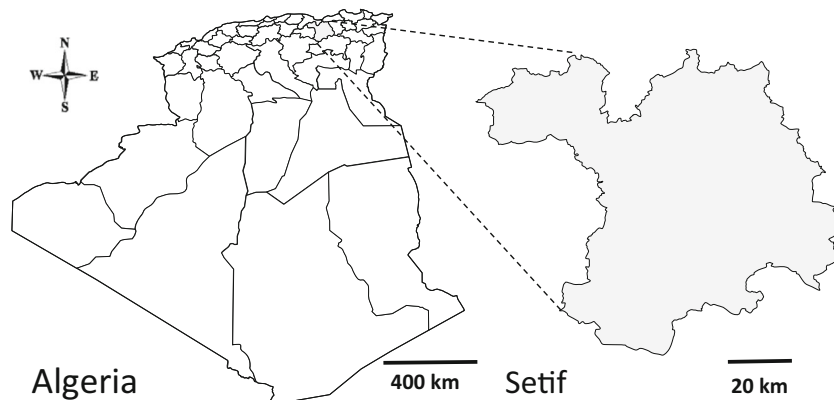
where  $N$  was the sample size, 1.96 was the  $Z$  value for the selected confidence level (95%),  $P$  was the individual disease prevalence, and  $L$  is the desired absolute precision. A minimum sample size of 600 animals was obtained using 50% expected individual prevalence (since there was no previous study in this area), an absolute precision of 4%, and a confidence level of 95%. However, a total of 678 animals were included in this study to increase the precision.

Secondly, to determine the minimal number of cows to be selected within each dairy herd, we adopted the formula described by Thrusfield (2007):

$$n = \left[ 1 - (1-p)^{1/d} \right] \times (N-d/2) + 1$$

where “ $n$ ” is the sample size, “ $p$ ” is the probability of detection of at least one seropositive cow, “ $N$ ” is the herd size, and “ $d$ ” is the number of seropositive cows in the herd. The probability of detection of at least one seropositive cow in a herd was determined at 95% ( $P=0.95$ ), and the number of seropositive cows in each herd “ $d$ ” was calculated assuming within-herd prevalence of 25% (Carbonero et al. 2015;

**Fig. 1** Map of the region of Setif in the northeastern Algeria (gray area) where blood samples were collected from cows during the period between March 2016 and April 2018 to determine the seroprevalence of antibodies against *C. burnetii* and risk factors associated with seropositivity



Guatteo et al. 2011). For this purpose, a minimum sample size of 11 animals per herd was used. On farms with a herd size up to 11 animals, all animals were included. Finally, a total of 678 female cows from 90 herds were randomly selected. The herds and animals within herds were randomly selected using the RAND function of Microsoft Excel® 2013. In the case, where the owner of the selected herd refused to participate, we looked for the closest neighbor herd. The blood samples were collected from the coccygeal vein of each cow into plain vacutainer tubes using disposable needles, and immediately transported on ice to the laboratory. The sera were separated by centrifuging the tubes at 1000×g for 10 min and stored at –20 °C until use.

## Data collection

A structured questionnaire focusing on risk factors for *C. burnetii* infection was administered to farm owners on the day of sample collection. The questionnaire was divided into two parts:

1. The first part involved farm characteristics and herd management: management system (intensive or semi-intensive), herd size ( $\leq 11$  cows or  $> 11$  cows), breeding type (dairy or mixed), use of disinfectants (yes or no), contact with other herds (yes or no), source of water (well water or groundwater or tap water), presence of ticks (yes or no), presence of small ruminants (yes or no), presence of horses (yes or no), presence of dogs (yes or no), presence of cats (yes or no), type of reproduction (only natural or only artificial insemination or both types), use of calving pens (yes or no) and milking (mechanic or manual).
2. The second part involved individual characteristics and reproduction disorders collected from each cow such as breed (imported breeds; Prim'holstein, Montbeliarde, and Fleckvieh, or local breeds mainly brown of atlas, or crossed breeds between imported and local breeds), age in years ( $> 2$  to  $\leq 5$  or  $> 5$  to  $\leq 8$  or  $> 8$ ), animal origin (homebred or purchased), history of abortion in previous year (yes or no), history of stillbirths in previous year (yes or no), and history of infertility in previous year (yes or no).

## Laboratory analysis

### Serological analysis

Determination of antibodies against phase I and phase II antigens of *C. burnetii* from each serum sample was screened by employing a commercial ELISA “ID Screen Q Fever Indirect Multi-species Kit” (IDvet, Grabels, France) following the protocol prescribed by the manufacturer. This test

uses native antigens isolated from an aborted bovine placenta and purified from culture of phases I and II *C. burnetii*. The manufacturer's internal validation report indicates a specificity of 100% based on the negative serological results obtained by this assay on 167 bovine serum from free Breton herds (no abortion was recorded for 3 years, and no positive result was obtained, either by ELISA or fixation complement over the last 3 years), and a 100% sensitivity based on positive serological results on 52 sera of aborted cows and positive for *C. burnetii* by complement fixation or by PCR on placenta. The optical density percent (% OD) was calculated according to the formula:

$$\%OD = 100 \times (OD_{sample} - OD_{negative\ control}) / (OD_{positive\ control} - OD_{negative\ control})$$

Samples with a % OD greater than 50% were considered positive; % OD between 40 and 50% were considered as doubtful, and those less than 40% were determined to be negative. Doubtful results were considered negative in this study.

## Statistical analysis

The apparent prevalence (AP) of antibodies to *C. burnetii* at individual level was estimated from the ratio of seropositive cows to the total number of cows examined. Prevalence of positive herds was estimated from the ratio of positive herds to the total number of herds investigated; herds that contain at least one seropositive cow were considered positive, with the exact binomial CI of 95% (Thrusfield 2007). Analysis of risk factors potentially associated with *C. burnetii* seropositivity was evaluated in two steps. Firstly, we conducted a univariable analysis of each variable using a chi-square test and those variables that presented  $P \leq 0.25$  were subjected to multivariable logistic regression analysis. The multivariable analysis was then performed using backward stepwise selection using a likelihood ratio test at each step with a significance level of 0.05 for entry and 0.1 for removal. All variable with a  $P < 0.05$  was considered statistically significant. The fit of the model was assessed using the Hosmer and Lemeshow goodness-of-fit (Hosmer and Lemeshow 2000). Spearman's correlation test was used to check a correlation among the independent variables, and if higher collinearity (correlation coefficient  $> 0.9$ ) was found between those variables, one of them was excluded from the multivariable analysis according to the biological plausibility (Dohoo et al. 1996). A variable is considered as a confounding factor if its removal changed the regression coefficient of the other variables by more than 25%. Finally, all pairwise interactions were tested for significance ( $P \leq 0.05$ ). The statistical analysis was performed using SPSS v25.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

### Seroprevalence of *Coxiella burnetii*

Out of the 678 cows tested, 77 were found positive for *C. burnetii* phase I and phase II antigens antibodies with an individual seroprevalence of 11.36% (95%CI 8.97–13.75%). At the herd level, 41 of 90 selected cattle herds had at least one seropositive cow to *C. burnetii* infection, giving a herd seroprevalence of 45.56% (95%CI 35.27–55.84%). Regarding the within-herd prevalence, the prevalence of seropositive cows per herd ranged from 9.09 to 57.14% (mean 23.71%, Q1 11.11%; median 20%, Q3 30%).

### Risk factor analysis

Regarding the risk factor analysis, the six factors herd size, contact with other herds, presence of small ruminants in farm, use of disinfectants, origin of cows, and history of infertility in previous year were all significant on the univariable analyses ( $P < 0.25$ ) and were selected for multivariable logistic regression analysis (Table 1). When these independent variables were subjected to the multivariable analysis, contact with other herds (OR 1.95, 95 CI 1.12–3.42) and purchased animals (OR 2.05, 95 CI 1.14–3.68) were identified as risk factors for seropositivity to *C. burnetii*, while the use of disinfectants (OR 0.32, 95 CI 0.14–0.72) was identified as a protective factor (Table 2). The final model had a good fit (Hosmer and Lemeshow test:  $\chi^2 = 5.006$ ;  $P = 0.287$ ).

## Discussion

Our work is the first study conducted with an appropriate sampling design to determine the individual and cattle herd prevalence, as well as, risk factors for the infection of *C. burnetii* in the state of Setif in the northeastern of Algeria. In this study, we chose the ELISA test instead of other serological tests to detect reactive antibodies to *C. burnetii* in serum samples for its higher sensitivity and for practical reasons because it is rapid, inexpensive, easy to perform in laboratories, and has higher throughput (OIE 2018). ELISA is a method of indirect diagnosis that highlights a past exposure to *C. burnetii* by the detection of their specific antibodies; therefore, a positive result does not confirm an active infection because this requires the use of direct diagnostic methods such as ELISA antigen or PCR (Muskens et al. 2011; Alvarez et al. 2012). The sensitivity and specificity of the commercial kit ELISA used are 100% (Seo et al. 2017; IDvet, internal validation report), which indicates an identical value of apparent and true seroprevalence. Since the vaccination against *C. burnetii* is not practiced in Algeria, the results of this serological study are a response to the natural infection.

The individual prevalence of 11.36% obtained in this study is similar to the 10.6% reported in Bejaïa state northern of the study area (Agag et al. 2017), but lower than a value of 23.91% reported in the region of Tiaret located in western Algeria (Abdelhadi et al. 2015), and 29% observed in one farm that suffered an abortion problem, located in the state of Blida in the center of the country (Dechicha et al. 2010). On the other hand, our seroprevalence was higher than that found in control case study between infectious causes of abortion seropositivity and cow abortion in Algiers, capital of Algeria, 1.66% (Derdour et al. 2017). This difference in prevalence between these regions might be partially attributed to the sampling strategies that are different.

Bovine coxiellosis has been reported in many countries with different prevalence rates (Guatteo et al. 2011). Compared with other serological investigations carried out in some African and Mediterranean countries, our individual seroprevalence seems to be lower than 14.5% in Nigeria (Tukur et al. 2014), 16.21% in Tunisia (Elandalousi et al. 2015), 16.3% in the East of Turkey (Ceylan et al. 2009), 14.4% in Italy (Capuano et al. 2001), 19.3% in Egypt (Klemmer et al. 2018), 29.92% in Sudan (Hussien et al. 2017), and 31.3% in Cameroon (Scolamacchia et al. 2010). Nevertheless, it was comparable with 10.5% in Kenya (Wardrop et al. 2016). Our study showed a higher seroprevalence than those observed 6.8% in another study in Nigeria (Adamu et al., 2018), 4% in Chad (Schelling et al. 2003), 3.6% in Senegal (Kamga-Waladjo et al. 2010), and 6.76% in Spain (Alvarez et al. 2012). This variation in prevalence rates between regions and countries may be linked to several factors such as local ecological factors and type of management which may influence the transmission of *C. burnetii* (Hussien et al. 2017).

This study concluded that 45.56% of herds had at least one seropositive animal. This result is higher than 22% in the state of Bejaïa (Agag et al. 2017), which demonstrates the widespread of *C. burnetii* among herds in the examined area. Several studies reported considerable variation in the seroprevalence of *C. burnetii* in herd cattle such as Spain (30%) (Alvarez et al. 2012), Nigeria (57.1%) (Tukur et al. 2014), Cameroon (68.1%) (Scolamacchia et al. 2010), and Italy (68%) (Capuano et al. 2001).

The within-herd prevalence obtained in the current work that ranged from 9.09 to 57.14% with mean of 23.71% (Q1 11.11%, median 20%, Q3 30%) is close to the mean values estimated from many studies in the whole world by Guatteo et al. (2011) (median 26.3%, Q1 21.8%, Q3 38.2%).

In the risk factor analysis, a positive association exists between seropositivity of *C. burnetii* and contact with other herds through the sharing of the same grazing fields and/or the same source of water ( $P < 0.01$ ). This can be explained on the one hand by the facts that contact with other herds increases the chance of meeting with infected cattle favoring

**Table 1** Univariable analysis of risk factors associated with *C. burnetii* seropositivity among cows sampled in Setif in northeastern Algeria during the period from March 2016 to April 2018

Independent variables	Categories	No. of animal sampled	No. of positive animals	Prevalence %	<i>P</i> value
Management system	Intensive	159	20	12.57	0.579
	Semi-intensive	519	57	10.98	
Herd size	≤ 11 cows	436	43	9.86	0.102*
	> 11 cows	242	34	14.04	
Breeding type	Dairy	579	63	10.88	0.345
	Mixed	99	14	14.14	
Use of disinfectants	Yes	131	7	5.34	0.016*
	No	547	70	12.79	
Contact with other herds	Yes	280	47	16.78	< 0.001*
	No	398	30	7.53	
Presence of ticks	Yes	129	17	13.17	0.469
	No	549	60	10.92	
Source of water	Well water	395	39	9.87	0.307
	Groundwater	116	21	18.10	
	Tap water	167	17	10.17	
Presence of small ruminants	Yes	213	34	15.96	0.011*
	No	465	43	9.24	
Presence of horses	Yes	111	14	12.61	0.648
	No	567	63	11.11	
Presence of dogs	Yes	252	32	12.69	0.397
	No	426	45	10.56	
Presence of cats	Yes	175	21	12.00	0.756
	No	503	56	11.13	
Type of reproduction	Only natural service	387	43	11.11	0.385
	Only artificial insemination	202	27	13.36	
	Natural service And artificial insemination	89	7	7.86	
Use of calving pens	Yes	100	10	10.00	0.643
	No	578	67	11.59	
Milking	Manual	146	18	12.32	0.676
	Mechanic	532	59	11.09	
Breed	Imported	237	27	11.39	0.581
	Local	90	13	14.44	
	Crossed	351	37	10.54	
Age in years	> 2 to ≤ 5	310	31	10	0.573
	> 5 to ≤ 8	299	38	12.70	
	> 8	69	8	11.59	
Cow origin	Homebreed	538	48	8.92	< 0.001*
	Purchased	140	29	20.71	
History of abortion in previous year	Yes	43	7	16.27	0.293
	No	635	70	11.02	
History of stillbirths in previous year	Yes	16	3	18.75	0.346
	No	662	74	11.17	
History of infertility in previous year	Yes	74	13	17.56	0.074*
	No	604	64	10.59	

\*  $P \leq 0.25$  and offered to the multivariable logistic regression model

the direct transmission of *C. burnetii* between animals, and on the other hand, by the contamination of the grazing and watering environment. Especially this bacterium is characterized by a very high stability towards environmental conditions and can stay infectious for many months (Gürtler et al. 2014).

The environment can be contaminated either by abortion and birth products, feces, urine, milk, and vaginal mucus from infected animals at the time of grazing or watering (Guatteo et al. 2006, 2007; Angelakis and Raoult 2010; EFSA 2010; Astobiza et al. 2011) or by dissemination of *C. burnetii* from



**Table 2** Multivariable logistic regression analysis of risk factors associated with *C. burnetii* seropositivity among cows sampled in Setif in northeastern Algeria, during the period from March 2016 to April 2018

Variables	B <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup>	OR <sup>c</sup>	CI <sup>d</sup> 95% (OR)	P value
Contact with other herds	0.670	0.285	1.95	1.12–3.42	0.019
Use of disinfectants	– 1.143	0.41	0.32	0.14–0.72	0.006
Cow purchased	0.719	0.298	2.05	1.14–3.68	0.016

Model chi-square 27.885 with df of 5

Model-2 log likelihood 479.907

Chi-square goodness to fit = 5.006, *p* value = 0.287

<sup>a</sup> Logistic regression coefficient

<sup>b</sup> Standard error

<sup>c</sup> Odds ratio

<sup>d</sup> Confidence interval

contaminated farms through soil, animal skin, and wastewater (Kersh et al. 2013; Villari et al. 2018), as well as by wind (Nusinovici et al. 2015).

In this study, the purchased cows were also identified as a risk factor for *C. burnetii* infection. The seroprevalence of purchased cows (20.71%) was significantly higher than for cows whose origin was the farm (8.92%) ( $P < 0.05$ ). This is in agreement with the study of Obaidat and Kersh (2017), who reported a significant association between the addition of new cattle to the herd and *C. burnetii* antibody positivity in bulk milk tank (BTM) of Jordanian dairy cattle herds (Obaidat and Kersh 2017), and the study of van Engelen et al. (2014), who showed that the purchase of cattle from at least two addresses in 2009 in the Netherlands was significantly correlated with the presence of both *C. burnetii* antibodies and DNA in BTM of dairy cattle herds (van Engelen et al. 2014). Furthermore, it has been revealed that the lack of quarantine of newly purchased animals is a factor that increased the risk of *C. burnetii* seropositivity for dairy cows in Denmark (Paul et al. 2012). This emphasizes the importance of taking biosecurity measures like quarantine and screening of newly purchased animals to prevent the introduction of infected animals into the herds.

In fact, both risk factors identified in this study whether the contact between herds or the introduction of new cows in the herd support the spread of infection from one herd to the other, which explains the high herd seroprevalence obtained in this study (45.56%).

However, the use of disinfectants was identified as the factors that protect against bovine coxiellosis. A similar result was reported recently in domestic ruminants in Lebanon (Dabaja et al. 2019). In addition, it was revealed that the prevalence of *C. burnetii* antibodies in cattle decreases in farms where the cleaning and disinfection of equipment after use (Tukur et al. 2014), the cleaning of the bedding in the cubicles at least once per day (van Engelen et al. 2014), and the frequent cleaning of the feeders (Obaidat and Kersh 2017) were realized, hence, the interest of good hygiene practices in the reduction of exposure to *C. burnetii* in livestock. *C. burnetii* or more precisely its infectious form small cell variant (SCV) is known to be resistant to

environmental factors and chemical disinfectants (Cantas et al. 2011; Pexara et al. 2018). However, it is completely inactivated following exposure to Quaternary ammonium or 70% ethanol during 30 min contact time (Plummer et al. 2018). It has been revealed also that exposure to 1% Peroxygen or 1:100 dilution of hypochlorite during 30 min contact time reduced more than 90% of infectivity (Plummer et al. 2018). The disinfectant can destroy a wide range of pathogens and minimize the risk of infection in cattle; therefore, it indirectly helps the immune system of animals to fight against pathogens resistant to disinfectants like *C. burnetii*, in particular, the destruction of pathogens with immunosuppressive effects such as bovine herpesvirus-1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) that predispose cattle to secondary infections (Potgieter 1995; Srikumaran et al. 2007; Biswas et al. 2013; Molina et al. 2013; Lanyon et al. 2014).

In conclusion, the results from the current study indicate the presence and circulation of *C. burnetii* infection in cattle herd in Setif state of Northeastern Algeria. Consequently, some hygiene and biosecurity measures must be implemented mainly focusing on risk factors identified in this work, such as limiting contact between herds, quarantine of newly purchased animals, and the use of disinfectants that can reduce the spread of infection and possible transmission to humans. Finally, more epidemiological surveys in animals and human are needed to better understand and control of this disease in Algeria.

**Acknowledgments** We are very grateful to the Zoonosis Laboratory of Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna for funding all the laboratory analyses, and the staff for scientific and technical support. Also, we acknowledge the farmers for their willingness to participate and to provide information about their farms and animals.

## Compliance with ethical standards

**Ethical statement** All animal owners declared their oral consent before the collection of the blood samples as well to the related survey questions. The cattle were sampled by a qualified veterinarian following all applicable guidelines for the care and use of animal.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Abdelhadi, F.Z., Abdelhadi, S.A., Niar, A., Benallou, B., Meliani, S., Smail, N.L., Mahmoud, D., 2015. Abortions in Cattle on the Level of Tiaret Area (Algeria). *Global Veterinaria*, 14, 638–645.
- Adamu, S.G., Kabir, J., Umoh, J.U., Raji, M.A., 2018. Seroprevalence of brucellosis and Q fever (Coxiellosis) in cattle herds in Maigana and Birnin Gwari agro-ecological zone of Kaduna State, Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 1583–1589.
- Agag, S., Kaidi, R., Khelef, D., 2017. Séroprévalence de la fièvre Q chez les bovins de la région de Bejaïa (Algérie). *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 69, 155–159.
- Agerholm, J.S., 2013. Coxiella burnetii associated reproductive disorders in domestic animals—a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55, 13.
- Alvarez, J., Perez, A., Mardones, F.O., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Pagés, E., Mirat, F., Díaz, R., Carpintero, J., Domínguez, L., 2012. Epidemiological factors associated with the exposure of cattle to Coxiella burnetii in the Madrid region of Spain. *Veterinary Journal*, 194, 102–107.
- Angelakis, E., Raoult, D., 2010. Q fever. *Veterinary Microbiology*, 140, 297–309.
- Astobiza, I., Barandika, J. F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R. A., & García-Pérez, A. L. 2011. Coxiella burnetii shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Research in veterinary science*, 91, e58–e63.
- Bielawska-Drózd, A., Cieślak, P., Miński, T., Bartoszcze, M., Knap, J.P., Gawel, J., Zakowska, D., 2013. Q fever - selected issues. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 20, 222–232.
- Biswas, S., Bandyopadhyay, S., Dimri, U., H. Patra, P., 2013. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) - a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Veterinary Quarterly*, 33, 68–81.
- Cantas, H., Muwonge, A., Sareyyupoglu, B., Yardimci, H., Skjerve, E., 2011. Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Veterinary Research*, 7, 13.
- 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. *Veterinary Record*, 149, 669–671.
- Carbonero, A., Guzmán, L.T., Montaña, K., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., Saa, L.R., 2015. Coxiella burnetii seroprevalence and associated risk factors in dairy and mixed cattle farms from Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, 118, 427–435.
- Ceylan, E., Berktaş, M., Keles, I., Agaoglu, Z., 2009. Seroprevalence of Q Fever in Cattle and Sheep in the East of Turkey. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances (AJAVA)*, 4, 114–121.
- Dabaja, M.F., Greco, G., Villari, S., Vesco, G., Bayan, A., Bazzal, B. El, Ibrahim, E., Gargano, V., Sciacca, C., Lelli, R., Ezzedine, M., Mortada, H., Tempesta, M., Mortada, M., 2019. Occurrence and risk factors of Coxiella burnetii in domestic ruminants in Lebanon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 64, 109–116.
- Dohoo, I.R., Ducroc, C., Fourichon, C., Donald, A., Hurnik, D., 1996. An overview of techniques for dealing with large numbers of independent variables in epidemiologic studies. *Preventive Veterinary Medicine*, 29, 221–239.
- Dechicha, A., Gharbi, S., Kebbal, S., Chatagnon, G., Tainturier, D., Ouzrout, R., Guetarni, D., 2010. Serological survey of etiological agents associated with abortion in two Algerian dairy cattle breeding farms. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 2, 001–005.
- Derdour, S.-Y., Hafsi, F., Azzag, N., Tennah, S., Laamari, A., China, B., Ghalimi, F., 2017. Prevalence of the main infectious causes of abortion in dairy cattle in Algeria. *Journal of Veterinary Research*, 61,337–343.
- EFSA, Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2010. Scientific Opinion on Q fever., *EFSA Journal*, 8, 1–114. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1595>. (Accessed 15 sep 2018)
- Elandalousi, R.B., Ghram, A., Maaroufi, A., Mnif, W., 2015. Séroprévalence des maladies abortives zoonotiques chez les ruminants au nord de la Tunisie. *Research fir*, 2, 1419.
- 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., 2007. Coxiella burnetii shedding by dairy cows. *Veterinary Research*, 38, 849–860.
- 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.
- Gürtler, L., Bauerfeind, U., Blümel, J., Burger, R., Drosten, C., Gröner, A., Heiden M, Hildebrandt M., Jansen B., Offergeld R., Pauli G., Seitz R., Schlenkrich U., Schottstedt V., Strobel, J., Willkommen, H., 2014. Coxiella burnetii - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. *transfusion medicine hemotherapy*, 41,60–72
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. *Applied logistic regression*, (John Wiley & Sons, New York) 375.
- Hussien, M.O., Enan, K.A., Alfaki, S.H., Gafar, R.A., Taha, K.M., Rahim, A., El, M., 2017. Seroprevalence of Coxiella burnetii in Dairy Cattle and Camel in Sudan. *International Journal of Infection*, 4, e42945.
- Kamga-Waladjo, A.R., Gbati, O.B., Kone, P., Lapo, R.A., Chatagnon, G., Bakou, S.N., Pangui, L.J., Diop, P.E.H., Akakpo, J.A., Tainturier, D., 2010. Seroprevalence of Neospora caninum antibodies and its consequences for reproductive parameters in dairy cows from Dakar-Senegal, West Africa. *Tropical Animal Health and Production*, 42, 953–959.
- Kersh, G.J., Fitzpatrick, K.A., Self, J.S., Priestley, R.A., Kelly, A.J., Ryan Lash, R., Marsden-Haug, N., Nett, R.J., Bjork, A., Massung, R.F., Anderson, A.D., 2013. Presence and Persistence of Coxiella burnetii in the environments of goat farms associated with a Q fever outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1697–1703
- Kirkan, Ş., Kaya, O., Tekbiyik, S., Parin, U., 2008. Detection of Coxiella burnetii in cattle by PCR. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 32, 215–220.
- Klemmer, J., Njeru, J., Emam, A., El-Sayed, A., Moawad, A.A., Henning, K., Elbeskawy, M.A., Sauter-Louis, C., Straubinger, R.K., Neubauer, H., El-Diasty, M.M., 2018. Q fever in Egypt: Epidemiological survey of Coxiella burnetii specific antibodies in cattle, buffaloes, sheep, goats and camels. *PLoS One*, 13, e0192188.
- Lacheheb, A., Raoult, D., 2009. Seroprevalence of Q- fever in Algeria. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 167–168
- Lanyon, S.R., Hill, F.I., Reichel, M.P., Brownlie, J., 2014. Bovine viral diarrhoea: Pathogenesis and diagnosis. *Veterinary Journal*, 199, 201–209.
- Molina, V., Risalde, M.A., Sánchez-Cordón, P.J., Pedrera, M., Romero-Palomo, F., Luzzago, C., Gómez-Villamandos, J.C., 2013. Effect of infection with BHV-1 on peripheral blood leukocytes and lymphocyte subpopulations in calves with subclinical BVD. *Research in Veterinary Science*, 95, 115–122.
- Muskens, J., Van Engelen, E., Van Maanen, C., Bartels, C., Lam, T.J.G.M., 2011. Paper: Prevalence of Coxiella burnetii infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Veterinary Record*, 168, 79.
- Nusinovici, S., Hoch, T., Brahim, M.L., Joly, A., Beaudeau, F., 2015. The Effect of Wind on Coxiella burnetii Transmission Between Cattle Herds: a Mechanistic Approach. *transboundary and emerging diseases*, 64, 585–592.

- Obaidat, M.M., Kersh, G.J., 2017. Prevalence and Risk Factors of *Coxiella burnetii* Antibodies in Bulk Milk from Cattle, Sheep, and Goats in Jordan. *Journal of Food Protection*, 80, 561–566.
- World Organization for Animal Health (OIE), 2018. Chapter 2.1.16. Q fever. in *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, Paris. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.01.16\\_Q\\_FEVER.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.01.16_Q_FEVER.pdf) Accessed 18 September 2018.
- Parker, N.R., Barralet, J.H., Bell, A.M., 2006. Seminar Q fever. *Lancet*, 367, 679–88.
- Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A. B., Agerholm, J. S., 2012. Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 107, 57–64.
- Pexara, A., Solomakos, N., Govaris, A., 2018. Q fever and prevalence of *Coxiella burnetii* in milk. *Trends in Food Science and Technology*, 71, 65–72.
- Plummer, P.J., McClure, J.T., Menzies, P., Morley, P.S., Van den Brom, R., Van Metre, D.C., 2018. Management of *Coxiella burnetii* infection in livestock populations and the associated zoonotic risk: A consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32, 1481–1494.
- Porter, S.R., Czapliski, G., Mainil, J., Guattéo, R., Saegerman, C., 2011. Q fever: Current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *International Journal of Microbiology*, 2011.
- Potgieter, L.N., 1995. Immunology of bovine viral diarrhoea virus. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 11, 501–520.
- Roest, H.I.J., Tilburg, J.J.H.C., 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., 2009. *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.
- 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. *Preventive Veterinary Medicine*, 61, 279–293.
- Scolamacchia, F., Handel, I.G., Fèvre, E.M., Morgan, K.L., Tanya, V.N., Bronsvort, B.M.D.C., 2010. Serological patterns of brucellosis, leptospirosis and Q fever in *Bos indicus* cattle in Cameroon. *PLoS One*, 5, e8623.
- Seo, M. G., Ouh, I. O., Lee, S. H., Kim, J. W., Rhee, M. H., Kwon, O. D., Kim, T.H., Kwak, D., 2017. Prevalence of *Coxiella burnetii* in cattle at South Korean national breeding stock farms. *PLoS one*, 12, e0177478.
- Srikumaran, S., Kelling, C.L., Ambagala, A., 2007. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Animal Health Research Reviews*, 8, 215–229.
- Thrusfield, M. 2007. *Veterinary Epidemiology*, 3rd edn., Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. pp. 230–238.
- Tukur, H.B., Ajogi, I., Kabir, J., Umoh, J.U., 2014. Seroprevalence of *Coxiella Burnetti* in Cattle and Its Risk Factors in Kaduna Metropolis, Kaduna State, Nigeria. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*, 7, 1–5.
- Van Engelen, E., Schotten, N., Schimmer, B., Hautvast, J. L. A., Van Schaik, G., van Duijnhoven, Y. T. H. P., 2014. Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Preventive Veterinary Medicine*, 117, 103–109.
- Vanderburg, S., Rubach, M.P., Halliday, J.E.B., Cleaveland, S., Reddy, E.A., Crump, J.A., 2014. Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A OneHealth Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2787.
- Villari, S., Galluzzo, P., Arnone, M., Alfano, M., Geraci, F., Chiarenza, G., 2018. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection (Q fever) in sheep farms located in Sicily (Southern Italy) and related risk factors. *small ruminant research*, 164, 82–86.
- Wardrop, N.A., Thomas, L.F., Cook, E.A.J., de Glanville, W.A., Atkinson, P.M., Wamae, C.N., Fèvre, E.M., 2016. The Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* in Humans and Cattle, Western Kenya: Evidence from a Cross-Sectional Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 10, e0005032.
- Wielders, C.C.H., Wuister, A.M.H., de Visser, V.L., de Jager-Leclercq, M.G., Groot, C.A.R., Dijkstra, F., van Gageldonk-Lafeber, A.B., van Leuken, J.P.G., Wever, P.C., van der Hoek, W., 2014. Characteristics of hospitalized acute Q fever patients during a large epidemic, The Netherlands. *PLoS One*, 9, e91764.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.