



HAL
open science

Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques : état de l'art et intérêt de l'activité de référence du LNR

T. Lurier, Elsa Jourdain, Florence Ayrat, Aurélie Couesnon, Elodie Rousset

► To cite this version:

T. Lurier, Elsa Jourdain, Florence Ayrat, Aurélie Couesnon, Elodie Rousset. Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques : état de l'art et intérêt de l'activité de référence du LNR. Bulletin des G.T.V., 2022, Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires, pp.615-632. hal-03771047

HAL Id: hal-03771047

<https://hal.inrae.fr/hal-03771047>

Submitted on 3 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques : Etat de l'art et intérêt de l'activité de référence du LNR

Thibaut Lurier^{1,2}, Elsa Jourdain¹, Florence Ayrat³, Aurélie Couesnon⁴, Elodie Rousset⁴

Affiliation :

- 1- Université Clermont Auvergne, INRAE, VetAgro Sup, UMR EPIA, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France
- 2- Université de Lyon, INRAE, VetAgro Sup, UMR EPIA, 69280 Marcy l'Etoile, France
- 3- Université de Lyon, INRAE, VetAgro Sup, Usc 1233 UR RS2GP, 69280 Marcy l'Etoile, France
- 4- ANSES, Laboratoire de Sophia Antipolis, Unité fièvre Q animale, Sophia Antipolis, France

Résumé

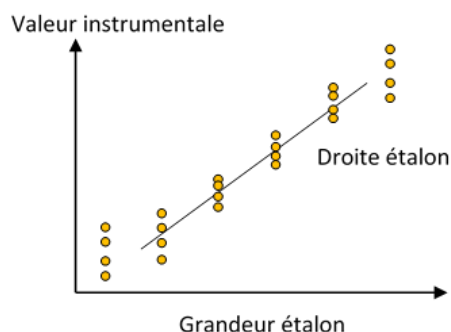
La fièvre Q est une maladie zoonotique causée par la bactérie *Coxiella burnetii*, la plupart des cas cliniques humains recensés sont liés à une exposition à des ruminants domestiques excréteurs de la bactérie. Parmi les méthodes diagnostiques des infections par *C. burnetii* en élevages de ruminants, les méthodes PCR et ELISA sont recommandées respectivement pour le diagnostic direct et indirect par l'EFSA et l'OIE. Cet article fait l'état des lieux des connaissances sur les performances analytiques et diagnostiques de ces méthodes. Il présente également les moyens mis en œuvre par le LNR fièvre Q pour contribuer à standardiser ces méthodes et à valider leurs performances (PCR) ou les évaluer (ELISA), et ainsi garantir comparabilité et fiabilité des résultats fournis par un réseau de laboratoires. Les travaux mis en œuvre par les équipes de recherche (bactériologie, épidémiologie, statistiques) et le LNR ont permis de préciser l'interprétation des résultats diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques. Les recommandations d'usage de ces tests, dans le contexte de l'imputation d'une série abortive à *C. burnetii* dans les élevages de ruminants (protocole national du dispositif OSCAR), sont discutées à la lumière des nouvelles connaissances. Poursuivre ces travaux permettra d'appuyer davantage la démarche diagnostique des vétérinaires praticiens, la surveillance nationale et internationale et les échanges.

Mots clés

Diagnostic, *Coxiella burnetii*, ELISA, PCR, Sensibilité, Spécificité

Glossaire propre aux méthodes d'analyse ou de mesure

Domaine de linéarité : C'est la plage de valeurs sur laquelle il existe une relation linéaire entre la concentration recherchée et la valeur obtenue par la méthode. C'est sur ce domaine de linéarité que sera établie la droite d'étalonnage (ou gamme étalon) permettant d'assigner une quantité de l'analyte recherché à une mesure instrumentale, comme en PCR le cycle seuil (Ct ou Cq, respectivement pour *cycle threshold* ou *quantification cycle* en anglais) et en ELISA la densité optique (DO). Les valeurs instrumentales sont les valeurs non transformées, c'est-à-dire non calibrées par rapport à un ou des témoin(s) inclus(s) dans chaque série d'analyses (ex : concentration d'une bactérie en PCR par rapport à une gamme de standards dosés, les ratios de densité optique (ODR ou %DO) en ELISA par rapport à des témoins étalons positif et négatif). Les **seuils de positivité** sont fixés dans ce domaine, car l'exactitude des mesures peut être déterminée.



Exactitude : Combine la justesse, la répétabilité et la reproductibilité. Une méthode est exacte lorsqu'elle fournit des résultats très voisins et proches de la valeur de référence. Elle est exprimée par l'écart-type ou les limites de confiance (zone de variabilité autour de la mesure, marge d'erreur technique ou incertitude analytique).

Fidèle, non juste (biais ou erreur systématique par rapport à la référence)	Fidèle, juste (mesures exactes)	Juste, non fidèle (dispersion ou erreurs aléatoires)

Harmonisation : Résultat d'un accord entre laboratoires visant à étalonner des méthodes d'analyse similaires, à ajuster des seuils diagnostiques et à exprimer des données des tests de manière à permettre une interprétation uniforme des résultats obtenus par différents laboratoires.

Imputabilité : Le terme d'imputabilité est utilisé en diagnostic différentiel infectieux quand les informations cliniques et les résultats d'analyses permettent d'identifier l'un des agents étiologiques recherché comme la cause possible ou probable d'un syndrome ou d'un symptôme clinique.

Incertain de mesure (IM) : Paramètre, associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs obtenues (voir « exactitude »). L'incertitude de mesure (ou incertitude analytique) est souvent estimée par le calcul de 2 écart-types autour de la moyenne des résultats d'essais en conditions de reproductibilité. L'évaluation de l'IM est réalisée pour les tests quantitatifs uniquement. Cependant, si un test qualitatif est rapporté à l'aide d'une valeur numérique, il doit être considéré de la même manière que pour les procédures de test quantitatif (ex de l'ELISA)[1]

Justesse : Ecart moyen entre la mesure réalisée par la méthode et la valeur de référence (valeur vraie) de l'échantillon analysé. Elle est exprimée en terme de « biais » (ou erreurs systématiques) (voir « exactitude »).

Lot d'un kit : Tests fabriqués dans des volumes compatibles aux besoins des utilisateurs et utilisables sur une période donnée. Chaque lot de production fait l'objet de contrôles qualité pour vérifier l'homogénéité intra-lot, la calibration inter-lot (par rapport aux lots précédemment produits), et la stabilité jusqu'à la date de péremption stipulée.

Limite de quantification : Plus faible concentration de l'analyte dans un échantillon qui puisse être mesurée avec une exactitude définie.

Matériau de référence (MR) : Echantillon disponible en quantité suffisante pour être largement distribué (préparation d'un lot), suffisamment homogène et stable quant à une ou plusieurs propriétés spécifiées, et, qui a été préparé pour être adapté à une utilisation prévue dans un processus de mesurage. Les utilisations prévues

peuvent être : i) l'étalonnage d'un système de mesurage (MR positif étalon, MR de détectabilité par ex. pour l'harmonisation de méthodes), ii) l'évaluation d'une méthode de mesurage (MR pour mise au point, caractérisation et validation), iii) l'assignation de valeurs à d'autres matériaux (MR de raccordement) et le contrôle de la qualité des résultats (MR calibrant). MR est un terme générique [2].

Performances : Plusieurs caractéristiques de performance analytiques (sensibilité et spécificité analytiques, répétabilité, reproductibilité ...) et diagnostiques (sensibilité et spécificité diagnostiques à l'échelle individuelle et de groupe ...) à partir desquelles il est possible de juger qu'une méthode d'analyse convient pour l'objectif poursuivi et donne des résultats fiables. En amont de la validation d'une méthode, un cahier des charges est établi donnant les critères d'acceptabilité pour chaque caractéristique en fonction des capacités analytiques et des besoins diagnostiques. Par exemple, des limites d'incertitude maximale sont fixées, suite à une estimation de l'incertitude de mesure dans des conditions déterminées, ou du fait d'une obligation réglementaire.

Robustesse : Aptitude d'une méthode d'analyse à ne pas être affectée lorsqu'elle est soumise à des petites modifications du mode opératoire (ex. : une durée d'incubation +/- 10%, une température +/- 2°C, un volume +/- 10%).

Répétabilité : Estimation de la variabilité des mesures répétées sur un même échantillon au sein d'un même essai. On parle aussi de « fidélité intra-série ».

Reproductibilité intra-laboratoire : Estimation de la variabilité des mesures répétées sur un même échantillon analysé sur plusieurs essais indépendants par une même méthode au sein d'un même laboratoire, par des utilisateurs différents, voire des équipements différents (exemple : suivi d'un témoin de reproductibilité ou traceur sur une carte de contrôle des essais successifs réalisés). On parle aussi de « fidélité intermédiaire ».

Reproductibilité inter-laboratoires (ou fidélité) : Estimation de la variabilité totale d'une méthode d'analyse lorsqu'elle est réalisée dans des laboratoires différents (voir « exactitude » et « incertitude de mesure »).

Sensibilité analytique (ou limite de détection) : Limite en dessous de laquelle la substance dosée est considérée comme non détectée. Pour la recherche d'agents infectieux par PCR en santé animale, la sensibilité analytique représente l'aptitude de la méthode à détecter, avec une certitude définie (par ex., un niveau de confiance de 95%), une quantité minimale d'agents infectieux présents.

Sensibilité diagnostique : Capacité d'un test de donner un résultat positif à partir d'un prélèvement réalisé chez un individu réellement positif relativement à l'utilisation diagnostique ciblée par le test pour une population donnée. Elle va différer selon l'objectif du test (recherche d'une étiologie, d'une infection, d'une primo-infection, d'une excrétion, ...).

Seuil de positivité : Valeur à partir de laquelle on décide qu'un résultat devient positif. Il diffère selon l'objectif d'utilisation du test (dépistage de l'infection ou diagnostic clinique par ex.). Le seuil d'un test influence à la fois sa sensibilité et sa spécificité diagnostiques. En effet, toute augmentation de la sensibilité diagnostique (moins de faux négatifs) se fait au détriment de la spécificité diagnostique (davantage de faux positifs) et réciproquement.

Spécificité analytique : Capacité d'un test à ne pas donner de résultat positif en l'absence de la cible (bactérie, etc), de manière univoque, y compris en présence d'autres agents proches génétiquement et/ou se trouvant dans la même niche écologique, pouvant potentiellement provoquer des réactions croisées (capacité d'exclusivité du test). Elle intègre aussi l'inclusivité du test, c'est-à-dire son aptitude à détecter, par exemple, diverses souches de *C. burnetii* d'origines géographiques ou animales différentes ou bien divers anticorps y étant étroitement reliés. Enfin, la spécificité analytique peut être affectée par des interférents présents dans la matrice ciblée (par ex. des inhibiteurs de PCR dans les prélèvements de poussières) ou des bruits de fond techniques (par ex. en ELISA). De tels interférents peuvent provoquer des réponses faussement réduites ou faussement élevées dans le test (capacité de sélectivité)[3]

Spécificité diagnostique : Capacité d'un test de donner un résultat négatif à partir d'un prélèvement réalisé chez un individu réellement négatif relativement à l'utilisation diagnostique ciblée par le test.

Validation : La validation est réalisée sur une méthode une fois son protocole défini et figé. Elle permet de connaître les caractéristiques de performance requises de la méthode, dans les conditions d'un protocole standard, qui sera ensuite pratiqué en routine. Ainsi, la validation d'une méthode consiste à établir et figer le mode opératoire, à formuler un cahier des charges sur les performances attendues (avec des critères d'acceptabilité, par ex. limite de détection inférieure à 1000 bactéries par écouvillon) pour un usage déterminé, puis à vérifier expérimentalement l'adéquation de la totalité de ces exigences spécifiées (voir « performances »). Des éléments techniques sous forme de guides normatifs sont proposés (par ex., la norme AFNOR U47-600 pour

la validation des méthodes PCR en santé animale). Le mode opératoire et l'ensemble des données de performances sont formalisés dans le rapport de validation. Le développeur/valideur peut solliciter le LNR pour le cahier des charges et certains MRs. Le LNR examine le dossier de validation et remet une attestation de conformité.

Valeur prédictive positive (VPP) d'une méthode : Probabilité qu'un individu testé positif par une méthode, soit réellement positif relativement à l'utilisation diagnostique ciblée. La VPP dépend des sensibilité et spécificité diagnostiques et de la prévalence réelle (proportion d'individus réellement positifs) dans la population ciblée.

Valeur prédictive négative (VPN) d'une méthode : Probabilité qu'un individu testé négatif par une méthode, soit réellement négatif relativement à l'utilisation diagnostique ciblée. La VPN dépend des sensibilité et spécificité diagnostiques et de la prévalence réelle (proportion d'individus réellement positifs) dans la population ciblée.

Introduction

La fièvre Q est une maladie zoonotique causée par la bactérie *Coxiella burnetii* récemment classée dans les maladies de catégorie E à surveillance obligatoire chez les ruminants domestiques, et plus largement les espèces *Bison ssp.*, *Bos ssp.*, *Bubalus ssp.*, *Ovis ssp.*, *Capra ssp.* (mise en application en 2021 de la loi de santé animale [4]). En France, plusieurs méthodes diagnostiques sont disponibles pour mettre en évidence la bactérie ou la réaction immunitaire en anticorps des bovins, ovins et caprins domestiques à la suite d'une infection. La connaissance des performances analytiques (limites de détection, répétabilité, reproductibilité, etc.), le maintien de ces performances dans les différents laboratoires vétérinaires, et l'estimation des performances diagnostiques (sensibilité et spécificité pour une utilisation diagnostique visée) sont des préalables indispensables pour l'obtention de résultats fiables et exploitables pour le diagnostic en élevages, et aussi pour la surveillance à l'échelle du territoire et les échanges.

L'objectif de cet article est de présenter un état des lieux des connaissances sur les performances des principales méthodes diagnostiques de la fièvre Q chez les ruminants domestiques, qui sont essentiellement basées sur des kits commercialisés. De plus, les moyens proposés par le LNR pour garantir et maintenir ces performances à l'échelle d'un réseau de laboratoires seront décrits. Nous finirons par la présentation des recommandations d'usage des tests pour imputer un épisode abortif à *C. burnetii* et d'autres besoins actuels majeurs, en particulier en matière d'évaluation du statut des élevages dans un contexte de contrôle avant l'introduction.

I. Performances des méthodes diagnostiques de la fièvre Q

Parmi l'ensemble des méthodes diagnostiques disponibles, celles qui sont recommandées par l'EFSA [5, 6] et par l'OIE sont les méthodes PCR et ELISA (Tableau 1, OIE, 2018). Les premières sont des méthodes directes permettant de mettre en évidence l'ADN de l'agent bactérien mais ne garantissant toutefois pas la viabilité des bactéries détectées. Les secondes sont des méthodes indirectes révélant la présence d'anticorps spécifiques indicatrice d'une infection en cours ou passée par *C. burnetii*. Si en médecine humaine le diagnostic de fièvre Q est individuel, une interprétation des résultats d'analyses à l'échelle du groupe est considérée comme préférable chez les ruminants, du fait des risques de faux négatifs en détection directe comme indirecte à l'échelle individuelle [7]. En outre, bien qu'en médecine humaine, la mise en évidence d'une réponse immunitaire cellulaire soit utilisable pour diagnostiquer certaines formes des infections par *C. burnetii* [8, 9], aucune méthode équivalente n'est à ce jour disponible en routine pour une utilisation chez les ruminants domestiques, certaines applications existent dans des contextes de recherche [10, 11].

Tableau 1 : Méthodes diagnostiques disponibles pour le diagnostic des infections par *C. burnetii* en fonction de leur objectif.
Source [7]

Méthode	Objectifs					
	Démontrer l'absence d'infection dans une population	Démontrer l'absence d'infection d'un individu	Contribuer à la mise en place de plan d'éradication	Confirmation d'une suspicion clinique	Estimation d'une prévalence, surveillance	Évaluation du statut immunitaire d'un individu ou d'une population suite à la vaccination
Méthodes diagnostiques directes = mise en évidence de <i>C. burnetii</i>						
PCR	+++	n/a	+++	+++	++	+ ¹
Culture	+	n/a	+	-	+	-
Coloration	+	n/a	+	+	+	-
Génotypage	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Méthodes diagnostiques indirectes = mise en évidence de la réaction immunitaire						
ELISA	+++	n/a	+++	++	+++	+++
IFA	++	n/a	++	++	++	++
CFT	-	n/a	-	++	+	+

Légende : +++ = Méthode recommandée ; ++ = Méthode convenable ; + = Méthode utilisable dans certaines situations, mais son coût, sa fiabilité ou d'autres facteurs limitent sérieusement son utilisation ; - = Méthode non appropriée pour cet objectif ; n/a = Non applicable ; ¹ la confirmation du statut « immunisé » doit être accompagnée d'un (échelle individuelle) ou plusieurs (échelle troupeau) test(s) PCR démontrant l'absence d'excrétion vaginale lors de la mise bas ultérieure.

PCR = polymerase chain reaction ; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay ; IFA = indirect immunofluorescence assay ; CFT = complement fixation test

Pour chacun des objectifs présentés dans le tableau 1, des protocoles standardisés manquent. Ces protocoles doivent être constitués *a minima* d'un plan d'échantillonnage dans les élevages concernés, d'un plan d'analyses de laboratoires et des grilles d'interprétation des résultats. L'un des points les plus critiques de ces protocoles est la connaissance des performances des méthodes d'analyses utilisées.

a. Description des méthodes PCR

Les méthodes PCR permettent de mettre en évidence l'ADN de *C. burnetii* dans un échantillon, après extraction des ADN totaux et amplification par PCR à l'aide d'un jeu d'amorces qui cible une séquence du chromosome de *C. burnetii* de façon spécifique. Diverses méthodes de PCR temps réel, basées sur des kits (ou réactifs) d'extraction d'ADN et de PCR, sont disponibles et présentent des variantes en termes de méthodes d'extraction et d'amorces. Leurs limites de détectabilité étant de l'ordre de 200 à 2 000 bactéries par mL de suspension ou par écouvillon, les PCR constituent les méthodes de mise en évidence directe de la bactérie les plus sensibles analytiquement (tableau 2). Elles peuvent être réalisées sur divers types de prélèvement (matrices biologiques), et permettent de détecter les bactéries de *Coxiella burnetii*, voire de quantifier la concentration bactérienne dans l'échantillon [7]. Pour garantir un niveau de performance analytique adéquat, des validations doivent être réalisées pour chaque matrice [3, 12]. La validation de ces méthodes implique la détermination de leurs limites de détection (PCR qualitative), leurs exactitudes et leurs limites de quantification (PCR quantitative, PCRq).

Des méthodes PCR, basées sur kits commerciaux, ont été progressivement mises en place en France depuis 2012 pour le diagnostic d'avortements en série et le diagnostic du statut excréteur d'un élevage (tableau 2). Pour chaque méthode, on distingue trois types d'utilisation possibles : la PCR quantitative (permettant d'estimer une charge bactérienne), la PCR dite relative à un « seuil clinique abortif » (permettant d'estimer l'imputabilité d'un avortement), et la PCR qualitative (donnant un résultat binaire, « détecté » vs « non détecté »). Les types « quantitatif » et « relatif » sont recommandés pour le diagnostic d'avortements et la PCR de type « qualitatif » est utilisée plutôt en dépistage [13, 14]. Par exemple, certains laboratoires connaissant un nombre faible de résultats positifs optimisent les

couts d'analyses : ils réalisent un dépistage puis reprennent les analyses uniquement sur les échantillons trouvés positifs. L'historique de cette mise en place est présenté ensuite (chap II).

Tableau 2 : Description et caractéristiques de performance validées des tests PCR commercialisés pour le diagnostic des avortements par *C. burnetii* chez les ruminants domestiques (matrices vaginale/endocervicale et placentaire).

Fournisseur	Kit d'Extraction ADN	Kit PCR	Méthode complète : Performances validées (Exactitude maximale définies PCRq $\pm 0,70$ log ₁₀ /mL, PCRr $\pm 2,33$ Ct)				Type de PCR
			LD _{méthode} (copies GE/mL)	LQ _{méthode} en copies GE/mL (ou log ₁₀ /mL)	Fidélité en PCR relative (Ct)		
					MRSI au seuil 10 ⁴ GE/mL	MRSI au seuil 10 ³ GE/mL	
AB™ by Thermo Fisher Scientific (LSI S.A.S)	manuel: Qiamp DNA mini kit (Qiagen)	VetMAX™ C.burnetii Absolute Quant Kit (FQPAQ) (cible: <i>Coxiella burnetii</i>)	500	900 (2,95)	$\pm 0,35$	$\pm 1,19$	Validé: Qualitatif, Quantitatif, Relative
	robot: MagMAX CORE		700	900 (2,95)	$\pm 0,90$	$\pm 0,62$	
	manuel: Qiamp DNA mini kit (Qiagen)	VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit (SARP)	500*	900* (2,95)	$\pm 0,35^*$	$\pm 1,19^*$	Autorisé* : Qualitatif, Quantitatif, Relative
	manuel: Qiamp DNA mini kit (Qiagen)	VetMAX™ C. burnetii & Chlamydomphila spp. Kit (TFQQCHP)	500*	900* (2,95)	$\pm 0,35^*$	$\pm 1,19^*$	
Adiagene - Bio-X-Diagnostics	manuel: Qiamp DNA mini kit (Qiagen)	ADI143 ADIAVET COXIELLA REAL TIME (cible: <i>C. burnetii</i>)	300	500 (2,69)	$\pm 0,54$	$\pm 1,01$	Validé: Qualitatif, Quantitatif, Relative
	manuel: Nucleospin tissue (Macherey Nagel)				$\pm 0,23$	$\pm 0,55$	
	robot: Billes magnétiques ARN/ADN (Bio-X-Diagnostics)b		500	750 (2,87)	$\pm 1,02$	$\pm 1,40$	
	manuel: Qiamp DNA mini kit (Qiagen)	418025 ADIAVET CHLAMCOX REAL TIME (C. burnetii et Chlamydia abortus)	300	500 (2,69)	$\pm 0,57$	$\pm 0,67$	
	manuel: Nucleospin tissue (Macherey Nagel)				$\pm 0,31$	$\pm 0,41$	
	robot: Billes magnétiques ARN/ADN (Bio-X-Diagnostics)		500	750 (2,87)	$\pm 1,04$	$\pm 1,40$	
BioSellal	manuel: Qiamp DNA mini kit (Qiagen)	Bio-T kit Coxiella burnetii BIOTK016 (cible: <i>C. burnetii</i>)	400	500 (2,69)	$\pm 0,41$	non réalisé	Validé: Qualitatif, Quantitatif, Relative
	robot: BioExtract SuperBall (BioSellal)				$\pm 0,53$		
	manuel: BioExtract Column (BioSellal)		600	800 (2,90)	$\pm 0,42$		
	manuel: Qiamp DNA mini kit (Qiagen)	Bio-T kit Coxiella burnetii & Chlamydia abortus BIOTK039	400	500 (2,69)	$\pm 0,35$	non réalisé	
	robot: BioExtract SuperBall (BioSellal)				$\pm 0,45$		
	manuel: BioExtract Column (BioSellal)		600	800 (2,90)	$\pm 0,39$		
IdVET	manuel: Spin Universal SPIN50/250 (ID Gene™)	Kit IDQF (ID Gene™ Q Fever Triplex)	500	500 (2,69)	$\pm 0,74$	$\pm 0,59$	Validé: Qualitatif, Quantitatif, Relative
	robot: Mag Universal Extraction Kit MAG192/384 (ID Gene™)				$\pm 0,61$	$\pm 0,79$	
	robot: Mag Fast Extraction Kit MAGFAST384 (ID Gene™)				$\pm 0,57$	$\pm 0,53$	
	manuel: Spin Universal SPIN50/250 (ID Gene™)	Kit IDQFCH (ID Gene™) Q Fever-Chlamydomphila spp			$\pm 0,78$	$\pm 0,67$	
	robot: Mag Universal Extraction Kit MAG192/384 (ID Gene™)				$\pm 0,48$	$\pm 0,80$	
	robot: Mag Fast Extraction Kit MAGFAST384 (ID Gene™)				$\pm 0,58$	$\pm 0,74$	

Limites d'incertitude maximale de $\pm 0,70$ log₁₀/mL en PCRq sur l'ensemble du domaine de quantification validé (de $<10^3$ GE/ml à $\geq 10^6$ GE/ml) et, de $\pm 2,33$ Ct au seuil en PCR relative.

* Les kits "VetMAX™ Ruminant Abortion Screening Kit » et « VetMAX™ *C. burnetii* & *Chlamydophila* spp. » n'ont pas été validés a proprement parlé mais ils sont autorisés dans le cadre du diagnostic des avortements par *C. burnetii* car ils ont été comparés en PCR quantitative et en PCR relative à une méthode validée.

i. Mise en évidence d'une excrétion de C. burnetii par PCR

La mise en évidence d'une excrétion ou de la présence d'une infection chez des animaux asymptomatiques est limitée (car incertaine) en dehors d'un contexte de mises bas, car l'excrétion par voie vaginale peut diminuer rapidement post-partum, et l'excrétion dans le lait et les fèces est intermittente. Le choix de la matrice à prélever et à analyser doit tenir compte de ces cinétiques et intermittences de l'excrétion bactérienne. Il peut également s'avérer pertinent de multiplier les matrices prélevées pour augmenter la probabilité de détection [11, 15–17]. Des analyses PCR peuvent aussi être pratiquées sur écouvillons au niveau nasal [18] ou trachéal [19], mais aucune étude n'a été réalisée sur l'infection de ces sites (cinétique, fréquence et distribution) et sur les performances de la PCR (effet matrices). Ainsi, bien que très sensible d'un point de vue analytique, la PCR est probablement peu sensible d'un point de vue diagnostique en dehors d'un contexte post-avortement ou post-partum (7 jours maximum), du fait de la diversité des voies d'excrétion possibles et de l'intermittence des excrétions, pour détecter des animaux infectés et potentiellement excréteurs. La PCR présente donc un risque de faux négatifs élevé qui n'est, à notre connaissance, pas quantifié à ce jour. Autrement dit, si la sensibilité analytique de la PCR est bonne et peut être déterminée, les estimations de la sensibilité diagnostique sont nettement moins évidentes et dépendent des connaissances précises de la pathogenèse, incluant de nombreuses variabilités (espèces animales concernées, sites et moments de prélèvements, individus, etc.).

En comparaison, le risque de faux positifs apparaît nettement plus faible. La mise en évidence d'ADN de la bactérie en faible quantité sur écouvillons vaginaux ou autres prélèvements (lait, fèces) peut être due à des contaminations environnementales. Des précautions sont donc à suivre pour s'affranchir des contaminations environnementales, sur le terrain lors des écouvillonnages vaginaux (voire de cotylédons de placenta) et ensuite au laboratoire. Des fiches pratiques détaillant les modalités optimales de réalisation et de gestion prélèvements sont en accès sur le Web [20]. La détection d'ADN de *C. burnetii* dans les prélèvements de fèces pose question, car elle pourrait être liée à l'ingestion de la bactérie présente dans l'environnement de l'élevage si celui-ci est fortement contaminé [21, 22], notamment du fait de la consommation des placentas, dont les charges bactériennes peuvent compter plus 10^9 bactéries par gramme. La PCR présente également un risque de résultats faux positifs quand des réactions croisées existent avec des bactéries génétiquement proches de *C. burnetii*. A ce jour, ce problème est documenté uniquement pour les analyses portant sur les tiques, dont certaines espèces jouent un rôle de vecteurs de la fièvre Q [23–26]. En effet, les tiques hébergent fréquemment des bactéries symbiontes, appelées *Coxiella*-like endosymbionts ou CLE, dont l'ADN est amplifié par les méthodes PCR habituellement utilisées pour détecter *C. burnetii*. Le séquençage des produits d'amplification PCR est de ce fait indispensable pour différencier ces bactéries *Coxiella*-like de *C. burnetii* et doit être réalisé de façon systématique dans toute étude épidémiologique visant à évaluer le rôle des tiques dans l'épidémiologie des infections par *C. burnetii* [23, 24]. Des bactéries *Coxiella*-like ayant été occasionnellement décrites chez quelques autres espèces de vertébrés et d'invertébrés, la possibilité de réactions croisées lors d'analyses sur des matrices autres que les tiques est théoriquement possible mais elle reste probablement très anecdotique ([23, 24, 27].

ii. Imputation d'un avortement à C. burnetii par PCR

Parmi les matrices utilisables, le prélèvement de choix reste l'écouvillon vaginal (ou endocervical), qui permet en outre de rechercher d'autres agents infectieux responsables d'avortement (*Brucella* spp,

Chlamydia spp., ...), avec un conditionnement peu encombrant et des manipulations appropriées pour une sécurité biologique maximale lors du prélèvement, de l'acheminement, et aussi lors de la réception en laboratoire.

Cependant, la mise en évidence d'ADN de *C. burnetii* sur un écouvillon vaginal (ou sur tout autre prélèvement) ne permet pas de certifier que la bactérie est à l'origine de l'avortement, étant donné que i) l'infection est enzootique en France chez les ruminants [28], et ii) certains animaux excrètent la bactérie au moment de la mise bas, même en l'absence d'avortement. Pour imputer un avortement à une infection par *C. burnetii*, il est conseillé de quantifier les bactéries présentes dans l'échantillon et de ne considérer l'avortement comme potentiellement imputable à la fièvre Q qu'au-dessus de 10^4 bactéries par écouvillon [29, 30]. Cette approche permet de repérer les cas avortés présentant une colonisation bactérienne suffisamment élevée au niveau de la sphère génitale, le site pathologique concerné, pour expliquer la cause dans l'avortement. Ce seuil de 10^4 (appelé « seuil clinique » dans la suite du document) a été posé arbitrairement au regard des capacités analytiques intrinsèques de la PCR (limite de détection, exactitude) et des distributions des quantités observées sur une expérimentation caprine avec reproduction d'avortements fièvre Q. Les données permettant d'évaluer le niveau de ce seuil devraient toutefois être consolidées, notamment en fonction de chaque espèce de ruminant.

De plus, au moins deux résultats PCR positifs doivent être obtenus (deux individus ou des mélanges correspondant strictement à trois individus) pour cibler les avortements infectieux en série, à distinguer d'avortements sporadiques dont l'étiologie sera plus souvent non infectieuse [29, 31]. L'imputation d'un avortement à *C. burnetii* est donc basée sur une interprétation à l'échelle d'un groupe. Également, il est important de procéder par élimination de toutes les causes possibles pour un diagnostic d'avortement, qui est une manifestation clinique non spécifique. On doit donc aussi rechercher les autres causes infectieuses abortives. Tous ces éléments (prélèvement de choix, quantité de bactéries significative, diagnostic de groupe et différentiel) renforcent la spécificité diagnostique, sans diminuer la sensibilité du diagnostic différentiel des avortements, ce qui tend à diminuer le nombre de séries abortives sans conclusion diagnostique après investigation.

Les modalités retenues sont mises à l'épreuve dans un dispositif qui a été progressivement déployé en France depuis 2017 : l'Observatoire de Suivi des Causes infectieuses d'Avortements chez les Ruminants domestiques (OSCAR) ¹. Un bilan critique est élaboré chaque année [32] et est mis à disposition sur le site de la plateforme nationale d'épidémiologie animale [33]. Les démarches diagnostiques mises en place dans le cadre d'Oscar sont détaillées dans la fin du document (cf. recommandation d'utilisation des tests).

iii. Dépistage à l'échelle de l'élevage

La réalisation de tests à l'échelle de l'élevage peut être motivée par différents objectifs qu'il est important de prendre en compte pour choisir une méthode d'analyse, un plan d'échantillonnage et une grille d'interprétation appropriés. Ainsi, la stratégie à mettre en œuvre ne sera pas la même selon que l'objectif est, par exemple, de déterminer si au moins un animal du troupeau est infecté ou si un troupeau présente une forte prévalence. Du fait de cette diversité de « statuts ciblés », l'évaluation des performances diagnostiques des méthodes et la formulation de recommandations d'usages sont complexes à l'échelle du troupeau.

¹ <https://idele.fr/oscar/>

Les méthodes PCR sont parfois utilisées sur le lait de tank dans les élevages laitiers afin d'évaluer la présence d'animaux excréteurs de la bactérie parmi les femelles en lactation, soit lors d'études épidémiologiques [34–37], soit dans le cadre de programmes de surveillance [22, 38, 39]. Le lait de tank est un prélèvement facilement accessible, et la réalisation d'une seule analyse pour l'élevage, même répétée, est avantageuse en coût et en rapidité. Une limite néanmoins est que ce prélèvement n'est réalisable que dans les élevages laitiers. Les performances diagnostiques de la PCR sur lait de tank, pour détecter un troupeau où la bactérie *C. burnetii* est présente, n'ont à notre connaissance été évaluées que dans deux études portant uniquement sur les bovins [35, 40]. Bien que ces deux études s'appuient sur une même méthode de laboratoire, leurs résultats sont difficilement comparables, car les critères pour considérer un troupeau comme positif (statut ciblé) divergent : plus de 10% de bovins excréteurs dans l'une [35] et au moins un bovin excréteur dans l'autre [40]. Des études complémentaires sont donc nécessaires, d'une part pour étayer ces résultats pour les bovins, et d'autre part pour estimer les performances de cette méthode pour les caprins, voire les ovins. Toutefois, sur la base des données disponibles à ce jour, il semble que la recherche d'ADN de *C. burnetii* dans le lait de tank soit une méthode spécifique à l'échelle du troupeau (en dehors de la mise en place récente d'une vaccination contre *C. burnetii* dans l'élevage [41]), étant donné qu'un résultat PCR positif sur lait de tank est associé à la présence d'au moins un individu excréteur [40]. En revanche, la sensibilité d'un test PCR sur lait de tank pour détecter un troupeau positif semble varier en fonction de la proportion d'individus excréteurs : ainsi, la proportion d'élevages positifs sur le lait de tank observée par Musken *et al.* (2011) est inférieure à 50% lorsque la proportion d'individus excréteurs est inférieure à 10% [35] et supérieure à 80% lorsque la proportion d'individus excréteurs est supérieure à 10% [35]. Ces résultats suggèrent que le risque de faux négatifs est élevé lors d'une analyse PCR sur le lait de tank, notamment dans les troupeaux à faible prévalence. S'ajoute également une possible variabilité temporelle des résultats, en lien avec le fait que l'excrétion individuelle dans le lait est intermittente [17, 42, 43].

Des analyses PCR peuvent également être réalisées à partir de prélèvements environnementaux [44], tels que des poussières de bâtiments d'élevages prélevées par chiffonnette [17, 18, 40, 45]. L'avantage de ce prélèvement par rapport au lait de tank est qu'il constitue un indicateur de contamination des élevages par *C. burnetii* à l'échelle du troupeau à la fois pour les troupeaux laitiers et pour les troupeaux allaitants. Une étude considérant ainsi une grande variabilité d'élevages français a permis de montrer que la probabilité de détection de *C. burnetii* dans les poussières de bâtiments est plus grande dans les élevages caprins et ovins que dans les élevages bovins, et dans les élevages récemment confrontés à des avortements imputés à la fièvre Q par rapport à des élevages confrontés à des avortements non imputés à la fièvre Q [45, 46]. Des recherches ont été effectuées, et d'autres sont en cours, pour déterminer dans quelle mesure la charge bactérienne détectée dans les poussières peut servir de traceur de niveau de contamination et d'indicateur de risque d'exposition [17, 18].

Ces approches sont intéressantes mais encore exploratoires : des études avec des investigations croisant plusieurs types de suivis en élevages sont nécessaires mais encore rares à ce jour [47].

b. Description des méthodes ELISA

Les tests ELISA reposent sur la mise en évidence d'anticorps dirigés contre *C. burnetii*. Ils ont l'avantage d'être aussi sensibles que les tests d'immunofluorescence (IF) et leur réalisation peut être automatisée en laboratoire. L'ELISA est donc une technique réalisable à large échelle sur de nombreux échantillons et est la plus utilisée à présent en santé animale [7]. A noter, la méthode de référence en médecine humaine est une méthode d'IF « maison » uniquement pratiquée au sein du CNR Coxiella (IHU, Marseille). De plus, même si, en médecine humaine, la différenciation des anticorps en IgM et IgG

dirigés contre les bactéries de phase 1 ou 2 permet de différencier les infections aiguës des infections focalisées persistantes [48], cette interprétation n'est à ce jour pas validée en médecine vétérinaire [7]. De plus, outre le manque notamment d'outils fiables pour distinguer les préparations d'antigènes sérologiques de phase 1 et de phase 2, les études publiées sur le sujet en médecine vétérinaire posent des questions méthodologiques sur la classification des différents types d'infections [47, 49–51]. Ces tests sont donc, à ce jour, uniquement utilisés dans des protocoles de recherche et nous n'aborderons pas plus en détail cet aspect des tests ELISA.

Plusieurs méthodes sont disponibles parmi chaque principe technique possible pour la sérologie (ELISA, IF, ...). Actuellement, trois tests ELISA sont commercialisés en France et en Europe (tableau 3, [13, 52] et peuvent être utilisés sur lait ou sérum [53]. Ils fournissent un résultat quantitatif en ratio de densité optique, celui-ci étant d'autant plus élevé que la concentration d'anticorps dirigés contre *C. burnetii* présents dans l'échantillon est grande. La valeur quantitative est transformée en résultats semi-quantitatifs grâce aux règles d'interprétation (seuils de positivité) fixées par les fabricants. Certains tests incluent une gamme de résultats « douteux » séparant les résultats strictement positifs et strictement négatifs (tableau 3). Cette zone correspond le plus souvent à l'incertitude diagnostique au seuil, c'est-à-dire l'intervalle de confiance entre les populations positives et négatives, mais elle peut représenter aussi l'incertitude de mesure analytique au seuil ou le cumul des deux incertitudes. Les dossiers actuels de validation ne renseignent pas toujours sur la définition de cette zone.

Pour les trois tests ELISA, l'antigène sérologique est un mélange de bactéries en phase 1 et en phase 2 dont les proportions sont définies pour chacun des tests. Ces deux phases correspondent à des LPS (lipopolysaccharides) de longueur et conformation différente, associés à des protéines caractéristiques, et exposés sur la surface bactérienne. La phase 2 correspond à la forme tronquée de la phase 1. Les deux types de LPS présentent une immunogénicité, celle-ci étant particulièrement forte et persistante pour la partie de phase 2 qui est commune. Des différences entre les trois tests ELISA existent du fait de la souche utilisée et, potentiellement des modalités de préparation (production et purification, proportion du mélange en phases 1 et 2, contrôles de lots). Les informations sur les préparations ne sont pas partagées par les producteurs. Dans les trois cas, les antigènes étant issus de la bactérie entière, des réactions croisées sont possibles avec d'autres agents bactériens, par exemple des genres *Bartonella* ou *Legionella* [54–56] et, probablement des bactéries *Coxiella*-like [23, 24, 27].

Tableau 3 : Description des trois tests ELISA commercialisés pour le diagnostic des infections par *C. burnetii* chez les ruminants domestiques.

Nom commercial	IDEXX Q fever Ab test	PrioCHECK™ Ruminant Q Fever Ab Plate Kit	ID.Vet ID Screen® Q fever indirect multi-species
Fabricant	IDEXX	ThermoFisher Scientific	Innovative Diagnostics
Souche utilisée pour la production d'antigène	Isolée dans la tique <i>Dermacentor andersoni</i> (souche de référence Nine Mile, USA)	Isolée à partir d'une brebis (France)	Isolée à partir d'une vache (France)
Conjugué	Anticorps secondaires fixant des IgG de ruminants	Protéine G (fixant les IgG de diverses espèces de mammifères)	Protéine G (fixant les IgG de diverses espèces de mammifères)
Seuil de positivité (d'après la notice du fabricant)	ODR* < 30% : Négatif 30 < ODR < 40% : Douteux 40 < ODR : Positif	ODR < 40% : Négatif 40 < ODR < 100% : Positif + 100 < ODR < 200% : Positif ++ 200 < ODR : Positif +++	ODR < 40% : Négatif 40 < ODR < 50% : Douteux 50 < ODR < 80% : Positif 80 < ODR : Fort positif

*ODR : Ratio de Densité Optique

L'évaluation des performances analytiques des méthodes ELISA est complexe, car à la différence des méthodes PCR, leur loi dose-réponse (relation entre la quantité d'anticorps et résultats quantitatifs de l'ELISA) suit une relation sigmoïde dont la forme dépend de l'affinité entre les anticorps et l'antigène utilisé [57]. De plus, les fabricants disposent de sérums pour lesquels les renseignements sont insuffisants, les collections de sérums de statuts connus et représentatifs sont difficiles à constituer, du fait de l'absence de méthode de référence pour caractériser simplement des infections naturelles et de la lourdeur des infections expérimentales en animalerie A3 sur des ruminants. Les collections acquises sont généralement caricaturales avec d'une part des sérums très positifs et d'autre part un nombre limité de sérums vrais négatifs car ces derniers sont difficiles à qualifier. En outre, les collections manquent de représentativité en termes d'espèces animales et de territoires. Enfin, alors qu'il est relativement simple de préparer des solutions contenant une concentration définie en bactéries cibles, il est beaucoup plus complexe, voire impossible, de préparer des solutions contenant des concentrations connues en anticorps spécifiques. La validation des performances analytiques des méthodes ELISA est donc, de fait, beaucoup plus complexe que pour les méthodes PCR.

Les performances diagnostiques des trois méthodes sérologiques ont été récemment évaluées en France grâce à la modélisation de leurs résultats croisés sur près de 4500 sérums, de statuts inconnus, issus de 450 élevages représentatifs en ovins, bovins et caprins prélevés dans 10 départements couvrant la diversité des types de productions [58]. Cette approche de modélisation a permis de palier à l'absence de méthode de référence. Les résultats de cette étude (tableau 4) ont montré que les trois tests ELISA ont des sensibilités modérées à bonnes et des spécificités élevées, mais imparfaites. En outre, les performances de chacun des trois tests ne sont pas équivalentes dans les trois espèces de ruminants domestiques. Par exemple, les sensibilités des tests ELISA sont globalement plus basses chez les ovins (allant jusqu'à moins de 40% pour le test IDEXX) et leurs spécificités sont moins élevées chez les bovins (94,8% pour le test ID.Vet).

Tableau 4 : Médiane et intervalle de crédibilité à 95 % des valeurs de sensibilité et spécificité estimées par le modèle (Lurier et al. 2021) pour les trois tests ELISA commercialisés pour le diagnostic sérologique des infections par *C. burnetii*.

		Bovin	Caprin	Ovin
IDEXX Q fever Ab test	Se	72,0 [61,8 ; 80,8]	59,2 [53,5 ; 64,1]	39,3 [30,7 ; 47,0]
	Sp	95,9 [94,2 ; 97,7] *	99,1 [98,2 ; 99,7]	99,2 [98,5 ; 99,7]
PrioCHECK™ Ruminant Q Fever Ab Plate Kit	Se	61,9 [51,7 ; 71,8]	75,2 [68,4 ; 79,9]	53,8 [43,3 ; 61,8]
	Sp	97,5 [96,2 ; 98,7]	99,1 [98,1 ; 99,7]	98,4 [97,4 ; 99,3]
ID.Vet ID Screen® Q fever indirect multi-species	Se	89,0 [78,5 ; 94,1]	90,5 [83,3 ; 93,8]	86,9 [71,2 ; 93,6]
	Sp	94,8 [92,1 ; 97,8]	96,0 [93,7 ; 97,6]	98,5 [97,3 ; 99,4]

* La spécificité du test IDEXX peut être moins élevée dans certaines zones géographiques chez les bovins [58]

Ces performances de sensibilité et spécificité diagnostiques évaluées concernent des applications de dépistage et des enquêtes épidémiologiques. Des collections de sérums représentatives et ciblées seraient requises pour estimer les performances vis-à-vis des divers stades et formes d'infection.

*i. Diagnostic sérologique et détection des infections par *C. burnetii**

Au-delà des possibles erreurs diagnostiques caractérisées par les sensibilité et spécificité des méthodes, la principale limite pour l'interprétation du résultat des tests sérologiques est la longue persistance des anticorps après l'infection. La présence d'anticorps dirigés contre *C. burnetii* peut être

le reflet d'une infection antérieure de l'animal par *C. burnetii* sans possibilité ni de dater l'ancienneté de l'infection ni de déterminer si l'infection, qui peut parfois durer plusieurs années [59, 60], est toujours active ou latente et à risque de recrudescence [61].

De nombreux cas d'individus excréteurs de *C. burnetii*, mais négatifs en ELISA, ont également été rapportés à la fois avec le test IDEXX (Natale et al., 2012; Rousset et al., 2009), le test PrioCHECK (de Cremoux et al., 2012; Djerbib et al., 2018; Guatteo et al., 2007) et le test ID.Vet (Joulié et al., 2017). Certains de ces cas pourraient être expliqués par une infection ancienne avec des niveaux d'anticorps non détectés selon les seuils des tests utilisés, ou par une infection récente (séroconversions non détectées, cinétiques variables selon les individus). Néanmoins ces individus séronégatifs peuvent représenter une part importante des excréteurs (Djerbib et al., 2018; Rousset et al., 2009) et des individus séronégatifs et excréteurs de façon répétée pendant plusieurs mois sont également rapportés (Guatteo et al., 2007). On peut supposer que les antigènes utilisés dans les tests sérologiques ne permettent pas toujours de détecter la diversité des anticorps synthétisés en réponse aux diverses souches circulantes de *C. burnetii* (voir Spécificité analytique et notion « inclusivité » dans le glossaire). Il est aussi possible, en lien avec le caractère intracellulaire de la bactérie, que la réponse immunitaire humorale ne soit pas prépondérante chez certains individus qui pourraient alors rester séronégatifs même après une infection par *C. burnetii* [10, 11]. De ce fait, l'interprétation d'un résultat sérologique isolé sur un animal n'est pas pertinente, et le dépistage sérologique doit toujours être réalisé à l'échelle d'un groupe d'individus pour pouvoir être interprété.

En outre, il est important de garder en tête que, en l'absence de test sérologique DIVA (pour *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) permettant de différencier les animaux naturellement infectés des animaux vaccinés, les individus vaccinés sont séropositifs en ELISA après vaccination, ce qui complique l'interprétation des résultats dans les troupeaux ayant mis en place un plan de vaccination ou ayant introduit des animaux vaccinés.

ii. Dépistage sérologique à l'échelle du troupeau

Actuellement, deux types de plans de dépistage sérologique sont classiquement préconisés et utilisés en France :

- Le plan « N=15 », qui vise à détecter tous les troupeaux séropositifs, dans le cadre duquel 15 individus sont prélevés par troupeau, ce dernier étant considéré séropositif si au moins un individu est testé positif. Ce plan a été utilisé lors de l'enquête sérologique réalisée entre 2012 et 2015 dans 10 départements français [28, 66]. C'est également celui retenu pour la recherche des élevages susceptibles de représenter un risque zoonotique lors de la survenue de cas humains groupés [67].
- le plan « OSCAR », qui vise à identifier les troupeaux à forte séroprévalence, dans le cadre duquel 6 bovins ou 10 ovins/caprins sont prélevés par troupeau, ce dernier étant considéré séropositif si plus de la moitié des individus prélevés sont testés positifs. Ce plan a été établi pour le dépistage sérologique de la fièvre Q chez les congénères de femelles avortées dans le cadre du dispositif Oscar [68, 69].

A notre connaissance, les performances diagnostiques à l'échelle de l'élevage du plan de dépistage sérologique « OSCAR » pour compléter les résultats de diagnostic par PCR et imputer ou non des avortements à *C. burnetii* n'ont pas été évaluées à ce jour. Le plan de dépistage sérologique « N=15 » a une sensibilité à l'échelle du troupeau élevée (86 à 99% en fonction de l'espèce et du test considérés), mais une spécificité à l'échelle du troupeau variable de 45% chez les bovins avec le kit IDVET à 89% chez les ovins avec le kit IDEXX [58]. Cela en fait un plan de dépistage intéressant pour

identifier des troupeaux potentiellement séropositifs, mais ces résultats doivent donc être confirmés par d'autres méthodes si l'on veut confirmer la présence de *C. burnetii* dans l'élevage. D'autres plans de dépistage sérologique présentant un meilleur compromis entre les Se et Sp à l'échelle du troupeau peuvent être proposés. Ainsi, le nombre optimal d'individus à prélever pour maximiser à la fois les sensibilité et spécificité à l'échelle du troupeau a été estimé pour chaque test et chaque espèce à partir des estimations des Se et Sp à l'échelle individuelle. Ces résultats sont disponibles dans l'article scientifique libre d'accès correspondant (Lurier et al., 2021).

Les méthodes ELISA sont parfois réalisées sur le lait de tank pour évaluer le statut sérologique des troupeaux laitiers ou estimer la proportion de femelles en lactation séropositives [35, 36, 70, 71]. Malgré une bonne corrélation entre les résultats obtenus sur des prélèvements de sérum et de lait réalisés sur les mêmes individus au même moment (Joulié et al., 2017; Paul et al., 2014), la corrélation entre le niveau d'anticorps mesurés dans le lait de tank et la proportion d'animaux séropositifs en lactation peut être modérée (Taurel et al., 2012). Les performances de ces méthodes appliquées sur le lait de tank pour évaluer le statut de l'élevage n'ont, à notre connaissance, pas été évaluées à ce jour.

II. Contributions du LNR sur la qualité des résultats diagnostiques

Des concertations sont actuellement conduites par l'Anses afin de proposer une évolution importante du dispositif pour les contrôles des tests commercialisés (également appelés kits ou réactifs) en santé animale. Le nouveau dispositif sera opérationnel lorsque le ministère chargé de l'agriculture aura publié un arrêté ministériel qui définira le lien entre les catégories relatives aux modalités de contrôle des réactifs (normes AFNOR U47-310 et -311, – A : aucun contrôle – B : contrôle initial du réactif – C : contrôle initial et contrôle des lots) et les maladies infectieuses catégorisées par ailleurs dans la Loi de Santé Animale (LSA, règlement européen 2016/429), entrée en vigueur en avril 2021.

Les kits diagnostiques pour la fièvre Q ont été commercialisés sans aucun agrément par le ministère en charge de l'agriculture. C'est pourquoi, de façon proactive, le LNR fièvre Q s'implique depuis plusieurs années auprès des fabricants de kits et des laboratoires d'analyses, dans le respect des règles d'impartialité avec le secteur privé, pour contribuer à mieux cadrer des exigences communes. De plus, la nouvelle LSA implique un changement important : la fièvre Q passe du statut de Danger sanitaire de catégorie 3 (DS3) en France à celui de catégorie E, ce qui signifie qu'elle doit faire l'objet d'une surveillance obligatoire sur le territoire. Un bilan est dressé ici sur les actions conduites jusqu'à présent par le LNR, et qui s'avèrent en adéquation avec les futures évolutions du dispositif français de contrôles des réactifs diagnostiques et les révisions des normes.

a. Evaluation des performances analytiques initiales

PCR

Dès 2011, conjointement à la parution de la norme ad-hoc (AFNOR U47-600 relative à la PCR en santé animale), des méthodes PCR sur matrices vaginale et placentaire, prélevées sur écouvillon, ont été validées pour le diagnostic d'avortement par deux producteurs de kits, AdiaGene (BioX Diagnostics) et LSI (ThermoFisher) [73]. Pour cela, un cahier des charges a été établi par le LNR d'après les modalités diagnostiques posées et les besoins de performance attendus [29, 30]. La mise en œuvre en laboratoire a été vérifiée grâce à une série d'essais suivie par le LNR, ce qui a conditionné l'agrément de 10 laboratoires par la DGAL pour la réalisation de ces analyses en 2012 [73]. Pour ces 2 premières étapes, les matériaux de référence (MRs) ont été fournis par le LNR aux producteurs de kits et aux laboratoires.

Pour le suivi de la qualité des analyses en routine, le LNR a proposé une carte de contrôle basée sur un matériau de référence interne (MRI) commun, préparé de façon standardisée à partir du MR bactérien du LNR, calé au seuil d'interprétation de chaque kit et permettant de tracer l'exactitude des résultats (voir le terme « exactitude » dans le Glossaire). Les données obtenues pour les MRI traceurs, durant les 3 années d'un programme pilote de surveillance, ont été remontées par les laboratoires agréés et ont été exploitées : l'harmonisation entre toutes les méthodes PCRq a été vérifiée et les limites maximales de variabilité des mesures ont été confortées ($\pm 0,70 \log_{10}$). De plus, ces résultats ont ensuite permis de mettre en œuvre une PCR « relative au seuil d'interprétation » correspondant au « seuil clinique abortif » (voir paragraphe « Imputation d'un avortement à *C. burnetii* par PCR »), qui est moins coûteuse que la PCR quantitative et suffisamment informative pour le diagnostic d'avortement de la fièvre Q. Ce nouveau type de PCR ayant été intégré à la révision de la norme AFNOR U47-600 en 2015, le LNR a ensuite accompagné les fabricants pour les validations des PCR relatives pour *C. burnetii* (comme en 2011 pour les PCR quantitatives). La validation d'une PCR « relative » implique la détermination de la fidélité au seuil d'interprétation, en plus de la validation tous les paramètres requis pour la PCR quantitative. Le LNR a élaboré des consignes spécifiques aux laboratoires d'analyses vétérinaires pour la restitution des résultats, en particulier à ceux impliqués dans le réseau OSCAR [13].

Cet accompagnement auprès des producteurs de kits a été complété par des validations d'autres méthodes de performances équivalentes (Biosellal et IDvet/Innovative diagnostics), des évolutions des dossiers de validation existants avec des méthodes d'extraction supplémentaires (tableau 2). A ce jour, deux types de prélèvement sont reconnus pertinents et validés pour rechercher la cause d'une série d'avortements par PCR :

- Ecouvillon vaginal (ou endocervical), prélevé dans les 7 jours au maximum après avortements,
- Ecouvillon placentaire, effectué sur 3 cotylédons différents d'un même placenta de préférence collectés *in utero*.

Les validations n'ont pas été réalisées sur les organes de l'avorton (foie, poumon, rate ou contenu stomacal). Ces derniers sont encore toutefois utilisés par les vétérinaires pour le diagnostic différentiel des avortements sur la base de connaissances empiriques. Les limites liées à ces prélèvements sont le manque de connaissance de la pathogenèse de la fièvre Q au niveau de l'avorton, et pour les organes en particulier, la difficulté à assurer un prélèvement représentatif. Le risque de faux négatifs apparaît donc élevé, ce qui affecte la sensibilité diagnostique. À l'inverse, on considère que la spécificité diagnostique est de 100% : si *C. burnetii* est détecté dans l'avorton, l'avortement peut être imputé à la fièvre Q.

Les notices des fabricants pour les méthodes validées et commercialisées mentionnent les consignes du diagnostic abortif de la fièvre Q (types de prélèvements et préparations, seuils d'interprétation). Une vérification documentaire est réalisée par le LNR pour garantir la cohérence entre les notices. Ces dernières années, le LNR encourage les producteurs à réaliser les validations analytiques sur d'autres matrices, comme les fèces ou les poussières de bâtiments d'élevage.

ELISA

L'action principale du LNR a été de proposer, aux fabricants de kits, un matériau de référence calibrant (MR sérum calibrant pour ELISA, voir définition « Matériau de référence » dans le Glossaire) pour contribuer à une meilleure standardisation de la méthode ELISA, l'un des facteurs clés pour la qualité des résultats produits (restitution semi-quantitative relativement au seuil).

Ainsi, des modalités de contrôles qualité des lots de kits (voir définition dans le Glossaire) ont été convenues avec les fabricants afin de garantir des résultats quantitatifs reproductibles dans la zone critique du seuil de positivité et d'avoir la connaissance de la variabilité des mesures dans cette zone [74]. Un plan d'expériences et de calculs similaire a été ainsi intégré aux contrôles qualité de lots pour les trois fabricants afin de présenter les données de variabilité de chaque nouveau lot sur le certificat (répétabilité intra-plaque sur environ 30 répliques, reproductibilité inter-plaques sur 3 essais indépendants, valeur moyenne). Durant plusieurs années, chaque fabricant avait en charge de préparer des matériaux de référence internes (MRI), par dilution du MR commun, à deux niveaux proches du seuil de positivité de son kit ELISA (un plutôt au-dessus et un plutôt au-dessous). Chaque fabricant de kits ayant choisi son seuil de positivité sans possibilité d'harmonisation avec les autres kits, les MRI calibrant associés à chaque kit sont réalisés à des dilutions différentes (par exemple le niveau le plus élevé correspond à un MR pur pour le test IDEXX, dilué au 1/2 pour le test PrioCHECK et dilué au 1/4 pour le test ID.Vet). Les trois tests commercialisés détectent donc des concentrations en anticorps différentes sur un même sérum (plus faible pour le test ID.Vet et plus élevée pour le test IDEXX).

L'observation des données sur de nombreux lots, successivement produits pour chaque kit, avec un même plan d'expérience et un seul MRI calibrant testé, a permis de proposer des critères fixes sur l'incertitude analytique au seuil. Dorénavant, les résultats du MRI calibrant au seuil permettront l'acceptation d'un nouveau lot, pour sa distribution aux clients, si les résultats d'essais de reproductibilité définis présente un coefficient de variation acceptable et que la moyenne est comprise entre les limites de variabilité maximales par rapport à une valeur attendue (fiche de consignes sur les lots de chaque kit ELISA à venir sur la page Anses Sophia-Antipolis). Les nouveaux certificats de lots, spécifiant les critères d'acceptation du MRI calibrant, sont mis en place courant 2022. Auparavant, les habitudes des laboratoires d'analyses étaient d'ouvrir une carte de contrôle pour chaque nouveau lot de kit ELISA, suggérant des variabilités significatives entre lots. Grâce à ces nouvelles dispositions, le laboratoire utilisateur est encouragé à mettre en place une carte de contrôle de la méthode ELISA utilisée, tous lots confondus, en se basant sur un contrôle autour du seuil de positivité pour tracer la reproductibilité, mais aussi la justesse de ses résultats d'analyses.

De plus, certaines pistes peuvent à présent être envisagées grâce à des approches de modélisation pour contribuer à l'harmonisation des méthodes afin de limiter les résultats discordants entre elles et de permettre au LNR de proposer un MR de détectabilité en ELISA [75].

b. Maintien des performances analytiques à l'échelle d'un réseau de laboratoires

Le laboratoire d'application met en œuvre les moyens nécessaires afin de ne pas dégrader les performances initiales validées ou évaluées. Il utilise une méthode standard (lots de kits calibrés, mode opératoire figé) et s'assure que les performances sont maîtrisées et maintenues en suivant les recommandations et exigences prônées dans le cadre des accréditations de méthodes (norme ISO 17025). Le LNR contribue à deux types de vérification avec les laboratoires :

L'inclusion, au sein de chaque série d'analyses, d'un MRI traceur permet de suivre ses résultats au sein d'une carte de contrôle. Il s'agit d'une évaluation interne en continu, afin d'anticiper les dérives progressives ou d'alerter en cas de défaut ponctuel majeur qui impacte les résultats d'analyses. Outre les MRs fournis par le LNR, des propositions sont également émises pour l'élaboration des cartes de contrôle. En PCR, la carte de contrôle est basée sur un MRI dont la valeur est connue (seuil de 10^4 bactéries par écouvillon préparé selon un protocole commun à partir du MR bactérien du LNR) et dont les limites maximales d'acceptation sont définies ($0,70 \log_{10}$ exigées pour les validations initiales). Cette carte permet une exploitation immédiate dès son ouverture. En ELISA, des progrès seront

proposés avec l'élaboration d'une carte de contrôle « tous lots ». Cette approche est cohérente avec l'utilisation d'une méthode standardisée et est aussi plus efficace qu'une approche par lot. Elle permet de ne pas avoir à renouveler, pour chaque lot, la phase d'entrée pour fixer les limites d'acceptabilité du résultat du traceur, qui nécessite de capitaliser au moins 30 séries d'analyses indépendantes et est rarement réalisé en pratique.

Le LNR organise aussi une évaluation ponctuelle externe de l'aptitude des laboratoires à obtenir des résultats corrects à partir d'un panel d'échantillons [73, 74]. Ces essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) portent sur l'ensemble des tests PCR et ELISA commercialisés pour le diagnostic de la fièvre Q chez les ruminants domestiques (respectivement pour plus de 50 et 70 participants). Un rapport général anonymé est produit : chaque laboratoire est évalué individuellement et peut comparer ses performances avec celles des autres laboratoires participants au même EILA et donc mieux appréhender si des progrès sont possibles. De plus, la démarche permet d'observer la cohérence des données produites à l'échelle d'un réseau de laboratoire, et donc de connaître la qualité des données pour une surveillance nationale.

Pour résumer, la tableau ci-dessous illustre l'état des avancées sur la qualité des résultats produits par les laboratoires d'application.

Tableau 5 : Avancées en matière de standardisation des méthodes diagnostiques pour la fièvre Q, leurs validation et maintien des performances (☒ : réalisé ; ☐ non réalisé ; ☐☒ en cours de réalisation)

Actions et outils	PCR (temps réel)	ELISA (indirect)
<u>Matériaux de référence communs à disposition</u>	Pour les validations (MR bactérie et MR ADN génomique) ☒	Pour la calibration des lots (autour de chaque seuil de positivité des 3 kits) ☒
	Pour les analyses (MRI bactérien au seuil clinique) ☒	Pour l'harmonisation des seuils de positivité (étalon de détectabilité) ☐
<u>Validations et/ou évaluations des performances</u>	Méthodes basées sur kits validées pour le diagnostic abortif (normes AFNOR) ☒	Méthodes basées sur kits validées pour l'épidémiologie (modèles statistiques) ☒
	D'autres matrices biologiques (lait, fécès, poussières) ☐☒	Recherches en vue d'une méthode ou un antigène sérologique de référence ☐
<u>Plans pour le maintien des performances</u>	Essais d'adoption des performances initiales au laboratoire ☒	Essais bilatéraux (utilisant les panels qualifiés d'EILA) ☒
	Cartes de contrôle (PCRq et PCR relative) ☒	Standardisation de chaque kit en tant que méthode (carte de contrôle à améliorer : « tous lots ») ☐☒
	EILA réguliers (depuis 2017) ☒	EILA réguliers (depuis 2001) ☒

Si les méthodes PCR commercialisées sont standardisées, validées et harmonisées, et les moyens pour le maintien des performances analytiques sont en place, des progrès sont encore nécessaires pour les kits ELISA. La standardisation est en bonne voie, et l'harmonisation entre les méthodes ELISA constitue le prochain enjeu [75]. Des recherches et développement sont également nécessaires pour mettre à disposition un antigène sérologique de référence.

III. Recommandations d'usage des tests

La connaissance de performances analytiques et/ou diagnostiques sert de base à plusieurs groupes d'experts pour émettre des recommandations d'usage de chaque méthode en fonction de l'objectif d'utilisation des tests. Ainsi, étant données les limites inhérentes aux méthodes directes (excrétion intermittente, diverses voies non concomitantes) et indirectes (délai d'apparition puis persistance des anticorps, réimmunisation naturelle ou baisse de la concentration sérique, impossibilité d'utilisation dans des troupeaux vaccinés), il est recommandé d'utiliser à la fois des méthodes directe et indirecte pour évaluer les statuts des individus et des élevages [7]. La plupart des procédures de diagnostic et de dépistage mises en place en élevage pour rechercher la cause d'un épisode abortif ou pour rechercher la source de contamination de cas humains combinent à la fois l'utilisation de PCR, pour rechercher des animaux potentiellement excréteurs de la bactérie, et d'ELISA, pour rechercher des animaux préalablement infectés par *C. burnetii* (porteurs latents ou exposés et assainis).

a. Pour le diagnostic différentiel des avortements

Dans un contexte abortif (comme dans le cadre du dispositif OSCAR), pour attribuer une série d'avortements à *C. burnetii*, les experts de la plateforme nationale d'épidémiologie en santé animale (ESA) recommandent de réaliser au minimum deux écouvillons vaginaux sur des femelles ayant eu des troubles abortifs depuis moins de 8 jours et des prises de sang pour sérologies chez des femelles ayant avorté ou présentant des troubles de reproduction depuis plus de 15 jours (6 femelles chez les bovins et 10 chez les ovins et caprins) [6, 29, 30, 68, 69]. Chez les petits ruminants, les avortements sont imputés à la fièvre Q si plus de 10^4 génomes-équivalents de *C. burnetii* sont quantifiés par PCR (10^3 pour des analyses de mélange) sur les deux écouvillons vaginaux ou si un des deux écouvillons est positif et que plus de 50% des individus sont positifs avec le test ELISA utilisé (Figure 1). À l'inverse, les avortements ne sont pas imputés à la fièvre Q si les deux PCR sur écouvillon vaginal sont négatives. Si une seule des deux PCR est positive et que moins de 50% des ruminants prélevés sont positifs en sérologie alors le résultat du plan de diagnostic est considéré comme non conclusif (Figure 1). En l'état actuel, les trois tests ELISA disponibles et les méthodes PCR validées sont recommandées pour le diagnostic différentiel des avortements [14, 68, 69].

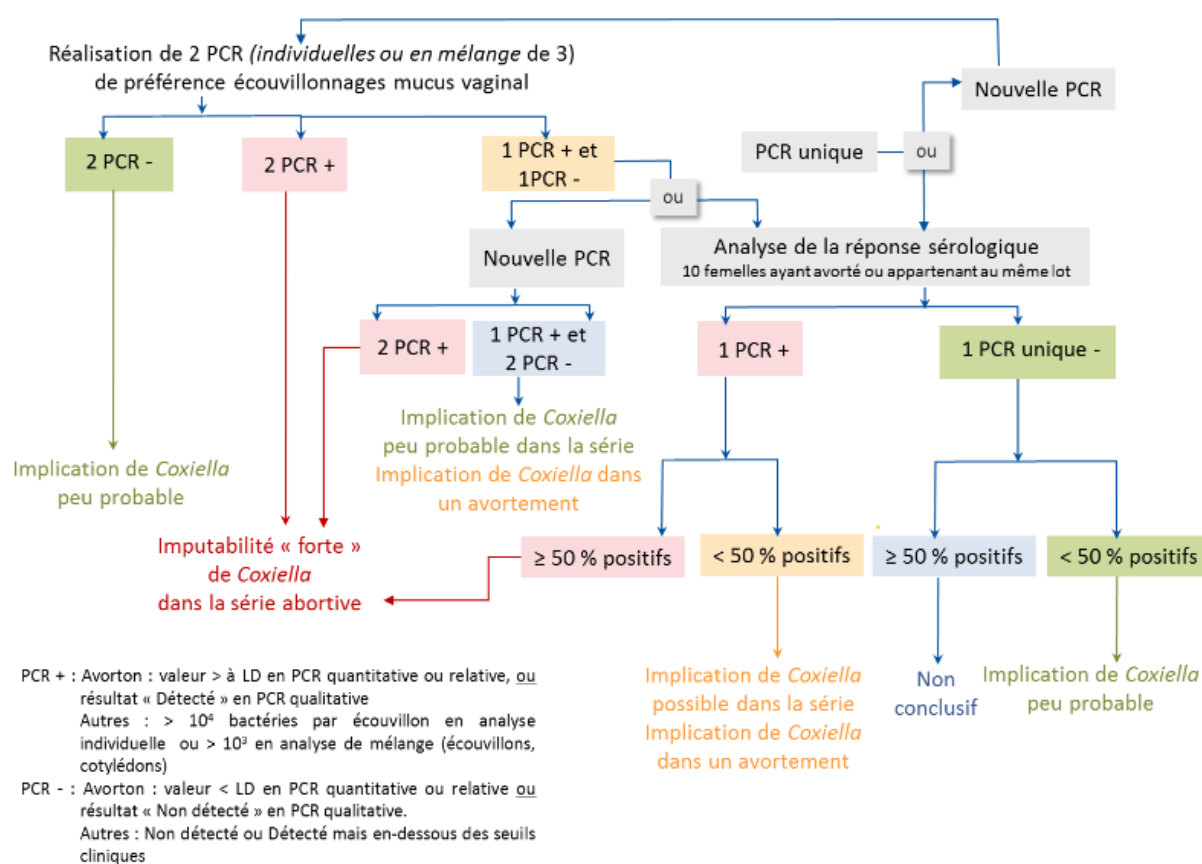


Figure 1 : Prélèvements recommandés et arbres d'interprétation pour imputer un avortement à *C. burnetii* chez les petits ruminants dans le cadre du protocole harmonisé pour le dispositif OSCAR. (Source : [69])

b. Pour le contrôle avant l'introduction

Lors de l'introduction d'un ou plusieurs animaux dans un élevage (achat ou regroupement de troupeaux), il peut être intéressant de prévenir l'introduction d'un animal potentiellement infecté par *C. burnetii* pour limiter le risque de nouvelles infections dans le troupeau.

Du fait de l'intermittence de l'excrétion de la bactérie et de la multitude des voies d'excrétion possibles, le diagnostic direct par PCR des individus introduits n'est pas recommandé, quelle que soit la matrice de prélèvement, car cette approche présente un risque élevé de faux positifs même si ce risque n'est pas clairement quantifié à ce jour. De même, les tests ELISA présentent à la fois un risque de faux positifs et de faux négatifs et leur interprétation à l'échelle individuelle est délicate. En résumé, le dépistage seul de l'animal ou des animaux introduits n'est pas recommandé pour prévenir l'introduction de la bactérie dans un élevage.

Dans ce contexte, il est recommandé de réaliser un dépistage à l'échelle du troupeau de provenance pour évaluer le risque d'introduction d'animaux issus d'un élevage où *C. burnetii* serait présente. L'utilisation d'une combinaison de méthodes PCR ou ELISA sur le lait de tank, ou la réalisation d'un plan de dépistage sérologique sur prises de sang individuelles, voire la recherche de la bactérie dans les poussières de bâtiment d'élevage, sont des pistes intéressantes pour évaluer le statut des élevages de ruminants domestiques. Dans la mesure où les résultats sérologiques ou environnementaux peuvent révéler une circulation bactérienne passée, des études sont nécessaires pour évaluer si des indicateurs peuvent être définis sur la base de seuils d'interprétation (seuil d'une forte séropositivité, d'une charge bactérienne significative dans l'environnement). Des travaux sont en cours pour émettre des recommandations en termes de nombre d'animaux à prélever et pour fournir des outils d'aide à l'interprétation des résultats des plans de dépistages sérologiques en élevages.

Conclusion

De nombreux travaux ont été réalisés à ce jour pour évaluer les performances analytiques et diagnostiques des méthodes utilisables pour le diagnostic des infections par *C. burnetii* chez les ruminants domestiques. L'évaluation des performances a abouti à la réalisation de recommandations d'interprétation conjointe des résultats de PCR et d'ELISA pour l'imputation des avortements à *C. burnetii*. D'autres études sont nécessaires pour mieux caractériser les performances de ces méthodes dans des contextes différents (dépistage avant achat ou avant export, protocoles selon les types de surveillance) ou sur d'autres matrices (lait de tank, prélèvements environnementaux, ...). Les projets collaboratifs avec le LNR, en tant que laboratoire de référence et de recherches, seront poursuivis sur les besoins diagnostiques principaux et les démarches nationales d'épidémiologie et de contrôle. Mobilisé aussi sur un projet visant à améliorer la qualité et l'exploitation des données de surveillance des zoonoses en Europe (2021-2024)[5] et laboratoire expert pour l'OIE, le LNR continuera à promouvoir une cohérence au plan européen et international et à pointer les besoins et développements.

Du fait de l'ensemble de ces travaux, la fièvre Q s'inscrit comme l'une des maladies animales zoonotiques pour laquelle on a à présent une meilleure connaissance des performances analytiques et diagnostiques des méthodes de laboratoire disponibles. L'interprétation des résultats des tests est facilitée grâce aux recommandations de groupes d'experts et certains programmes d'envergure nationale [28, 32]. En outre, des outils de calcul sont en cours de développement pour accompagner l'utilisation des tests sérologiques selon les espèces animales ciblées et pour optimiser l'établissement des plans d'échantillonnage. La démarche des missions de référence sur les méthodes et l'approche statistique mise en place pour évaluer les performances diagnostiques des tests ELISA pourraient s'intégrer dans une réflexion plus large d'amélioration de l'appui au diagnostic pour les vétérinaires sur le terrain et pour la surveillance de nombreuses maladies.

Références

1. Newberry, Colling (2021) Quality standards and guidelines for test validation for infectious diseases in veterinary laboratories. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot* 40:. <https://doi.org/10.20506/rst.40.1.3220>
2. ISO Guide 30 (1992) Termes et définitions utilisés en rapport avec les matériaux de référence — Amendement 1: Révision des définitions de matériau de référence et de matériau de référence certifié
3. OIE (2013) Principes de la validation des épreuves de diagnostic des maladies infectieuses. In: OIE Terrestrial Manual 2018. pp 560–577
4. (2018) Règlement d'exécution (UE) 2018/1882
5. EFSA (2021) Manual for reporting on zoonoses and zoonotic agents, within the framework of Directive 2003/99/EC, and on some other pathogenic microbiological agents for information derived from the year 2021 | EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/pub/en-7130>. Accessed 12 Apr 2022
6. Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest HIJ, Thiéry R (2010) Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of Q-fever in animals in the European Union. *EFSA Support Publ* 7:48E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2010.EN-48>
7. OIE (2018) Q fever - Terrestrial Animals (mammals, birds and bees). Contributeurs : Rousset, E., Niemczuk K.. In: OIE Terrestrial Manual 2018. pp 560–577
8. Limonard GJM, Thijsen SF, Bossink AW, Asscheman A, Bouwman JJM (2012) Developing a new clinical tool for diagnosing chronic Q fever: the *Coxiella* ELISPOT. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64:57–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00890.x>
9. Schoffelen T, Limonard GJM, Bleeker-Rovers CP, Bouwman JJM, Meer JWM van der, Nabuurs-Franssen M, Sprong T, Deuren M van (2014) Diagnosis of *Coxiella burnetii* Infection: Comparison of a Whole Blood Interferon-Gamma Production Assay and a *Coxiella* ELISPOT. *PLOS ONE* 9:e103749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103749>
10. Roest HI, Post J, van Gelderen B, van Zijderveld FG, Rebel JM (2013) Q fever in pregnant goats: humoral and cellular immune responses. *Vet Res* 44:67. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-67>
11. Rousset E, Berri M, Durand B, Dufour P, Prigent M, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A (2009) *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of Q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl Environ Microbiol* 75:428–433. <https://doi.org/10.1128/AEM.00690-08>
12. AFNOR (2015) NF U47-600 Méthodes d'analyse en santé animale - PCR (réaction de polymérisation en chaîne). <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-u47-600-1/methodes-d-analyse-en-sante-animale-pcr-reaction-de-polymerisation-en-chaine-partie-1-exigences-et-recommandations-pour-/article/814081/fa182884>. Accessed 21 Jun 2021
13. Anses (2022) Activités de référence du laboratoire de Sophia Antipolis | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

<https://www.anses.fr/fr/content/activit%C3%A9s-de-r%C3%A9f%C3%A9rence-du-laboratoire-de-sophia-antipolis>. Accessed 8 Mar 2022

14. Anses, LNR Fièvre Q (2021) Liste des méthodes PCR (temps réel) pour la recherche de *Coxiella burnetii* pour le diagnostic d'avortement. <https://www.anses.fr/fr/content/activit%C3%A9s-de-r%C3%A9f%C3%A9rence-du-laboratoire-de-sophia-antipolis>
15. Dubuc-Forfait C, Rousset E, Champion JL, Marois M, Dufour P, Zerhaoui E, Thiéry R, Sabatier P (2009) Démarche d'appréciation du risque d'excrétion de *Coxiella burnetii* dans les troupeaux caprins laitiers dans le sud-est de la France. *Epidémiologie Santé Anim* 55:117–136
16. Guatteo R, Beaudeau F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H (2006) Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res* 37:827–833. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006038>
17. Joulié A, Laroucau K, Bailly X, Prigent M, Gasqui P, Lepetitcolin E, Blanchard B, Rousset E, Sidi-Boumedine K, Jourdain E (2015) Circulation of *Coxiella burnetii* in a Naturally Infected Flock of Dairy Sheep: Shedding Dynamics, Environmental Contamination, and Genotype Diversity. *Appl Environ Microbiol* 81:7253–7260. <https://doi.org/10.1128/AEM.02180-15>
18. Rousset E, Poivre M, Lafon J, Gache K, Richard T, Jourdain E (2020) Investigation épidémiologique sur une exploitation ovine laitière d'un lycée professionnel agricole suite à des signalements de cas humains de fièvre Q. Maisons-Alfort, France.
19. de Bruin A, van Alphen PTW, van der Plaats RQJ, de Heer LND, Reusken CBEM, van Rotterdam BJ, Janse I (2012) Molecular typing of *Coxiella burnetii* from animal and environmental matrices during Q fever epidemics in the Netherlands. *BMC Vet Res* 8:165. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-165>
20. OSCAR (2016) Commémoratifs et prélèvements lors d'épisodes abortifs : en pratique. https://idele.fr/oscar/publications/detail-article?tx_atolidelecontenus_publicationdetail%5Baction%5D=showDossier&tx_atolidelecontenus_publicationdetail%5Bcontroller%5D=Detail&tx_atolidelecontenus_publicationdetail%5Bpublication%5D=720&cHash=73878f7cc3f1655da60701f6c785d5c8. Accessed 8 Mar 2022
21. Roest H-J, Gelderen B van, Dinkla A, Frangoulidis D, Zijderveld F van, Rebel J, Keulen L van (2012) Q Fever in Pregnant Goats: Pathogenesis and Excretion of *Coxiella burnetii*. *PLOS ONE* 7:e48949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048949>
22. van den Brom R, van Engelen E, Roest HIJ, van der Hoek W, Vellema P (2015) *Coxiella burnetii* infections in sheep or goats: an opinionated review. *Vet Microbiol* 181:119–129. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.011>
23. Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E (2015) The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends Parasitol* 31:536–552. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.014>
24. Jourdain E, Duron O, Barry S, González-Acuña D, Sidi-Boumedine K (2015) Molecular methods routinely used to detect *Coxiella burnetii* in ticks cross-react with *Coxiella*-like bacteria. *Infect Ecol Epidemiol* 5:29230. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.29230>

25. Körner S, Makert GR, Ulbert S, Pfeffer M, Mertens-Scholz K (2021) The Prevalence of *Coxiella burnetii* in Hard Ticks in Europe and Their Role in Q Fever Transmission Revisited-A Systematic Review. *Front Vet Sci* 8:655715. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.655715>
26. Yessinou RE, Katja M-S, Heinrich N, Farougou S (2022) Prevalence of *Coxiella*-infections in ticks - review and meta-analysis. *Ticks Tick-Borne Dis* 13:101926. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101926>
27. Brenner AE, Muñoz-Leal S, Sachan M, Labruna MB, Raghavan R (2021) *Coxiella burnetii* and Related Tick Endosymbionts Evolved from Pathogenic Ancestors. *Genome Biol Evol* 13:evab108. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab108>
28. Gache K, Rousset E, Perrin JB, DE Cremoux R, Hosteing S, Jourdain E, Guatteo R, Nicollet P, Touratier A, Calavas D, Sala C (2017) Estimation of the frequency of Q fever in sheep, goat and cattle herds in France: results of a 3-year study of the seroprevalence of Q fever and excretion level of *Coxiella burnetii* in abortive episodes. *Epidemiol Infect* 145:3131–3142. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002308>
29. Dufour B, Beaudeau F, Rodolakis A, Thiéry R, Bendali F, Buret Y, De Cremoux R, Dion F, Joly A, Touratier A, Simon J, Baurier F, Nicolet P, Languille J, Dufour A, Angor M (2007) Proposition de plan de maîtrise de la fièvre Q dans les élevages cliniquement atteints. Rapport final du groupe de travail ACERSA. ACERSA
30. EFSA (2010) Scientific Opinion on Q fever. *EFSA J* 8:1595. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1595>
31. de Cremoux R, Gache K, Rousset E, Sala C, Hosteing S, Nicollet P, Lars F, Guatteo R, Dion F, Calavas D, Bronner A, Perrin J-B, Touratier A (2018) A pilot program for clinical Q fever surveillance as a first step for a standardized differential diagnosis of abortions: Organizational lessons applied to goats farms. *Small Rumin Res* 163:60–64. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.09.008>
32. OSCAR (2022) Observatoire et suivi des causes d’avortements chez les ruminants Bilan 2021
33. Plateforme ESA (2022) Bilans et résultats sur le diagnostic différentiel des avortements | Plateforme d’épidémiologie en santé animale. <https://www.pplateforme-esa.fr/page/bilans-et-resultats-sur-le-diagnostic-differentiel-des-avortements>. Accessed 12 Apr 2022
34. Anastácio S, Carolino N, Sidi-Boumedine K, da Silva GJ (2016) Q Fever Dairy Herd Status Determination Based on Serological and Molecular Analysis of Bulk Tank Milk. *Transbound Emerg Dis* 63:e293–e300. <https://doi.org/10.1111/tbed.12275>
35. Muskens J, Engelen E van, Maanen C van, Bartels C, Lam TJGM (2011) Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet Rec* 168:79–79. <https://doi.org/10.1136/vr.c6106>
36. Piñero A, Barandika JF, Hurtado A, García-Pérez AL (2014) Evaluation of *Coxiella burnetii* Status in Dairy Cattle Herds with Bulk-tank Milk Positive by ELISA and PCR. *Transbound Emerg Dis* 61:163–168. <https://doi.org/10.1111/tbed.12013>

37. Vicari N, Faccini S, Ricchi M, Garbarino C, Decastelli L, Boldini M, Rosignoli C, Dalmaso A, Bronzo V, Fabbi M (2013) Occurrence of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk from northwestern Italy. *Vet Rec* 172:687–687. <https://doi.org/10.1136/vr.101423>
38. EFSA (2021) The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA J* 19:e06406. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
39. Jansen W, Cargnel M, Boarbi S, Mertens I, Van Esbroeck M, Fretin D, Mori M (2021) Belgian bulk tank milk surveillance program reveals the impact of a continuous vaccination protocol for small ruminants against *Coxiella burnetii*. *Transbound Emerg Dis* tbed.14273. <https://doi.org/10.1111/tbed.14273>
40. Nusinovici S, Madouasse A, Hoch T, Guatteo R, Beaudeau F (2015) Evaluation of Two PCR Tests for *Coxiella burnetii* Detection in Dairy Cattle Farms Using Latent Class Analysis. *PLoS ONE* 10:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144608>
41. Hermans MHA, Huijsmans C (Ronald) JJ, Schellekens JJA, Savelkoul PHM, Wever PC (2011) *Coxiella burnetii* DNA in goat milk after vaccination with Coxevac®. *Vaccine* 29:2653–2656. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.111>
42. Guatteo R, Beaudeau F, Joly A, Seegers H (2007) *Coxiella burnetii* shedding by dairy cows. *Vet Res* 38:849–860. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007038>
43. van den Brom R, van Engelen E, Vos J, Luttikholt SJM, Moll L, Roest HIJ, van der Heijden HMJF, Vellema P (2013) Detection of *Coxiella burnetii* in the bulk tank milk from a farm with vaccinated goats, by using a specific PCR technique. *Small Rumin Res* 110:150–154. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.024>
44. Abeykoon AMH, Clark NJ, Magalhaes RJS, Vincent GA, Stevenson MA, Firestone SM, Wiethoelter AK (2021) *Coxiella burnetii* in the environment: A systematic review and critical appraisal of sampling methods. *Zoonoses Public Health* 68:165–181. <https://doi.org/10.1111/zph.12791>
45. Carrié P, Barry S, Rousset E, de Crémoux R, Sala C, Calavas D, Perrin J-B, Bronner A, Gasqui P, Gilot-Fromont E, Becker CAM, Gache K, Jourdain E (2019) Swab cloths as a tool for revealing environmental contamination by Q fever in ruminant farms. *Transbound Emerg Dis* 66:1202–1209. <https://doi.org/10.1111/tbed.13137>
46. Carrié P, Barry S, Rousset E, Crémoux R de, Sala C, Calavas D, Perrin J-B, Bronner A, Gasqui P, Fromont E, Gache K, Becker C, Jourdain E (2018) Facteurs associés à la détection de *Coxiella burnetii* dans les prélèvements de poussière en élevages de ruminants domestiques. *Bull Académie Vét Fr* 171:216–222. <https://doi.org/10.4267/2042/70286>
47. Bauer BU, Schoneberg C, Herms TL, Runge M, Ganter M (2022) Surveillance of *Coxiella burnetii* Shedding in Three Naturally Infected Dairy Goat Herds after Vaccination, Focusing on Bulk Tank Milk and Dust Swabs. *Vet Sci* 9:102. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030102>
48. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, Mege J-L, Maurin M, Raoult D (2017) From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. *Clin Microbiol Rev* 30:115–190. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-16>
49. Böttcher J, Vossen A, Janowetz B, Alex M, Gangl A, Randt A, Meier N (2011) Insights into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs

- in an infected dairy herd. *Vet Microbiol* 151:291–300.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.007>
50. Lucchese L, Capello K, Barberio A, Zuliani F, Stegeman A, Ceglie L, Guerrini E, Marangon S, Natale A (2015) IFAT and ELISA phase I/phase II as tools for the identification of Q fever chronic milk shedders in cattle. *Vet Microbiol* 179:102–108.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.010>
 51. Sting R, Molz K, Philipp W, Bothe F, Runge M, Ganter M (2013) Quantitative real-time PCR and phase specific serology are mutually supportive in Q fever diagnostics in goats. *Vet Microbiol* 167:600–608. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.015>
 52. Anses, LNR Fièvre Q (2021) Liste des méthodes ELISA commercialisées reconnues.
<https://www.anses.fr/system/files/Methodes-ELISA-FievreQ.pdf>
 53. Paul S, Agger JF, Agerholm JS, Markussen B (2014) Prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* seropositivity in Danish beef and dairy cattle at slaughter adjusted for test uncertainty. *Prev Vet Med* 113:504–511. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.01.018>
 54. Edouard S, Million M, Casalta J-P, Collart F, Amphoux B, Raoult D (2017) Low antibodies titer and serological cross-reaction between *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila* challenge the diagnosis of mediastinitis, an emerging Q fever clinical entity. *Infection* 45:911–915.
<https://doi.org/10.1007/s15010-017-1048-6>
 55. La Scola B, Raoult D (1996) Serological cross-reactions between *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*, and *Coxiella burnetii*. *J Clin Microbiol* 34:2270–2274
 56. Lukáčová M, Melnicáková J, Kazár J (1999) Cross-reactivity between *Coxiella burnetii* and *Chlamydiae*. *Folia Microbiol (Praha)* 44:579–584. <https://doi.org/10.1007/BF02816263>
 57. Clark MF, Lister RM, Bar-Joseph M (1986) ELISA techniques. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 742–766
 58. Lurier T, Rousset E, Gasqui P, Sala C, Claustre C, Abrial D, Dufour P, de Crémoux R, Gache K, Delignette-Muller ML, Ayrat F, Jourdain E (2021) Evaluation using latent class models of the diagnostic performances of three ELISA tests commercialized for the serological diagnosis of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants. *Vet Res* 52:56.
<https://doi.org/10.1186/s13567-021-00926-w>
 59. Berri M, Rousset E, Champion JL, Russo P, Rodolakis A (2007) Goats may experience reproductive failures and shed *Coxiella burnetii* at two successive parturitions after a Q fever infection. *Res Vet Sci* 83:47–52. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.11.001>
 60. Plommet M, Capponi M, Gestin J, Renoux G, Marly J, Sahuc D, Petit A (1973) Fièvre Q expérimentale des bovins. *Ann Rech Vét* 4:325–346
 61. AFSSA (2004) Fièvre Q : Rapport sur l'évaluation des risques pour la santé publique et des outils de gestion des risques en élevage de ruminants
 62. Natale A, Bucci G, Capello K, Barberio A, Tavella A, Nardelli S, Marangon S, Ceglie L (2012) Old and new diagnostic approaches for Q fever diagnosis: Correlation among serological (CFT, ELISA) and molecular analyses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 35:375–379.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.03.002>

63. de Cremoux R, Rousset E, Touratier A, Audusseau G, Nicollet P, Ribaud D, David V, Le Pape M (2012) *Coxiella burnetii* vaginal shedding and antibody responses in dairy goat herds in a context of clinical Q fever outbreaks. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64:120–122. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00893.x>
64. Djerbib A, Czaplicki G, Grégoire F, Kirschvink N, Saegerman C, Dal Pozzo F (2018) Exploratory investigation of Q fever in apparently healthy meat sheep flocks in Belgium. *Transbound Emerg Dis* 65:1117–1121. <https://doi.org/10.1111/tbed.12850>
65. Joulié A, Sidi-Boumedine K, Bailly X, Gasqui P, Barry S, Jaffrelo L, Poncet C, Abrial D, Yang E, Leblond A, Rousset E, Jourdain E (2017) Molecular epidemiology of *Coxiella burnetii* in French livestock reveals the existence of three main genotype clusters and suggests species-specific associations as well as regional stability. *Infect Genet Evol* 48:142–149. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.015>
66. DGAL (2010) NOTE DE SERVICE - DGAL/SDSPA/SDSSA/N2010-8262
67. Bernadou A, Lambert Y, Gache K (2019) Cas groupés de fièvre Q, CH Niort, avril-mai 2017. *Santé Publique Fr.*
68. OSCAR (2020) Diagnostic différentiel des avortements - Protocole Bovins. Plateforme ESA
69. OSCAR (2020) Diagnostic différentiel des avortements - Protocole petits Ruminants. Plateforme ESA
70. Taurel A-F, Guatteo R, Joly A, Beaudeau F (2012) Relationship between the level of antibodies in bulk tank milk and the within-herd seroprevalence of *Coxiella burnetii* in cows. *Epidemiol Infect* 140:1710–1713. <https://doi.org/10.1017/S0950268811002275>
71. van den Brom R, van Engelen E, Luttikholt S, Moll L, van Maanen K, Vellema P (2012) *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples from dairy goat and dairy sheep farms in The Netherlands in 2008. *Vet Rec* 170:310–310. <https://doi.org/10.1136/vr.100304>
72. Joulié A, Rousset E, Gasqui P, Lepetitcolin E, Leblond A, Sidi-Boumedine K, Jourdain E (2017) *Coxiella burnetii* Circulation in a Naturally Infected Flock of Sheep: Individual Follow-Up of Antibodies in Serum and Milk. *Appl Environ Microbiol* 83:e00222-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00222-17>
73. Rousset É, Brugidou R, Chassin A, Valogne A, Colocci F, Nicollet P, Sidi-Boumedine K (2012) Adoption by a network's laboratories of a validated quantitative real-time PCR method for monitoring Q fever abortions in ruminant livestock. *EuroReference* 8
74. Rousset E, Lurier T, Jourdain E, Thiéry R (2021) Diagnostic methods for Q fever in ruminants: contribution to the validation of performances and to their harmonization. In: *Gemeinsamen Arbeitstagung der Nationalen Referenzlabore Chlamydiose, Q-Fieber, Paratuberkulose und Tuberkulose der Rinder - Online-Tagung veranstaltet. Friedrich Loeffler Institut, Naumburger, Germany*, p 13
75. Lurier T (2021) Évaluation et prise en compte de l'incertitude diagnostique des tests utilisés pour le dépistage sérologique des infections par *Coxiella burnetii* chez les ruminants domestiques. *École doctorale Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement, Université Clermont Auvergne*

