

Sciences & pratique

Animaux de rente

>> Ruminants

>> L'AUTEUR

Amélie PERIE-CAMART

Choisir la bonne technique de laboratoire pour **diagnostiquer la fièvre Q**

De nombreuses techniques de laboratoire sont actuellement disponibles pour le diagnostic de la fièvre Q. Il est nécessaire de connaître leur spécificité et leurs limites afin de prescrire l'analyse optimale. La PCR temps réel constitue la technique de choix à l'échelle individuelle. Les sérologies seront réservées au diagnostic de troupeau, lors de séries d'avortements.

La fièvre Q, zoonose liée à *Coxiella burnetii*, est fréquemment incriminée lors d'avortements ou de troubles de la reproduction chez les ruminants. Le diagnostic de cette affection nécessite des analyses de laboratoire. Différentes techniques sont désormais disponibles.

Les journées nationales des Groupements techniques vétérinaires, organisées les 23, 24 et 25 mai à Nantes, ont été l'occasion pour notre confrère Philippe Nicollet, du LVD* des Deux-Sèvres, de présenter les différentes méthodes diagnostiques de laboratoire de la fièvre Q, habituellement utilisées en routine.

Méthodes directes

Il existe différentes techniques de mise en évidence directe de *C. burnetii*.

- **Bactérioscopie** : une coloration de Stamp permet d'identifier la bactérie à partir de calques de cotylédons, d'un frottis vaginal ou de l'avorton (contenu stomacal).

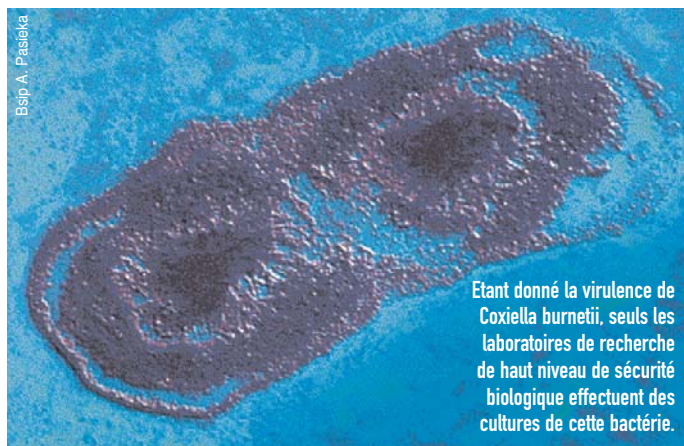
Actuellement, la bactérioscopie constitue la technique utilisée dans le cadre de la déclaration obligatoire des avortements pour la recherche de la brucellose. Cependant, elle nécessite des prélèvements de bonne qualité, réalisés de manière stérile et acheminés dans les 48 heures au laboratoire, de préférence sous couvert du froid.

Cette technique peut être réalisée dans la plupart des laboratoires. Néanmoins, elle manque de sensibilité et de spécificité, en particulier avec le frottis vaginal, puisqu'elle ne permet pas aisément de différencier *Brucella* de *Coxiella* ou de *Chlamydia*.

- **Culture / histologie** : étant donné la virulence de *Coxiella burnetii*, seuls les laboratoires de recherche de haut niveau de sécurité biologique effectuent des cultures de cette bactérie. Cette technique implique une inoculation chez l'animal de laboratoire, une culture sur œufs embryonnés ou sur certaines lignées cellulaires.

L'histologie avec immuno-détection est fréquemment utilisée chez l'Homme alors qu'elle l'est très peu en médecine vétérinaire.

«L'extrême sensibilité de la PCR ainsi que la grande résistance de la bactérie dans le milieu extérieur entraînent un risque de « surdiagnostic », notamment lors de contamination extérieure de l'échantillon.»



Etant donné la virulence de *Coxiella burnetii*, seuls les laboratoires de recherche de haut niveau de sécurité biologique effectuent des cultures de cette bactérie.

- **PCR (Polymerase Chain Reaction)** : actuellement, l'amplification de l'ADN constitue la méthode de choix de mise en évidence de *C. burnetii*. Cette technique est très sensible et permet d'identifier les animaux malades et les animaux excréteurs. Deux techniques PCR sont disponibles :

- **la PCR « traditionnelle »** : les produits de l'amplification sont révélés par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisés par lumière ultra-violette ; une bande fluorescente caractéristique du poids moléculaire du nucléotide amplifié apparaît lorsque ce dernier est présent dans l'échantillon analysé ; le résultat est alors positif ou négatif ;
- **la PCR temps réel** : des sondes fluorescentes permettent de mesurer la quantité d'ADN cible de l'échantillon ; la fluorescence est en effet proportionnelle à la quantité d'ADN ; les résultats sont exprimés en « cycles d'amplification » ; cette technique autorise une interprétation semi-quantitative sur la quantité de matériel génétique de l'échantillon (« résultat positif fort », « positif » ou « négatif »), qui peut éventuellement compléter une quantification de la bactérie par utilisation d'une souche de référence titrée ; elle est plus sûre, plus rapide, automatisable et constitue désormais l'outil majeur de diagnostic de *C. burnetii*.

Différents types d'échantillons peuvent être soumis à une PCR : placenta, organes de l'avorton, fèces, lait, écouvillons vaginaux...

La PCR est une technique très sensible : le seuil de détection de la PCR en temps réel est d'environ 10 *Coxiella*/ml de lait ou 10 bactéries/g de placenta.

«La technique Elisa ne permet pas de différencier une infection récente d'une infection ancienne.»

Dans tous les cas, la PCR doit être validée par l'analyse d'un témoin (contrôle interne). De plus, l'extrême sensibilité de cette technique, ainsi que la grande résistance de la bactérie, présente en grand nombre dans le milieu extérieur, doivent être prises en compte dans l'interprétation de résultats faiblement positifs obtenus.

nus sur des échantillons qui risquent d'avoir été contaminés dans l'environnement extérieur.

Les sécrétions vaginales prélevées *in utero* ou l'analyse des tissus de l'avorton auront une valeur diagnostique beaucoup plus forte que des matières abortives prélevées à l'extérieur de l'animal, qui peuvent être éventuellement contaminées. L'analyse du lait de mélange est un mauvais indicateur de l'implication de *Coxiella burnetii* dans l'épisode abortif, du fait de l'absence de corrélation entre excrétion vaginale et sécrétion lactée chez une vache contaminée.

Il est également indispensable de prélever les échantillons de matières abortives le plus rapidement possible (moins d'une semaine après l'avortement), compte tenu de la diminution significative de l'excrétion au-delà de ce délai.

Méthodes indirectes

- Fixation du complément : elle constitue la méthode de référence de l'Organisation mondiale de la santé animale. Cette technique est utilisable chez tous les mammifères et ne présente pas, a priori, de réactions croisées avec d'autres germes. Elle est très spécifique mais malheureusement peu sensible.

Les résultats sont interprétés en fonction du titre sérique obtenu, à savoir la dernière dilution présentant une inhibition de l'hémolyse supérieure à 50 % (cf. tableau n° 1 page 10).

- Elisa (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) : dans cette technique, un anticorps traceur reconnaît les immunoglobulines dirigées contre *C. burnetii*. Cet anticorps est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction est ensuite quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage.

«Du fait de son coût, l'immunofluorescence indirecte est rarement utilisée en médecine vétérinaire.»

Cette technique peut être réalisée sur sérum, lait ou colostrum. Le résultat des analyses est exprimé en pourcentage de densité optique entre l'échantillon testé et un témoin positif.

L'Elisa est plus spécifique et plus sensible que la réaction de fixation du complément. Les anticorps (IgG1 et IgG2 ou IgM) sont détectés précocement.

Cependant, cette méthode ne permet pas de différencier une infection récente d'une infection ancienne. Seule l'utilisation de tests spécifiques des IgG1 ou IgG2, comme chez l'Homme, permet de dater l'infection. Ainsi, il a été démontré chez l'Homme que les anticorps persistent 5 ans après la maladie. En revanche, les excréteurs d'un troupeau ne peuvent être isolés par l'Elisa. La méthode sera habituellement réservée au diagnostic de troupeau.

- Immunofluorescence indirecte (IFI) : les anticorps anti-coxielles sont marqués au moyen d'antigènes fluorescents. Sous microscope à fluorescence de Zeiss, les bactéries apparaissent sous forme de traînées vert brillant.

Sur un seul sérum, six immunofluorescences sont réalisées : en phases I et II avec des IgA, IgG et IgM. Les résultats sont exprimés en terme de dilution (tableau n° 2).

Cette technique permet d'identifier les différents types d'immunoglobulines (IgA, IgG, IgM) et donc de distinguer une affection aiguë d'une affection chronique et de suivre l'évolution de la maladie à l'échelle individuelle. Elle permet également de différencier les animaux porteurs des animaux vaccinés. Cependant, les animaux excréteurs ne peuvent être détectés.

La séroconversion est obtenue une à deux semaines après l'apparition des symptômes.

L'IFI est une technique très fiable : c'est une méthode de référence en médecine humaine. Néanmoins, de par son coût, elle est rarement utilisée en médecine vétérinaire en diagnostic de routine.

Ainsi, de nombreuses techniques sont actuellement disponibles pour le diagnostic de la fièvre Q, et il est nécessaire de connaître leur spécificité et leurs limites afin de prescrire l'analyse optimale. La PCR temps réel constitue actuellement la technique de choix à l'échelle individuelle. Néanmoins, son extrême sensibilité nécessite des prélèvements de bonne qualité tels que les sécrétions vaginales ou le contenu stomacal d'avorton. Les sérologies seront réservées au diagnostic de troupeau, lors de séries d'avortements. ■

*LVD : Laboratoire vétérinaire départemental.

**SNGTV : Société nationale des groupements techniques vétérinaires.

Tableau n° 1 : Expression des résultats obtenus par fixation du complément en fonction des dilutions dans le diagnostic de la fièvre Q

TITRES SERIQUES	RESULTAT
0	Négatif
1/10 – 1/20	Douteux
> 1/40	Positif

Les résultats sont interprétés en fonction du titre sérique obtenu.

Tableau n° 2 : Seuils proposés pour le diagnostic de fièvre Q par Immunofluorescence et interprétation sérologique (Maurin et Raoult, 1999)

Titre en anticorps anti-phase II		Titre en anticorps anti-phase I	Interprétation
IgG	IgM	IgG	
≤ 100			Fièvre Q clinique improbable
≥ 200	≥ 50		Fièvre Q clinique (100 %)
		≥ 1 : 800	Fièvre Q chronique (98 %)
		≥ 1 : 1600	Fièvre Q chronique (100 %)

Les résultats sont exprimés en terme de dilution.