

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

Année 2004 - Thèse n° **59**

**LES EHRlichIOSES DU CHIEN : ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE, DIAGNOSTIC ET COMPARAISON
DE TROIS KITS DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE
RAPIDE DE L'EHRlichIOSE MONOCYTAIRE**

THESE

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I
(Médecine - Pharmacie)
et soutenue publiquement le 27 avril 2004
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

MARTIN Cédric
Né (e) le 30 juillet 1976
à Mont-Saint-Martin



DEPARTEMENTS ET CORPS ENSEIGNANT DE L'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON
 Directeur : Professeur J.-F. CHARY

Le 01 Décembre 2003

DEPARTEMENT	PREX	PR1	PR2	MC	Contractuel, Associe & IPAC	AERC	Chargés de consultations et d'enseignement
DEPART SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE Microbiologie, Immunologie, Pathologie Générale Pathologie infectieuse Parasitologie & Maladies parasitaires Qualité et Sécurité des Aliments Législation & Jurisprudence Bio-Mathématiques		Y. RICHARD	A LACHERETZ M. ARTOIS G. BOURDOISEAU P. DEMONT C. VERNOZY A LACHERETZ	V. GUERIN-FAUBLEE 80 % A. KODJO D. GREZEL 80 % I. VIALARD MP CALLAÏT CARDINAL L. ZENNER A. GONTHER P. SABATIER ML DELIGNETTE 80 % K. CHALVET-MONBRAY		S. COLARDELLE ISPV	
DEPART DES ANIMAUX DE COMPAGNIE Anatomie Chirurgie et Anesthésiologie Anatomie-pathologique/Dermatologie-Cancerologie Médecine interne Imagerie médicale		E. CHATELAIN JP GENEVOIS JP MAGNOL C. FOURNEL	T. ROGER D. FAU E. VIGUIER D. REMY JL CADORE	S. SAWAYA T. MARCHAL L. CHABANNE	R. DA ROCHA CARARO S. JUNOT K. PORTIER C. DECOSNE-JUNOT D. WATRELOT-VIREUX P. BELLI D. PIN JL. BOULAY M. HUGONNARD F. DURIEUX (50 %)	MCC MCC MCC MCC MCC MCA MCA PRA MCC MCC	C. CAROZZO BREREDOUANE K. (50 %) G. CHANOT A. MUGUET J. GRILLAUDMIN I. BURLOT (60 %) F. DURIEUX (50 %)
DEPART DES PRODUCTIONS ANIMALES Zootechnie, Ethologie & Economie rurale Nutrition et Alimentation Biol & Patho de la Reproduction Patho Animaux de Production		M. FRANCK F. BADINAND P. BEZILLE	M. RACHAÏL-BRETTN T. ALOGNINOUWA	LETREME P. D. GRANCHER L. ALVES DE OLIVEIRA G. EGRON-MORAND S. BUFF P. GUERIN S. MARTINOT R. FRIKHA M.A. ARCANGIOLI D. LE GRAND	D. LAURENT (50 %)	MCA	L. MOUNIER N.GRAUD P. DEBARNOT D. LAURENT
DEPART SCIENCES BIOLOGIQUES Physiologie /Alimentation Biophysique /Biochimie Génétique et Biologie moléculaire Pharmacie / Toxicologie Législation des Médicaments Langues		R. BOVIN F. GARNIER G. KECK	E. BENOIT F. GRANI P. JAUSSAUD P. BERNY	JL THIRIAULT JM BONNET-GARIN 90 % T. BURONROSSI V. LAMBERT	C. FARMER R. SULLIVAN	IPAC IPAC	
DEPART HIPPIQUE Pathologie équine Clinique équine Expertise nécropsique		O. LEPAGE	JL CADORÉ C.FLEURY	A. LEBLOND A. BERAMOU-SMITH E. CAUVIN			

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :

A Monsieur le Professeur J. Etienne
Professeur à la Faculté de Médecine de Lyon

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury de thèse.
Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur L. Chabanne
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui a su m'encadrer et m'aider à finaliser ce travail.
Qu'il voit dans cet aboutissement le témoignage de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur G. Bourdoiseau
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Qui m'a fait l'honneur d'accepter l'évaluation et la critique de ce travail.
Qu'il trouve ici ma reconnaissance pour cette participation.

A Monsieur le Docteur G. Papierok
Directeur Général et Fondateur du Laboratoire BVT

Qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et a su me conseiller pour finir ce travail.
Qu'il voit dans cette thèse le signe de ma plus sincère reconnaissance.

... Et plus personnellement :

A mes parents, pour leur confiance et leur soutien au quotidien.
Ce travail n'existerait sans vous ; qu'il soit le témoignage de mon amour le plus sincère.

A mes mamies, pour tout ce qu'on peut devoir à des mamies... je vous dédie également cette thèse que vous avez attendue si longtemps !

A Stéphane, Sabine, Ninouille et toute la famille qui m'ont toujours entouré.
L'occasion de leur témoigner à nouveau mes sentiments... et refaire une bringue.

Aux amis : Gisou, Steph, Yann, Juju, Emma, Romrom, Luc, Georges, Denis, Aymeric –
Toute la bande de happy (village ?) people, pour tous les instants, pour nos joyeuses sorties, les barbecues au bord de l'eau, les vacances à la mer, les promenades dans la Dombes... que nos années se poursuivent dans la gaieté avec la même joie de vivre, pour le meilleur et pour de rire !

A ma « grande sœur » Hélène, Fifi, Macfly et Chris', Sophie et Christophe... et toute la bande de joyeux vétos (et conjoints) pour tous nos bons moments d'étudiants insouciantes et pour l'avenir...

Aux Tartopoyls (et ex-Tartopyls) : Fred, Eddy, Franck, JJ, Haroun. Vous voulez du Rockfort ? *fff..* c'est quoi ? Fort et faux... forever ? Et vive le blues !

A ma bonne petite équipe d'Annemasse, Sandrine, Célia, Flo et Betty, pour ces bons mois de rigolade et de pitonneries.

A Babette et Slim pour leur aide et leur sourire au labo... pour le thé et les petits fours... Et pour m'avoir aidé dans les manip'...

A Gérard Papierok, Rémi et toute l'équipe du laboratoire BVT pour leur accueil chaleureux et leur disponibilité.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES ENCADRES	12
LISTE DES ANNEXES	12
INTRODUCTION	13
I. PREMIERE PARTIE : GENERALITES	14
I.1. TAXONOMIE	15
I.1.1. CLASSIFICATION PHENOTYPIQUE	15
I.1.2. CLASSIFICATION PHYLOGENETIQUE	17
I.1.2.1. Groupe 1 ou Groupe <i>Ehrlichia</i>	18
I.1.2.2. Groupe 2 ou Groupe <i>Anaplasma</i>	19
I.1.2.3. Groupe 3 ou Groupe <i>Neorickettsia</i>	19
I.1.2.4. Groupe Wolbachia	20
I.2. CARACTERISTIQUES PHENOTYPIQUES	23
I.2.1. MORPHOLOGIE ET DEVELOPPEMENT	23
I.2.1.1. Morphologie	23
I.2.1.2. Cycle de développement	23
I.2.2. METABOLISME ET MISE EN CULTURE	24
I.2.2.1. Métabolisme	24
I.2.2.2. Cultures bactériennes	24
I.2.3. PRINCIPAUX ANTIGENES	26
I.3. VECTEURS ET MODES DE TRANSMISSION	27
I.3.1. VECTEURS	27
I.3.2. MODES DE TRANSMISSION	29
I.4. INTERACTION AVEC L'HOTE	30
I.4.1. POUVOIR IMMUNOGENE	30
I.4.2. POUVOIR PATHOGENE	32
II. SECONDE PARTIE : L'EHRlichIOSE MONOCYTAIRE CANINE	36
II.1. ÉTIOLOGIE	37
II.2. ÉPIDEMIOLOGIE	38
II.2.1. ANIMAUX ATTEINTS	38
II.2.2. VECTEUR ET MODE DE TRANSMISSION	39
II.2.3. REPARTITION DE LA MALADIE	40
II.3. POUVOIR PATHOGENE	41
II.3.1. MODIFICATIONS HEMATOLOGIQUES	42
II.3.1.1. Troubles de l'hémostase primaire	42
II.3.1.1.1. Thrombopénie	42
II.3.1.1.2. Thrombopathie	44
II.3.1.1.3. Vascularite	45
II.3.1.2. Variations de la formule blanche	45
II.3.1.3. Anémie	45
II.3.2. MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES	46
II.3.2.1. Protéines sériques	46
II.3.2.2. Atteinte hépato-rénale	47
II.4. POUVOIR IMMUNOGENE	48
II.5. ÉTUDE CLINIQUE	50
II.5.1. PHASE AIGUË	50
II.5.1.1. Symptômes	50
II.5.1.2. Signes biologiques	51
II.5.1.2.1. Signes hématologiques	51
II.5.1.2.2. Signes biochimiques	52

II.5.1.3. Évolution de la phase aiguë	53
II.5.2. PHASE SUBCLINIQUE	53
II.5.3. PHASE CHRONIQUE	54
II.5.3.1. Symptômes	54
II.5.3.2. Signes biologiques	56
II.5.3.2.1. Signes hématologiques	56
II.5.3.2.2. Signes biochimiques	57
II.6. TABLEAU LESIONNEL	57
II.7. PRONOSTIC, TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE	58
II.7.1. PRONOSTIC	58
II.7.2. TRAITEMENT	58
II.7.2.1. Antibiothérapie	58
II.7.2.2. Traitements complémentaires	60
II.7.2.3. Evolution	60
II.7.3. PROPHYLAXIE	61
III. TROISIEME PARTIE : LES AUTRES EHRLICHIOSES DU CHIEN	63
III.1. EHRLICHIOSE A <i>ANAPLASMA PLATYS</i> OU THROMBOPENIE CYCLIQUE INFECTIEUSE	64
III.1.1. ETIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE	64
III.1.2. POUVOIR ANTIGENIQUE	65
III.1.3. HISTOIRE NATURELLE DE LA MALADIE	66
III.1.4. TRAITEMENT	68
III.2. EHRLICHIOSES GRANULOCYTAIRES	68
III.2.1. EHRLICHIOSE À <i>EHRLICHIA EWINGII</i>	69
III.2.1.1. Etiologie et épidémiologie	69
III.2.1.2. Histoire naturelle de la maladie	70
III.2.1.3. Traitement	71
III.2.2. INFECTION DU CHIEN PAR <i>ANAPLASMA (EHRLICHIA) PHAGOCYTOPHILUM</i>	72
III.2.2.1. Historique	72
III.2.2.2. Epidémiologie	74
III.2.2.3. Pouvoir antigénique	76
III.2.2.4. Histoire naturelle de l'infection	76
III.2.2.5. Traitement	78
III.2.3. EHRLICHIOSE A <i>EHRLICHIA SP</i>	78
III.3. AUTRES EHRLICHIOSES CANINES	78
III.3.1. EHRLICHIOSE A <i>N. RISTICII</i> VAR. <i>ATYPICALIS</i>	78
III.3.2. EMPOISONNEMENT AU SAUMON	79
III.3.3. EHRLICHIOSE A <i>E. CHAFFEENSIS</i>	80
III.3.4. EHRLICHIOSE SUD-AFRICAINNE	81
III.3.5. EHRLICHIOSE VENEZUELIENNE	82
III.3.6. AGENT SF	82
III.3.7. <i>EHRLICHIA MURIS</i> ET LE NOUVEL AGENT DECOUVERT SUR <i>IXODES OVATUS</i>	83
III.3.8. <i>WOLBACHIA</i>	83
III.4. INFECTIONS MULTIPLES	83
IV. QUATRIEME PARTIE : DIAGNOSTIC DES EHRLICHIOSES CANINES	88
IV.1. DIAGNOSTIC EPIDEMIOLOGIQUE	89
IV.1.1. INCIDENCE SAISONNIERE	89
IV.1.2. REPARTITION GEOGRAPHIQUE	90
IV.1.3. FACTEURS DE PREDISPOSITIONS	92
IV.2. SYNTHESE CLINIQUE ET BIOLOGIQUE	93
IV.2.1. ELEMENTS SYMPTOMATIQUES	93
IV.2.2. SIGNES BIOLOGIQUES	97
IV.2.2.1. Signes hématologiques	97
IV.2.2.2. Signes biochimiques	99
IV.3. DIAGNOSTIC EXPERIMENTAL	101
IV.3.1. DIAGNOSTIC DIRECT	101
IV.3.1.1. Infection expérimentale et mise en culture cellulaire	101

IV.3.1.2. Frottis sanguins	101
IV.3.1.2.1. Morphologie et cellules infectées	101
IV.3.1.2.2. Sensibilité	103
IV.3.1.2.3. Spécificité	105
IV.3.1.3. Ponctions et biopsies	106
IV.3.1.3.1. Ponction de nœuds (ganglions) lymphatiques	106
IV.3.1.3.2. Ponction de moelle osseuse hématopoïétique (MOH)	107
IV.3.1.3.3. Ponctions articulaires	107
IV.3.1.4. Diagnostic nécropsique	108
IV.3.1.5. PCR	108
IV.3.1.6. Détection de l'antigène soluble	110
IV.3.2. DIAGNOSTIC INDIRECT : SEROLOGIES	111
IV.3.2.1. Différents tests sérologiques disponibles	112
IV.3.2.1.1. Immunofluorescence indirecte	112
IV.3.2.1.2. ELISA et Dot-blot	112
IV.3.2.1.3. Western-Blot	114
IV.3.2.1.4. Tests immuno-chromatographiques	114
IV.3.2.2. Sérologies ehrlichioses : interprétation	115
IV.3.2.2.1. Réactions sérologiques croisées	115
IV.3.2.2.2. Interprétation des résultats sérologiques	120
IV.4. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	123

V. CINQUIEME PARTIE : COMPARAISON DE TROIS KITS DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE RAPIDE DE L'EHRlichiose MONOCYTAIRE CANINE 129

V.1. PRINCIPE	130
V.2. MATERIEL ET METHODE	133
V.2.1. ECHANTILLONS DE SERUMS	133
V.2.2. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	133
V.2.2.1. Principe	133
V.2.2.2. Manipulations	134
V.2.2.3. Lecture des résultats	135
V.2.3. TESTS SPEED®EHRLI	135
V.2.4. TESTS WITNESS® EHRlichIA	135
V.2.5. TESTS SNAP®COMBO CANINE DIRO/EHRLI	136
V.2.6. IMMUNO-TRANFERT OU WESTERN BLOT	136
V.2.6.1. Principe	136
V.2.6.2. Electrophorèse	137
V.2.6.2.1. Préparation des gels	137
V.2.6.2.2. Préparation de la cuve	138
V.2.6.2.3. Préparation des échantillons à analyser	138
V.2.6.2.3.1. Marqueur de poids moléculaire	138
V.2.6.2.3.2. Antigène Ehrlichia canis	138
V.2.6.2.4. Electrophorèse	139
V.2.6.3. Transfert	139
V.2.6.4. Immuno-blot	140
V.2.6.5. Révélation	141
V.2.6.6. Lecture des résultats	141
V.2.7. ANALYSE STATISTIQUE	141
V.3. RESULTATS	141
V.3.1. IFI	141
V.3.2. WESTERN BLOT	142
V.3.3. SPEED®EHRLI	144
V.3.4. WITNESS® EHRlichIA	145
V.3.5. SNAP®COMBO CANINE DIRO/EHRLI	146
V.4. DISCUSSION	147
CONCLUSION	155
BIBLIOGRAPHIE	156
ANNEXES	173

LISTE DES ABREVIATIONS

AcAP : Anticorps Anti-Plaquettes

AcAN : Anticorps Anti-Nucléaires

AIAT : Alanine Amino-Transférase

APS : Ammonium Peroxy-diSulfate

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CRP : C-Reactive Protein (protéine C-réactive)

EG : Ehrlichiose Granulocytaire

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EMC : Ehrlichiose Monocytaire Canine

EPS : Electrophorèse des Protéines Sanguines

FN : Faux Négatifs

FP : Faux Positifs

H2O2 : peroxyde d'hydrogène

HGE : Human Granulocytic Ehrlichiosis (ehrlichiose granulocytaire humaine)

HSP : Heat Shock Protein (protéine de choc thermique)

HVS : (syndrome d') HyperViscosité Sanguine

IFD : Immuno-Fluorescence Directe

IFI : Immuno-Fluorescence Indirecte

IFN : InterFéron

IL-1 : InterLeukine 1

IM : IntraMusculaire

IRC : Insuffisance Rénale Chronique

KDa : kiloDaltons

LB : Lymphocytes **B**

LCR : Liquide **C**éphalo-**R**achidien

LDH : Lactate **D**es**H**ydrogénase

LES : Lupus **E**rythémateux **S**ystémique

LLC : Leucémie **L**ymphoïde **C**hronique

LT : Lymphocytes **T**

MGG : colorant de **M**ay-**G**rünwald et **G**iemsa

MOH : **M**oelle **O**sseuse **H**ématopoïétique

NL : **N**œud (Ganglion) **L**ymphatique

PAI : **P**hosphatases **A**lcalines

pb : paire de bases

PBS : **P**hosphate **B**uffered **S**aline

PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction

PDF : **P**roduits de **D**égradation de la **F**ibrine (et du **F**ibrinogène)

PGE-2 : **P**rosta**G**landine **E2**

PO : *Per Os*

PUPD : **P**oly**U**rie et **P**oly**D**ipsie

RT-PCR : **R**everse **T**ranscriptase **P**olymerase **C**hain **R**eaction

RVP : **R**apport de **V**raisemblance **P**ositif

RVN : **R**apport de **V**raisemblance **N**égatif

SDS : **S**odium **D**odecyl **S**ulfate

TEMED : **T**ri-**E**thyl-**M**ethyl**E**ne-**D**iamide

TNF : **T**umor **N**ecrosis **F**actor

VHE : **V**enezuelan **H**uman **E**hrlichiosis (ehrlichiose humaine vénézuélienne)

VN : **V**rai **N**égatif

VP : **V**rai **P**ositif

VPM : **V**olume **P**laquettaire **M**oyen

VPN : **V**aleur **P**rédictive **N**égative

VPP : **V**aleur **P**rédictive **P**ositive

WB : **W**estern **B**lot

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales ehrlichioses et leur nouvelle nomenclature (d'après [3 , 8])	22
Tableau 2 : Culture de quelques <i>Ehrlichieae</i> sur lignées cellulaires (D'après [5 , 8, 24 , 27 , 28 , 29]).....	25
Tableau 3 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET VECTEURS DES EHRlichIOSES DU CHIEN (d'après [1 , 2 , 57, 83 , 103 , 161 , 167 , 194 , 216 , 225 , 226])	91
Tableau 4 : Synthèse des principaux signes cliniques observés au cours de 5 études rétrospectives de cas d'ehrlichiose monocyttaire canine naturelle (D'après [77, 143 , 145 , 234 , 236])	96
Tableau 5 : Synthèse des principaux signes hématologiques observés au cours de 5 études rétrospectives de cas d'ehrlichiose monocyttaire canine naturelle (D'après [77, 143 , 145 , 234 , 236])...	98
Tableau 6 : Synthèse des principaux signes biochimiques observés au cours de 5 études rétrospectives de cas d'ehrlichiose monocyttaire canine naturelle (D'après [77, 143 , 145 , 234 , 236])	100
Tableau 7 : Cellules cibles et morphologie des différentes espèces d' <i>Ehrlichieae</i> atteignant le chien (d'après [5 , 8 , 179 , 215 , 216]) .	102
Tableau 8 : Réactions sérologiques croisées entre les différentes espèces d' <i>Ehrlichiae</i> atteignant le chien (d'après [91 , 130 , 135 , 141, 152 , 159 , 204 , 205 , 261 , 267])	119
Tableau 9 : Interprétation de l'utilisation combinée de la sérologie et de la PCR pour le diagnostic des ehrlichioses (d'après [3, 83 , 261]).	123
Tableau 10 : DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DES EHRlichIOSES : PRINCIPALES AFFECTIONS (D'après [129 , 275 , 276]).....	126
Tableau 11 : Poids moléculaire (en kDa) des différentes bandes observées pour les sérums témoins.	142
Tableau 12 : Western Blot – Masse moléculaire des peptides observés sur les sérums discordants avec l'IFI	143
Tableau 13 : Résultats des différents tests après Western Blot	143
Tableau 14 : Sérums discordants après Western Blot	144
Tableau 15 : Speed®EHRLI : Comparaison à l'IFI et au Western blot ..	145
Tableau 16 : WITNESS® Ehrlichia : Comparaison à l'IFI et au Western blot	146
Tableau 17 : SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli - Comparaison à l'IFI et au Western blot	147
Tableau 18 : Comparaison de la fiabilité, de la sensibilité et de la spécificité des trois tests sérologiques, par rapport à l'IFI.	149

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification phénotypique des Ehrlichieae dans l'Ordre des Rickettsiales	16
Figure 2 : Classification des <i>Ehrlichieae</i> sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S (d'après [9])	18
Figure 3 : Foyers d'ehrlichiose bovine à <i>A. phagocytophilum</i> en France (d'après [44]).....	75
Figure 4 : Variations de la valeur prédictive positive (VPP), de la valeur prédictive négative (VPN) et de la concordance globale des trois tests sérologiques, calculées selon le théorème de Bayes, en fonction de la prévalence (D'après [264 , 280]).....	153

LISTE DES ENCADRES

Encadré 1 : Technique de leucoconcentration ou « buffy coat » (d'après [238]).	104
Encadré 2 : Thrombopénies chez les carnivores domestiques (D'après [276 , 277])	125

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 - FICHE PRODUIT : Speed®EHRLI - Laboratoire BVT	174
Annexe 2 - FICHE PRODUIT : WITNESS® Ehrlichia – Laboratoire SYNBIOTICS	175
Annexe 3 - FICHE PRODUIT : SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli – Laboratoire IDEXX	176
Annexe 4 - Résultats des tests après l'IFI.....	177
Annexe 5 - Résultats du Western-Blot et masse moléculaire des peptides observés.	179

INTRODUCTION

*En dépit des quelques cas de syndromes mononucléosiques décrits chez des japonais dans les années 1950, les ehrlichioses n'ont réellement pris de l'importance en médecine humaine que depuis une dizaine d'années, suite aux premiers cas américains diagnostiqués, puis à la description toujours croissante de cas humains dans le monde. Parallèlement, les ehrlichioses sont des maladies bien connues depuis près d'un siècle en médecine vétérinaire, d'abord décrites chez les ruminants, alors que *Rickettsia canis*, rebaptisée *Ehrlichia canis* par la suite, est découverte 25 ans plus tard chez le chien. L'émergence ou la reconnaissance récente chez l'animal comme chez l'homme de nouvelles ehrlichioses et d'une interspécificité de ces bactéries sont certainement liées à des conditions épidémiologiques favorables, mais aussi à l'amélioration des méthodes et outils de diagnostic.*

*Si l'ehrlichiose monocytaire à *E. canis* reste sans doute la plus répandue et la mieux connue dans l'espèce canine en France, son diagnostic n'est pas aisé pour autant et le vétérinaire joue un rôle important dans la détection précoce de cette maladie au potentiel zoonosique redoutable chez le chien. Comme pour les *Rickettsies*, le diagnostic sérologique est essentiel ; plusieurs alternatives sont offertes aux praticiens sur le terrain, mais leur évaluation est nécessaire afin de se munir d'outils performants et fiables.*

*Notre travail tentera de présenter, dans une première partie, les ehrlichioses dans leur globalité au travers d'une classification en constante évolution, pour ensuite s'intéresser plus précisément à l'ehrlichiose monocytaire canine puis aux autres ehrlichioses décrites chez le chien. Une quatrième partie évoquera plus particulièrement le diagnostic de ces infections de manière générale. Enfin, nous présenterons les résultats de notre étude expérimentale, qui a permis d'évaluer la fiabilité et de discuter de l'utilisation de trois kits de diagnostic rapide disponibles en France pour la détection d'anticorps anti-*E. canis*, le Speed®EHRLI (laboratoire BVT), le WITNESS® Ehrlichia (laboratoire Synbiotics) et le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli (laboratoire IDDEX).*

I. PREMIERE PARTIE : GENERALITES

Les *Ehrlichieae* sont responsables de maladies vectorielles aujourd'hui considérées comme émergentes, et qui intéressent de nombreuses espèces animales.

Leur caractère zoonosique longtemps évoqué, et mis en évidence depuis une quinzaine d'années seulement, a accentué les recherches et permet de mieux comprendre l'épidémiologie, la pathogénie et l'incidence clinique de ces nouvelles maladies, et d'en affiner ainsi le diagnostic et le traitement.

Avant de nous intéresser de plus près aux ehrlichioses dans l'espèce canine, nous allons évoquer brièvement quelques généralités sur ce vaste groupe de bactéries et sur leur diversité, en évoquant les nouveaux éléments de leur classification, les critères phénotypiques essentiels, leur mode de transmission et leurs relations avec l'hôte.

I.1. Taxonomie

La taxonomie des *Ehrlichieae* est en pleine refonte suite à l'essor des outils de biologie moléculaire, et à la découverte incessante de souches, d'espèces ou de genres nouveaux. Certaines entités ont été renommées et c'est pourquoi il nous semble important de leur consacrer une courte rétrospective historique.

I.1.1. Classification phénotypique

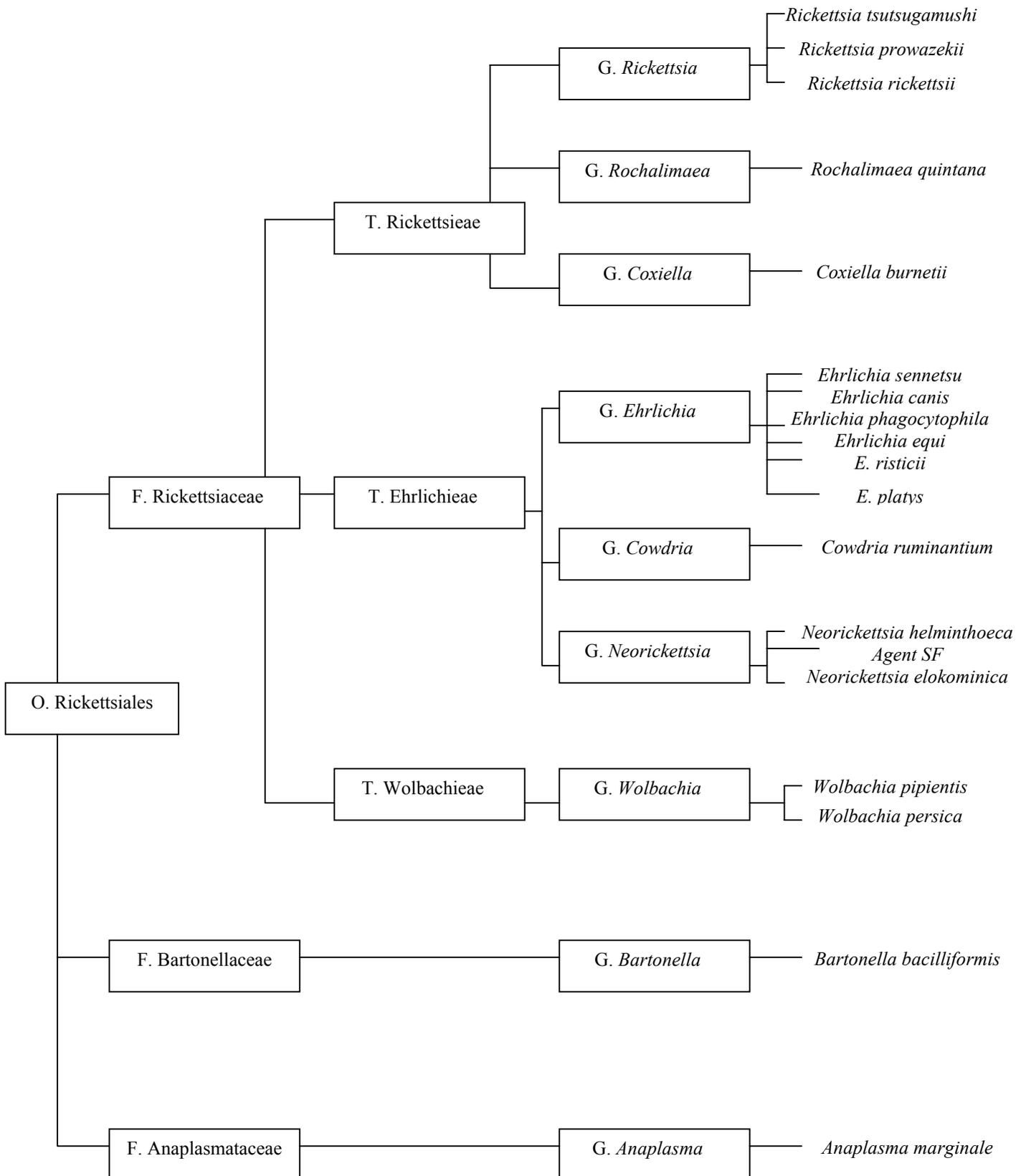
Les *Ehrlichieae* sont de petites bactéries intracellulaires strictes qui parasitent les cellules sanguines et épithéliales de nombreux mammifères et de l'homme [1, 2]. Elles prennent une coloration de Gram négative mais, tout comme les *Rickettsieae*, elle diffèrent de la majorité de ces bactéries à Gram négatif par l'absence de production d'endotoxine et par leur transmission essentiellement vectorielle [3].

Dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de 1984, la « Tribu » des *Ehrlichieae* faisait partie de l'Ordre des *Rickettsiales* et de la Famille des *Rickettsiaceae*, comprenant aussi la Tribu des *Rickettsieae* et celle des *Wolbachieae* [4].(Cf. Figure 1)

L'Ordre des *Rickettsiales* comprenait à l'origine toutes les bactéries intracellulaires strictes, mais les actuelles Chlamydies ont été secondairement séparées de cet ordre. Parmi ces *Rickettsiales*, on distingue donc à l'origine trois Familles : les *Rickettsiaceae*, les *Bartonellaceae* et les *Anaplasmataceae*, qui parasitent respectivement les phagocytes spécialisés, les phagocytes non spécialisés et les érythrocytes [2, 5].

Dans la grande famille des *Rickettsiaceae*, les différents genres et espèces ont d'abord été établis sur des critères phénotypiques : leur écologie, leur épidémiologie, le sérotypage, leur pouvoir pathogène chez l'homme et chez l'animal, et la réaction de Weil-Félix (réaction sérologique croisée avec différents sérotypes de bactéries du genre *Proteus sp.*) [6]. Ces critères ont permis de définir trois « Tribus » - *Rickettsieae*, *Wolbachieae* et *Ehrlichieae* - cette dernière comprenant les genres *Ehrlichia*, *Cowdria* et *Neorickettsia* [5]. Ils se répliquent tous les trois dans une vacuole parasitophore de la cellule hôte, alors que les éléments de la « Tribu » des *Rickettsieae* (sauf *Coxiella burnetii*) se répliquent librement dans le cytoplasme [7].

Figure 1 : Classification phénotypique des Ehrlichieae dans l'Ordre des Rickettsiales (d'après [5])



I.1.2. Classification phylogénétique

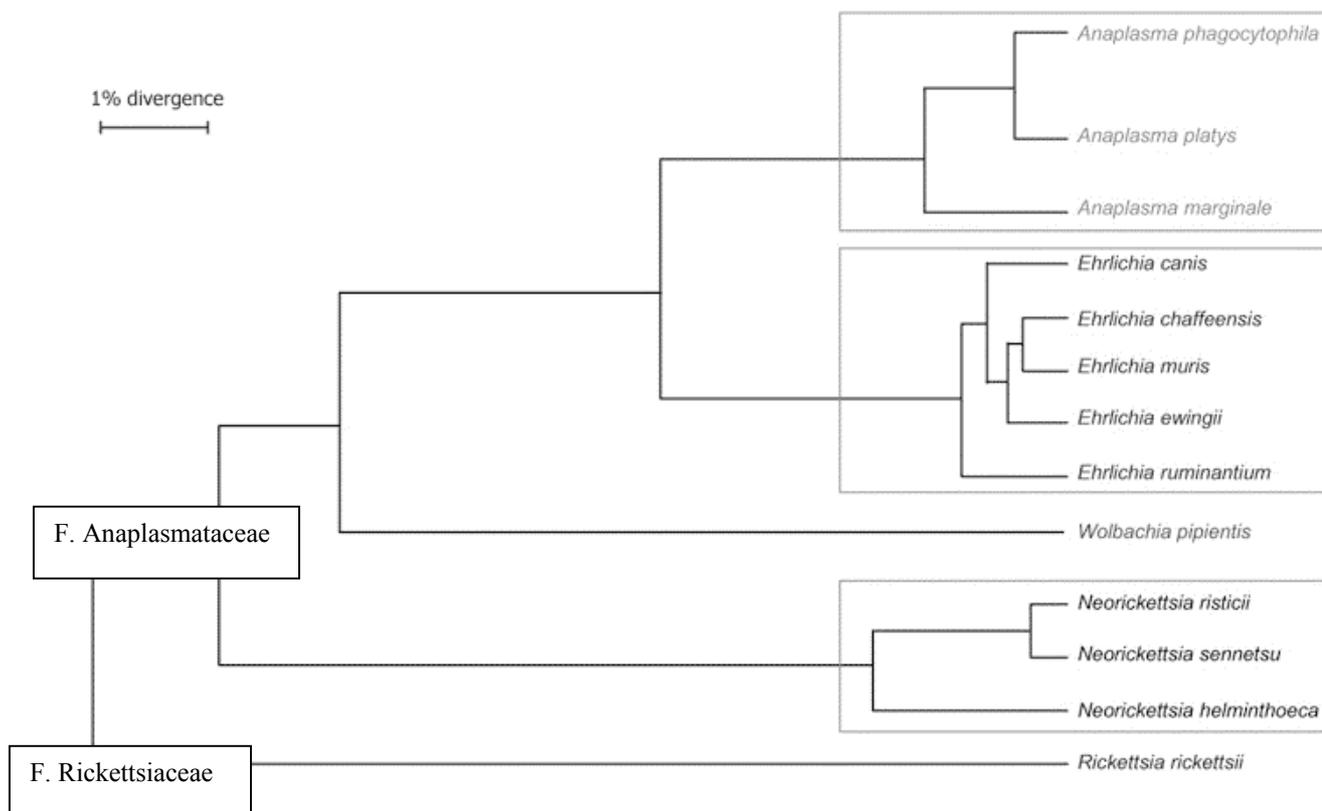
Les outils de phylogénie moléculaire largement utilisés depuis la seconde moitié des années 1990 ont complètement bouleversé cette classification phénotypique. Parmi les *Rickettsiales*, peu de gènes sont disponibles et c'est principalement les gènes de l'ARN 16S ribosomal et le gène de la protéine de choc thermique GroESL qui ont été étudiés. D'après ces études moléculaires, les anciens genres rickettsiens sont maintenant répartis dans trois sous-groupes différents des Protéobactéries (alpha 1, alpha 2 et gamma), ce qui révèle bien leurs fortes disparités phylogénétiques [2 , 8].

Ces études ont permis plus récemment d'établir une nouvelle classification et une nouvelle nomenclature, proposée par l'équipe de Dumler [8]. Les auteurs proposent que les « Tribus » des *Ehrlichieae* et des *Wolbachieae* soient transférées dans la famille des *Anaplasmataceae*, ne laissant que les *Rickettsieae* dans la famille des *Rickettsiaceae* ; le terme « Tribu » serait ainsi éliminé.

Les *Ehrlichieae* font ainsi partie du sous-groupe alpha 1 des Protéobactéries, de l'Ordre des *Rickettsiales* et de la famille des *Anaplasmataceae*. Elles partagent entre elles 84 à 96 % d'homologie pour l'ADNr 16S. Parmi ces *Ehrlichieae*, on a pu définir des génogroupes [2, 5, 6] ; leurs membres ont été rebaptisés par la suite.

On distingue pour les **quatre génogroupes** respectivement les genres *Ehrlichia*, *Anaplasma* et *Neorickettsia*, ainsi que *Wolbachia pipientis* [8]. (cf. Figure 2)

Figure 2 : Classification des *Ehrlichieae* sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S (d'après [9])



I.1.2.1. Groupe 1 ou Groupe *Ehrlichia*

Il existe un minimum de similitude de 97,7 % entre les membres de ce groupe [8]. Il comprend notamment :

- ***Ehrlichia canis***, agent de l'ehrlichiose monocyttaire canine ou pancytopénie tropicale canine, que nous étudierons longuement dans la seconde partie,
- ***Ehrlichia chaffeensis***, agent de l'ehrlichiose monocyttaire humaine,
- ***Ehrlichia ewingii***, agent de l'ehrlichiose granulocytaire canine (CGE),
- *Cowdria ruminantium*, récemment rebaptisée ***Ehrlichia ruminantium***, responsable de la cowdriose ou « *heartwater* » des bovins en Afrique et aux Caraïbes,
- ***Ehrlichia muris***, espèce isolée au Japon sur des souris sauvages, ainsi que d'isolats obtenus à partir d'*Ixodes ovatus* au Japon,
- **Venezuelan human ehrlichia (VHE)**, isolée récemment sur un patient asymptomatique au Vénézuéla [10].

I.1.2.2. Groupe 2 ou Groupe *Anaplasma*

Ce groupe est très proche du Groupe 1, avec jusqu'à 94,9 % d'homologie sur les séquences du gène ARNr 16S [2 , 8].

Les membres de ce second groupe partagent entre eux au minimum 96,1 % de similitudes [8] ; on y retrouve :

- *Ehrlichia phagocytophila*, l'agent de la fièvre à tique des ruminants,
- *Ehrlichia equi*, responsable de l'ehrlichiose granulocytaire équine,
- L'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine (HGE),

Il n'existe toutefois pas de différence suffisante entre les séquences de l'ADNr 16S et du gène *groESL* de ces trois entités pour en faire des espèces différentes. On pourra donc trouver ces différents noms pour faire référence à une seule et même espèce : ***Anaplasma phagocytophilum*** [8]. Cette nouvelle entité partage au minimum 98,2% d'homologie avec les autres *Anaplasma*. On citera par exemple :

- *Ehrlichia platys*, renommée ***Anaplasma platys***, responsable d'une thrombopénie cyclique chez le chien,
- *Ehrlichia bovis*, renommée ***Anaplasma bovis***, responsable d'une anaplasmosé systémique chez les bovins d'Afrique, mais aussi dans d'autres régions telles que l'Amérique du Sud, l'Iran ou l'Inde.
- ***Anaplasma marginale***, parasite des érythrocytes des bovins, serait également apparentée à ce deuxième groupe [6].

I.1.2.3. Groupe 3 ou Groupe *Neorickettsia*

Il est plus éloigné des deux précédents (88,3 % d'homologie seulement) et c'est le groupe le plus divergent, avec au minimum 94,9 % de similitudes entre ses membres [8]. On reconnaît en particulier :

- *Ehrlichia sennetsu*, renommée ***Neorickettsia sennetsu***, espèce parasite de l'Homme isolée sur un patient au Japon,
- *Ehrlichia risticii*, qui a pris le nom de ***Neorickettsia risticii***, responsable de la « fièvre du Potomac » des équidés,

- ***Neorickettsia helminthoeca***, responsable du "salmon poisoning disease" ou « empoisonnement au saumon », chez les Canidés aux Etats-Unis.
- ***Neorickettsia elokominica*** responsable de la "Elokomin fluke fever" ou « fièvre d'Elokomin » chez les Canidés et autres carnivores sauvages,
- L'agent de *Stellantchasmus falcatus* (**agent SF**), isolé sur des métacercaires de ce trématode enkystées sur des poissons mulets gris au Japon, dans les mêmes régions que *N. sennetsu*.

I.1.2.4. Groupe Wolbachia

Le groupe *Wolbachia* ne comprend plus que la seule entité *Wolbachia pipientis*, qui est un symbiote de nombreux insectes, helminthes et crustacés. On ne lui reconnaît toutefois aucun pouvoir pathogène chez les Vertébrés, et la transmission trans-ovarienne largement documentée en fait un organisme tout à fait singulier dans cette famille. Elle est donc considérée comme une entité à part, qui occupe une position intermédiaire, assez proche des groupes 1 et 2 (88 % d'homologie) et plus éloignée du groupe 3 (84 % d'homologie) [2 , 8].

Cette classification n'est pas seulement académique mais elle est également supportée par des caractéristiques biologiques et antigéniques que nous évoquerons par la suite ; par exemple, on s'explique plus facilement, grâce au rapprochement phylogénétique de *N. helminthoeca* et *N. (Ehrlichia) risticii*, les similitudes cliniques entre respectivement la maladie de l'empoisonnement au saumon chez le chien et la fièvre du Potomac du cheval [3].

Parmi les espèces d'un même génogroupe, il peut exister malgré tout de grandes différences entre les cellules parasitées, l'importance des signes cliniques, les régions atteintes, ou encore les vecteurs [8, 11]. Les gènes de l'ARNr 16S sont en effet très conservés dans l'évolution parmi les espèces bactériennes, et peuvent ne pas suffire à différencier différentes souches, sous-espèces, voire même espèces d'*Ehrlichieae*.

L'étude des gènes de la protéine de choc thermique (*groESL*) ou de la citrate synthétase (*Glt-A*) donne des conclusions similaires quant aux rapprochements de genres que nous avons évoqués [12 , 13 , 14]. Il existe de plus grandes divergences dans les séquences

des gènes *GroESL* entre les différents génogroupes, avec 80 à 83% d'homologies entre les groupes 1 et 2, et 27 à 38 % seulement entre ces deux groupes et le troisième [12]. Inokuma évoque d'ailleurs les divergences non seulement génétiques mais aussi biologiques existant notamment au sein des *Anaplasma* ; il est donc probable que *Anaplasma phagocytophilum* fasse partie d'un nouveau genre dans un futur proche. La fusion entre les groupes 1 et 2 évoqués par Dumler et coll. [8], qui n'avaient pas pu prendre en compte les résultats d'Inokuma et coll. parus quelques mois après, pourrait donc se limiter à l'inclusion d'*A. phagocytophilum* dans le premier groupe [14].

La position d'*A. platys* et d'*A. bovis* reste incertaine compte-tenu des données limitées sur ces bactéries [8]. L'étude d'autres gènes, comme les gènes des protéines de surface, plus largement impliqués dans les processus immunopathologiques, pourrait donc permettre d'affiner encore cette classification [14 , 15].

Pour plus de clarté par la suite et compte tenu de la possible évolution de cette nouvelle classification proposée par Dumler et coll. [8], nous nous efforcerons de mentionner aussi souvent que nécessaire les deux dénominations pour les espèces modifiées, et continuerons d'employer le terme d'*Ehrlichieae*, par opposition à *Rickettsieae*, pour désigner les différents genres *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* et *Wolbachia pipientis* de la famille des *Anaplasmataceae*.

Le Tableau 1 fait le rappel des principales espèces d'*Ehrlichieae* que nous continuerons d'évoquer et de leur nouvelle nomenclature, ainsi que des maladies auxquelles elle se rapportent et des espèces atteintes.

Tableau 1 : Principales ehrlichioses et leur nouvelle nomenclature (d'après [3 , 8])

Espèce initialement décrite	Nouvelle nomenclature	Espèces atteintes	Maladies
<i>Rickettsia canis</i> puis <i>Ehrlichia canis</i>	-	Chien Canidés sauvages	Ehrlichiose monocytaire canine Pancytopenie tropicale canine
<i>Ehrlichia ewingii</i>	-	Chien	Ehrlichiose granulocytaire canine
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	-	Homme Chien	Ehrlichiose monocytaire humaine
<i>Cowdria ruminantium</i>	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Bovins Chien ?	Cowdriose ou „Heartwater“
<i>Ehrlichia equi</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Cheval Homme Chien Ruminants	Ehrlichiose granulocytaire equine Ehrlichiose granulocytaire humaine/canine Fièvre à tiques
Agent de l'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine			
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>			
<i>Ehrlichia platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>	Chien	Thrombopénie cyclique infectieuse
<i>Anaplasma marginale</i>	-	Ruminants	Anaplasmoses (des ruminants)
<i>Ehrlichia risticii</i>	<i>Neorickettsia risticii</i>	Cheval Chien	Fièvre du Potomac
<i>Ehrlichia sennetsu</i>	<i>Neorickettsia sennetsu</i>	Homme	Fièvre de Sennetsu
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	-	Chien Canidés sauvages	Maladie du saumon empoisonné

I.2. Caractéristiques phénotypiques

I.2.1. Morphologie et développement

I.2.1.1. Morphologie

Les *Ehrlichieae* sont entourées de deux fines membranes, interne et externe, constituées d'une bi-couche lipidique. Elles contiennent ADN et ribosomes, avec toutefois un génome quatre fois plus petit que celui d'*Escherichia coli* [2].

Microscopiquement, elles se présentent sous la forme de petits cocci - d'environ 0,5 µm - à Gram négatif, appelés **corps élémentaires**, et présents dans le cytoplasme à l'intérieur d'une membrane parasitophore issue de la cellule-hôte. Ils prennent une coloration basophile bleu foncée à mauve avec une coloration de type Romanowsky et rouge pâle avec une coloration de Macchiavello. Ces bactéries sont généralement rondes à ellipsoïdes, mais sont souvent pléiomorphes en culture [1 , 2 , 5 , 7, 16].

La fusion des lyzozomes avec la membrane parasitophore semble inhibée par le métabolisme des *Ehrlichieae*, comme le montrent les observations de Wells et Rikihisa sur *N. risticii* [17]. On a également pu montrer la capacité d'*A. phagocytophilum* à inhiber rapidement et durablement la production de dérivés actifs de l'oxygène *in vitro* [18].

I.2.1.2. Cycle de développement

A l'instar des *Chlamydies*, il existe plusieurs stades de développement, comme ont pu le montrer Nyindo et coll., en 1971 pour *E.canis* [16]. Un cycle identique à celui des *Chlamydies* n'a toutefois pas été démontré [2].

Les corps élémentaires pénétreraient dans la cellule par phagocytose et se diviseraient dans une membrane parasitophore provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte. Après 3 à 5 jours, on observe des amas d'éléments pléiomorphes comparables aux corps réticulés des *Chlamydies*, appelés **corps initiaux**. Enfin, ces corps initiaux se multiplieraient encore pour former en une semaine environ le stade **morula** - de 4µm de diamètre environ - spécifique de ce groupe, qui correspond à des micro-colonies pouvant

contenir jusqu'à 100 corps élémentaires (20 à 40 en moyenne). La sortie de la cellule se fait le plus fréquemment sans doute par exocytose, libérant ainsi les corps élémentaires [7].

E. canis, *E. (Cowdria) ruminantium* et *E. chaffeensis* ont tendance à donner des morulas très denses, dans lesquelles on distingue à peine les corps élémentaires, alors que les *Neorickettsia spp.* du groupe 3 sont généralement visibles sous forme individuelle ou seulement de quelques organismes dans la vacuole [5].

Sur frottis sanguins, *A. phagocytophilum* est visible soit sous forme de corps élémentaires, soit de corps initiaux homogènes, alors qu'en culture, on observe un cycle qui ressemble fortement à celui observé pour *E. canis*, avec une forme précoce réticulée et un stade final plus dense de type morula. Webster et coll. ont montré que la pénétration dans la cellule hôte faisait vraisemblablement partie de la voie d'endocytose classique, mais que les phagosomes contenant *A. phagocytophilum* ne parvenaient pas à arriver à maturation en phagolysosomes [19].

I.2.2. Métabolisme et mise en culture

I.2.2.1. Métabolisme

Leur métabolisme est aérobie et elles sont capables de produire de l'ATP, la glutamine semblant être leur substrat préférentiel, contrairement aux *Rickettsiaceae* qui utilisent plutôt le glutamate, libre dans le cytoplasme. Il semble que ce dernier traverse moins bien le phagosome. Par contre, tout comme les *Rickettsiaceae*, elles ne métabolisent pas le glucose et le glucose 6P [2, 5]. Ces bactéries ne sont par ailleurs pas acidophiles, contrairement aux *Coxiella*, puisque leur production d'ATP diminue fortement avec un pH inférieur à 7.

I.2.2.2. Cultures bactériennes

La mise en culture des *Ehrlichieae* a été faite sur des cellules de première explantation (monocytes canins et humains) ou sur des lignées cellulaires (cellules hybrides MDH-SP, cellules DH-82...) [5, 20].

E. canis a été cultivée sur des monocytes de chiens en phase aiguë de la maladie par Nyindo et coll. en 1971 [16], puis Hemelt et coll. ont mis au point une technique de culture sur des monocytes de chiens sains, qui permettent un taux d'infection plus important [21]. Puis l'utilisation d'autres lignées cellulaires et de lignées cellulaires hybrides a permis de faciliter et d'améliorer le rendement de ces cultures [22-24].

Neorickettsia helminthoeca a été cultivée en 1972 sur des monocytes de chiens [25] puis sur lignées cellulaires [26]. *Ehrlichia sennetsu* et *Ehrlichia risticii* ont aussi été largement cultivées et étudiées sur de nombreuses cellules (cellules endothéliales, monocytes...).

A ce jour toutefois, différentes *Ehrlichieae* n'ont pas encore pu être mises en culture, et notamment *E. ewingii*, *A. platys* ou encore *A. bovis* [8]. Le Tableau 2 montre les cultures réalisées pour les quelques *Ehrlichiae* qui nous intéressent.

Tableau 2 : Culture de quelques *Ehrlichieae* sur lignées cellulaires (D'après [5 , 8, 24 , 27 , 28 , 29])

Espèce	Lignées cellulaires
<i>Ehrlichia canis</i>	Hybride chien-humain, DH82, hybride souris-chien, MDH-SP, J774.A1, O30, EU.HMEC-1
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	DH82, diverses lignées de macrophages
<i>Ehrlichia muris</i>	Diverses lignées de macrophages
<i>Ehrlichia ewingii</i>	-
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Diverses lignées de macrophages et de cellules endothéliales
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	DH82, diverses lignées de macrophages
<i>Neorickettsia (Ehrlichia) risticii</i>	P388D1, T-84, U-937, diverses lignées de macrophages
<i>Neorickettsia (Ehrlichia) sennetsu</i>	P388D1, L929, FL, HeLa, diverses lignées de macrophages
Agent SF	RK-13, diverses lignées de macrophages
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	HL60, cellules embryonnaires d' <i>I. scapularis</i>
<i>Anaplasma platys</i>	-
<i>Anaplasma bovis</i>	-

I.2.3. Principaux antigènes

Il n'y a pas de réaction croisées en IFI entre les *Anaplasmataceae*, et les *Rickettsiaceae* ou les *Chlamydiaceae*. Toutefois, une protéine de choc thermique de 60 kDa (HSP60) environ semble conservée par toutes les *Rickettsiales* et réagit avec des protéines de 58 à 65 kDa de certaines *Ehrlichieae*. Les HSP 60 des *Ehrlichieae* ne réagissent apparemment pas avec la protéine de choc thermique GroESL d'*Escherichia coli* [2, 5]. Selon certains auteurs également, il existerait de possibles réactions croisées en sérologie entre *A. phagocytophilum* (HGE) et *Borrelia burgdorferi* [30, 31]. Mais il peut s'agir également de co-infection ou de co-exposition compte tenu de l'épidémiologie assez proche de ces deux bactéries [1].

Il est intéressant de constater qu'il existe une **communauté antigénique entre les membres d'un même génogroupe**, essentiellement pour des antigènes de surface [2]. *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ruminantium* et VHE possèdent un complexe antigénique majeur de surface commun de **28-32 kDa** ; *A. phagocytophilum* possède un complexe antigénique majeur de surface de **42-49 kDa** et *N. sennetsu*, *N. risticii* et l'agent SF ont en commun un complexe de surface majeur de **51-55 kDa** [2, 8]. Par contre, *N. helminthoeca* et *N. elokominica*, qui appartiennent au même génogroupe, semblent distincts du point de vue antigénique [28].

Les protéines de surface des *Ehrlichieae* du groupe 1 et 2, ainsi que de *Wolbachia pipientis*, sont codées par une **famille de multigènes polymorphiques**, homologues mais non identiques [7, 8]. Rikihisa souligne l'importance potentielle de cette diversité pour les antigènes de surfaces dans la pénétration cellulaire, la persistance des infections, l'échappement au système immunitaire et l'induction de la pathogénie [2].

E. canis possède des protéines de surface d'environ 30 kDa, **P30**, qui sont des antigènes majeurs reconnus systématiquement. Elles présentent une forte réactivité croisée avec les antigènes de 28 kDa - OMP-1S ou **P28** - d'*E. chaffeensis* [2]. Il en existe **plusieurs copies** dans le génome (*p30*, *p30-1*, *p30-a...*), avec des degrés de similitude de 24,7 à 71,8 %. On trouvera également la famille de multigènes *p28*, initialement clonée et séquencée sur *E. canis* par McBride [32, 33].

Les protéines **P30** et **P28** d'*E. canis* et d'*E. chaffeensis* possèdent des propriétés antigéniques communes avec une protéine immunodominante d'environ 31-32 kDa d'*E.*

(*Cowdria*) *ruminantium*, **MAP-1** ou Cr32, provenant par contre d'un gène unique ; il existe malgré tout de légères variations entre les différentes souches d'*E. ruminantium* [2].

Les gènes *map-1*, *p30s* et *p28* sont très proches également des gènes du groupe *mSP-2* codant pour des peptides d'environ 36 kDa, et *mSP-4*, codant pour les peptides précurseurs d'une protéine majeure de 31 kDa d'*A. marginale* [2, 8]. La même famille de multigène code également pour les protéines de surface dominantes **P44** d'*A. phagocytophilum*, qui sont donc très proches des protéines de surface d'*E. canis*, *E. (Cowdria) ruminantium* ou *E. chaffeensis*, ce qui explique la possibilité d'un **certain degré de réactivité antigénique croisée** entre les membres du groupe 1 et 2 [2, 8].

Malgré l'hétérogénéité moléculaire au sein du groupe *Neorickettsia*, il existe une très forte homogénéité antigénique entre *N. sennetsu*, *N. helminthoeca*, *N. risticii* et l'agent SF, mais pas avec les autres *Ehrlichieae* [8].

Enfin, notons que la diversité antigénique a été décrite au sein d'une même espèce, comme cela a été montré pour *E. canis* [34], *N. risticii* [35], *E. chaffeensis* [36] ou encore pour *A. phagocytophilum* [37].

1.3. Vecteurs et modes de transmission

Une des grandes caractéristiques de ces bactéries à Gram négatif est, comme pour les *Rickettsies*, la transmission essentiellement vectorielle.

1.3.1. Vecteurs

On a pu constater que chaque membre d'un même génogroupe semble associé à des vecteurs identiques. Ainsi, les membres des génogroupes 1 et 2 sont transmis par des **arthropodes** [1, 6]. Les membres du groupe 2 seraient principalement transmis par des tiques du genre *Ixodes*, alors que les *Ehrlichieae* du premier groupe seraient essentiellement transmis par des tiques dures autres que *Ixodes* (*Dermacentor sp.*, *Amblyoma sp.*, *Rhipicephalus sanguineus*...).

Toutefois, beaucoup d'observation permettent aujourd'hui de constater que les vecteurs sont relativement variables d'un pays à l'autre, ce qui semble montrer une certaine

adaptabilité à différents vecteurs, et permettrait en partie d'expliquer en partie leur émergence dans de nombreux pays [38 , 39] [40].

Depuis les premières descriptions d'*A. phagocytophila* et d'*E. equi*, l'importance de ces ehrlichioses granulocytaires (EG) s'est accrue, notamment avec la reconnaissance de cas humains [41 , 42].

En Europe, le vecteur de ces EG est *Ixodes ricinus*, qui parasite de nombreuses espèces animales et l'homme, bien que l'on ait retrouvé *A. phagocytophilum* dans la tique dure *I. trianguliceps* au Royaume-Uni [43 , 44]. Aux Etats-Unis, le vecteur est principalement *Ixodes scapularis* [45].

Ces *Ehrlichieæ* ont pu être détectées chez de nombreuses espèces, comme le mouton, le chien, les bovins, la chèvre, et les chevaux, qui sont des cibles des formes imaginaires. Les moutons peuvent rester porteurs d'*A. phagocytophilum* jusqu'à 25 mois après la rémission des symptômes, et le sang reste infectieux [5].

Les rongeurs, cibles électives des larves, sont les réservoirs potentiels les plus probables des EG. Les formes nymphales, quant à elles, piquent préférentiellement les oiseaux et les plus grands animaux, ce qui fait de ces espèces encore des réservoirs potentiels [1].

Les formes adultes d'*I. ricinus* ou d'*I. scapularis* parasitent également le chevreuil et le cerf ; ces trois espèces intervenant aussi dans le cycle épidémiologique de la borréliose de Lyme, le diagnostic différentiel devra être fait entre cette maladie et l'EG dans une zone d'endémie ou lors d'un antécédent de morsure par cette espèce de tique [1, 45]. Ces *Ehrlichieæ* granulocytaires sont donc présentes dans la nature chez les rongeurs, et les plus grands animaux, dont les animaux domestiques, permettraient d'assurer la pérennité de l'infection chez les tiques, et par conséquent l'augmentation des infections chez les mammifères et chez l'homme [1]. Les grands mammifères sauvages serviraient quant à eux surtout de révélateurs de la maladie, puisqu'ils semblent constituer, comme pour la borréliose, des culs de sac épidémiologiques [44]. Cet exemple dénote bien le caractère complexe de l'épidémiologie de cette maladie en pleine expansion, qui reste malgré tout une zoonose mineure ; d'autres études et notamment une meilleure détection clinique s'imposent pour faire le point sur cette maladie en France et en Europe [39].

Les membres du troisième groupe, plus éloignés des deux autres, sont associés à un **vecteur trématode**, qui infecte soit des **escargots**, des **poissons** ou encore des

insectes aquatiques [8]. Ceci a été mis très tôt en évidence pour l'agent SF [46] et pour *Neorickettsia helminthoeca* [47]. On suspecte également fortement la transmission de *Neorickettsia sennetsu* par *S. falcatius* ou un autre trématode parasite du mulet gris au Japon, ce qui expliquerait les données épidémiologiques (population atteinte, répartition géographique, consommation de poisson cru dans cette partie du monde...) [8].

C'est également le cas plus récemment pour *Neorickettsia (Ehrlichia) risticii*, pour laquelle les recherches d'un arthropode vecteur s'étaient toujours révélées infructueuses [2]. On avait pu mettre en évidence une transmission orale de *N. risticii* qui entraîne une fièvre du Potomac chez le cheval [48], mais elle ne semblait pas pouvoir être la voie naturelle de contamination [5]. Toutefois, la proximité phylogénique avec *N. sennetsu* et l'agent SF, et à un moindre degré à *N. helminthoeca*, permet de penser à la possibilité d'un trématode vecteur. Par ailleurs, la plupart des données épidémiologiques vont également dans ce sens : découverte près de la rivière Potomac, proximité fréquente d'un court d'eau ou de terrains inondables... *N. risticii* a également pu être isolée sur des **trématodes parasites d'escargots** en aquarium [49], et plus récemment encore en zone endémique [50]. La transmission orale de la maladie par **ingestion d'insectes aquatiques** naturellement infectés a été faite récemment [51].

Enfin, *Wolbachia pipientis* est transmise par un moustique (*Culex pipiens*) [52], mais est découverte également dans un nombre croissant d'arthropodes et d'helminthes [8].

I.3.2. Modes de transmission

La transmission des *Ehrlichia spp.* et des *Anaplasma spp.* est essentiellement vectorielle, par l'intermédiaire de morsures de tiques, comme nous l'avons vu. Il faut aussi garder en mémoire la possibilité d'infection directement par voie sanguine (transfusion) à partir d'un animal atteint en phase aiguë en particulier.

Le vecteur arthropode se contamine après un repas de sang sur un animal atteint. Pour *E. canis*, ce repas a lieu dans les 2 à 3 premières semaines de l'infection, lorsque les monocytes parasités sont les plus nombreux dans le torrent circulatoire [53]. Les *Ehrlichieae* se répliquent dans les tiques et sont ensuite **transmises horizontalement** (par piqûre) à partir des cellules du vecteurs (sécrétions salivaires) jusqu'aux cellules sanguines de l'animal et de l'homme [2].

Une **transmission trans-stadiale** a pu être mise en évidence chez *Rhipicephalus sanguineus* porteur d'*E. canis* [54], ainsi que pour *A. phagocytophilum* [1], mais la transmission trans-ovarienne chez *Ixodes scapularis* semble impossible ou inefficace [55]. **Aucune transmission trans-ovarienne** n'a d'ailleurs pu être mise en évidence pour les principaux vecteurs étudiés [8]. Toutefois, la découverte d'organismes du groupe *A. phagocytophilum* par PCR dans des larves d'aoûtats (*Neotrombicula autumnalis*) remet cette question en suspens [40].

Pour les membres du groupe *Neorickettsia*, la transmission se fait, semble-t-il, essentiellement par voie orale, par ingestion de poissons, d'escargots ou encore d'insectes aquatiques parasités par des cercaires ou des métacercaires de certains trématodes infectés. Chez les chevaux, l'ingestion d'insectes semble prédominante et peut se faire lors de la **pâturage** ou dans des **cours d'eau où ils s'abreuvent** [51, 56, 57]. Chez l'homme, les infections surviennent vraisemblablement plus volontiers lors de consommation de **poissons crus** ou peu cuits [8].

I.4. Interaction avec l'hôte

I.4.1. Pouvoir immunogène

Que l'infection soit naturelle ou expérimentale, symptomatique ou non, les *Ehrlichieae* entraînent une réponse immunitaire chez l'hôte, avec la **production d'anticorps spécifiques**. Mais cette production d'anticorps ne semble pas toujours corrélée à un pouvoir protecteur chez l'hôte [2], même si l'utilisation de sérums anti-*E. canis* semble ralentir la progression du germe *in vitro* sur des cultures cellulaires [58].

Si les infections persistantes, récurrentes, ou les ré-infestations semblent la règle dans l'ehrlichiose monocyttaire due à *E. canis* chez le chien, une **immunité de ré-infestation** a toutefois pu être observée dans de nombreuses espèces, au moins expérimentalement [5].

Les chiens survivant à l'infection par *N. helminthoeca* développent une immunité de ré-infection solide envers cet agent [59].

Les chevaux atteints de fièvre du Potomac présentent également une longue période de résistance aux ré-infestations par *N. (Ehrlichia) risticii*, au delà de 20 mois, et l'on peut isoler cet agent pathogène dans le côlon pendant 28 jours après rémission des symptômes [60]. Toutefois, il semble dans ce cas que la mise en place d'une réponse humorale efficace joue un rôle [2].

Une **immunité de ré-infestation croisée** a également pu être mise en évidence expérimentalement : *N. (Ehrlichia) sennetsu*, qui n'a pas de pouvoir pathogène chez le cheval, le protège efficacement contre les infections expérimentales par *N. (Ehrlichia) risticii* [61].

Chez les bovins aussi, il existe une protection relative pendant 6 à 8 mois contre les réinfections par *E. (Cowdria) ruminantium*; elle ne semble toutefois pas liée à la présence d'anticorps protecteurs, mais davantage à la mise en place d'une immunité cellulaire efficace [62], et ces animaux restent porteurs sains de la bactérie pendant plusieurs mois après rémission des symptômes. On peut alors se demander s'il en est de même pour des poneys réinfectés par *E. equi (A. phagocytophilum)* qui, après un traitement aux tétracyclines, ne développent plus que des signes atténués de la maladie suite à une infection expérimentale [63]. Les bovins infectés par *A. phagocytophilum* développent également une immunité de prémunition efficace [44].

Une étude sur le modèle murin d'*A. phagocytophilum* a permis de suspecter un rôle important de l'interféron gamma dans la résolution de la maladie, puisque les souris knock-out $INF\gamma^{-/-}$ avaient une charge bactérienne bien plus importante [64]. Toutefois, l'infection a tout de même été maîtrisée, ce qui laisse supposer que d'autres facteurs interviennent dans ce modèle.

Sun et coll. ont pu observer un certain **pouvoir protecteur lié à des facteurs humoraux**, ce qui laisse penser que les anticorps pourraient avoir un certain rôle protecteur également [65].

I.4.2. Pouvoir pathogène

L'**incubation** des ehrlichioses est généralement de une à trois semaines et l'existence de signes cliniques pourrait être dose-dépendante, comme le montre l'étude de Rikihisa [66] sur des souris infectées avec des doses différentes d'*Ehrlichia spp.* Le pouvoir pathogène peut aussi dépendre de souches plus ou moins virulentes, de l'espèce cible, d'une sensibilité individuelle ou de la réponse immunitaire de l'hôte... [5]

La plupart de ces bactéries peuvent être isolées dans des cellules sanguines ou dérivées (macrophages tissulaires) lors de la phase aiguë de la maladie, exception faite des certaines bactéries à tropisme endothélial (*E. ruminantium*). Il existe une certaine **spécificité cellulaire**, mais on ne sait pas si elle est liée uniquement à des récepteurs spécifiques sur la cellule-hôte, comme pour *A. phagocytophilum* [67], ou si elle tient simplement de l'incapacité de la bactérie à survivre ou à proliférer dans d'autres types cellulaires [5].

On constate aussi que chaque espèce a des **sites de prédilection dans l'organisme** de l'hôte. Ainsi, on retrouve *N. risticii* dans les monocytes sanguins et les mastocytes, mais également dans les cellules coliques du cheval, causant les diarrhées profuses observées lors de fièvre du Potomac ; des cellules qui ont habituellement des capacités de phagocytose limitée, comme les cellules épithéliales du côlon ou les mastocytes, semblent pouvoir phagocyter *N. risticii* [5, 8].

Chez le chien, *E. canis* est particulièrement présente dans les cellules de la lignée blanche, notamment en périphérie des vaisseaux sanguins des poumons, des reins et des méninges, alors que *N. helminthoeca* est observée essentiellement dans les nœuds lymphatiques.

E. (Cowdria) ruminantium est responsable de troubles nerveux chez les bovins du fait de sa localisation dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins méningés [5].

A. phagocytophilum semble infecter en premier lieu les cellules myéloïdes immatures, donnant des neutrophiles circulants infectés qui se disséminent dans l'organisme [8, 68].

Contrairement aux infections par les *Rickettsieae*, les *Ehrlichieae* entraînent une **cytolysse réduite**. La sortie de la cellule semble se faire essentiellement par **exocytose**. Les macrophages sont capables de phagocyter les *Ehrlichieae*, mais celles-ci inhibent la fusion lysosomiale avec la vacuole parasitophore [5].

In vitro, les *Ehrlichieae* n'activent pas les macrophages contrairement aux autres bactéries, et on a montré que *N. risticii* phagocytée dans les macrophages n'active pas la production de TNF-alpha ou de PGE-2, probablement du fait de l'absence de lipopolysaccharide [2, 5]. Cette observation semble en corrélation avec la **faible réaction inflammatoire** observée dans les tissus atteints. Par contre, on observe une forte production d'IL-1 qui expliquerait en partie la pathogénie de ces maladies.

L' $\text{INF}\gamma$ semble également jouer un rôle très important dans l'induction d'une réponse inflammatoire tissulaire dans le modèle murin d'*A. phagocytophilum*, alors que la production de cytokines anti-inflammatoires de type IL-10 permettraient de moduler cette réponse [64]. La transposition de ce modèle à la pathogénie humaine ou canine n'est pas encore établie, mais il est intéressant de constater que les **mécanismes immunologiques** semblent y prendre une part plus importante que la bactérie elle-même. On ignore encore également par quel(s) signal(ux) ces bactéries induisent une réponse immunitaire.

Durant la phase aiguë de la maladie, on ne retrouve généralement pas de lésions caractéristiques. Seule une **lymphadénopathie** est quasiment constante lors d'ehrlichioses. Une plasmocytose est également retrouvée lors de l'infection par *E. canis* [69] et *A. platys* [70] chez le chien et dans certains cas fatals d'ehrlichioses humaines [71].

Les **affections hématologiques** sont prédominantes dans les ehrlichioses, contrairement aux rickettsioses. Une **leucopénie** est généralement la règle, suivie d'une leucocytose réactionnelle. Une **thrombopénie** est notée dans les infections à *E. canis*, *E. equi* (*A. phagocytophilum*), *A. (Ehrlichia) platys*, et *A. phagocytophila* (*A. phagocytophilum*), ainsi que lors de certaines ehrlichioses humaines [5, 6]. La pathogénie n'est pas toujours bien connue et sera discutée dans la seconde partie pour le cas particulier d'*E. canis*.

Enfin, un certain **pouvoir immunosuppresseur** semble associé à certaines ehrlichioses. Il a été mis en évidence expérimentalement chez les souris et les chevaux infectés par *N. risticii* [5]. L'induction des protéines du CMH de classe II par l' $\text{INF}\gamma$ semblait inhibée dans les macrophages infectés par la bactérie, ce qui suppose une réduction de la réponse cellulaire lors de fièvre du Potomac ; cette réduction est temps-dépendante et dose-dépendante.

Une capacité à réduire la réponse humorale et l'activité des polynucléaires neutrophiles a été documentée pour *A. phagocytophilum* [5], mais il est difficile d'évaluer les implications cliniques de cette baisse de l'immunité [39].

Chez le mouton, on observe une diminution des populations CD4+ et des LT- $\gamma\delta$, notamment CD25+, avec une augmentation des CD8+ et d'une population WC1+ de LT- $\gamma\delta$. Les LB et les leucocytes exprimant le CMH de classe II et CD11b étaient également réduits, ainsi que l'expression de CD11b et CD14 sur les granulocytes. Les grandes voies de l'immunité comme la réponse aux vaccins, à la prolifération *in-vitro* des lymphocytes soumis à des antigènes ou des mitogènes, ainsi que la réponse à l'IFN γ suite à une stimulation antigénique, étaient **réduites jusqu'à 4 semaines après l'infection** [72].

Chez l'homme, les décès constatés lors d'infections par *A. phagocytophilum* sont généralement dus à des **infections opportunistes**, comme des affections fongiques (candidoses) localisées ou généralisées, qui laissent suspecter un certain degré d'immunodépression qu'il reste à objectiver [73].

Un certain degré d'immunosuppression a également été observé sur des souris infectées par *E. muris* [2].

Avec ces généralités, nous avons pu mettre en évidence la complexité de ce « groupe » des *Ehrlichieae*, au travers d'une classification en pleine évolution, de communautés morphologiques, métaboliques, génétiques et antigéniques fortes ; mais il existe également des divergences étonnantes, notamment dans les manifestations cliniques ou le pouvoir pathogène de différentes espèces ou souches.

On pensait autrefois que les *Ehrlichieae* étaient très spécifiques d'hôtes, et c'est pourquoi elles ont reçu des noms en fonctions des espèces chez lesquelles on les a découvertes. Mais on s'est aperçu qu'il existait des possibilités d'infection, expérimentalement, mais aussi dans les conditions naturelles, par des *Ehrlichieae* d'autres espèces, avec ou sans conséquence clinique.

Ainsi, le chien peut être naturellement ou expérimentalement atteint par plusieurs *Ehrlichieae* qui retiendront notre attention dans la suite de cet exposé.

II. SECONDE PARTIE : L'EHRLICHIOSE MONOCYTAIRE CANINE

Nous aborderons en premier lieu l'ehrlichiose monocytaire du chien, qui fût la première découverte et qui reste encore, dans cette espèce tout au moins, la maladie plus connue par les praticiens et la plus étudiée par les scientifiques.

Nous ferons une présentation classique, en évoquant successivement l'étiologie, l'épidémiologie, la pathogénie, la clinique, le tableau nécropsique, et enfin quelques éléments pronostiques, thérapeutiques et prophylactiques.

Sans vouloir être absolument exhaustive, cette partie tentera de mettre en avant les principaux éléments nécessaires au diagnostic qui sera abordé ultérieurement.

II.1. Étiologie

L'ehrlichiose monocytaire canine (EMC) est due à l'infection par *Ehrlichia canis*, qui a un tropisme pour les cellules mononucléées. Elle a été découverte en 1935 en Algérie par Donatien et Lestoquard, qui la nommèrent *Rickettsia canis* [74]. Le nom de genre *Ehrlichia* lui fut donné 10 ans plus tard en l'honneur de Paul Ehrlich [8].

E. canis fut ensuite décrite dans d'autres pays à travers le monde, en Asie ou aux Etats-Unis, jusqu'au milieu des années 60, sans que son impact potentiel ne soit réellement apprécié alors [5] [75].

C'est plus particulièrement lors des guerres de Corée et du Viêt-Nam que l'EMC prit toute son importance, décimant de nombreux chiens de l'armée américaine. On décrivait alors une forme aiguë caractérisée par des signes modérés, avec fièvre, perte de poids modéré et anorexie, accompagnés d'une polyadénomégalie, et une forme chronique, avec un tableau hémorragique, des œdèmes et un état de choc conduisant à la mort. Les signes biologiques étaient principalement une thrombopénie, une leucopénie et une hypergammaglobulinémie ; cette forme sévère fut nommée « **Pancytopénie tropicale canine** » [5, 76].

Les animaux les plus sensibles à cette maladie étaient les chiens de race Berger allemand, et notamment les animaux n'ayant jamais séjourné en Asie. L'existence d'infections par d'autres agents pathogènes (*Hemobartonella*, *Babesia*) pouvait accentuer les signes cliniques [75] [5].

L'EMC a également reçu d'autres noms au cours du temps tels que « typhus canin », « fièvre hémorragique canine », « syndrome hémorragique idiopathique »...[53]. Actuellement, on a isolé et caractérisé génétiquement chez le chien de nombreuses souches d'*Ehrlichia canis* distinctes : la souche Floride, Oklahoma, Israël [77], mais encore Gzh982, Germishuys, Jake, Gxht67, Okinawa...[78]. Il existe des différences entre ces souches, aussi bien du point de vue génétique que du point de vue antigénique semble-t-il [79 , 80].

II.2. Épidémiologie

II.2.1. Animaux atteints

E. canis atteint le chien, ainsi que d'autres **Canidés sauvages**, comme le loup (*Canis lupus*), les renards (*Vulpes vulpes*, *Vulpes fulva* ou *Urocyon cinereoargenteus*), le coyote (*Canis latrans*) ou encore le chacal à dos argenté (*Canis mesomelas*) [81 , 82].

E. canis peut également infecter le chat [8, 83]. En France, des infections par une *Ehrlichia* chez le chat ont été décrites dans la région de Sommières, dans le Sud de la France [84], et une identification génétique a permis de conclure à la présence d'*E. canis* chez les chats testés, ou bien d'une espèce très proche présentant des réactions sérologiques croisées, puisque seules 382 pb ont été séquencées [85].

Les carnivores ne semblent pas seuls concernés et *E.canis*, ou des agents très proches, ont pu être isolés chez des herbivores également [78, 86].

Une *Ehrlichia* génétiquement très proche d'*E. canis Oklahoma* a été isolée sur un homme asymptomatique au Venezuela et nommée VHE [10]. Elle est actuellement considérée comme une souche ou une sous-espèce d'*E. canis*. Il semble que le chien, chez qui on a pu isoler une souche identique du point de vue antigénique et génétique, soit un des réservoirs de cet agent pathogène dans cette région du globe [78].

Chez le chien, il n'existe aucune prédisposition de sexe ou d'âge, selon les différentes études rétrospectives effectuées [69 , 87, 88, 89-91].

Toutefois, la forme et la sévérité de la maladie sont différentes selon la race des individus. Ainsi, lors d'atteintes expérimentales, les Beagles semblent être porteurs chroniques de la bactérie, développant des signes modérés de façon cyclique, et principalement des signes hématologiques, alors que les **Bergers allemands** développent une forme chronique grave dès la septième semaine [92, 93]. Il semble que la réponse immunitaire cellulaire soit nettement moins efficace dans cette race [94].

Il semble également que les chiens issus de croisement variés (races communes) soient moins représentés que les chiens de race pure dans diverses études rétrospectives [77, 89] ; cela peut s'expliquer par une moindre résistance à la maladie chez les chiens de

race, ou tout simplement par une plus grande médicalisation de la part de leurs propriétaires.

II.2.2. Vecteur et mode de transmission

E. canis est transmise par la tique brune du chien *Rhipicephalus sanguineus*. Il s'agit d'une tique thermophile qui nécessite donc des températures douces, supérieures à 5 °C, et une humidité relative [95].

Toutes les formes, larvaire, nymphale et imaginaire, peuvent transmettre le parasite au chien. Toutefois, les tiques adultes ont la durée de survie la plus longue (jusqu'à 568 jours) et semblent donc jouer le rôle le plus important dans la transmission de la maladie [77].

L'afflux massif de monocytes suite à l'inflammation sur le lieu d'implantation de la tique favoriserait l'infection [5].

La contamination de la tique se fait par ingestion de monocytes infectés, lors d'un repas de sang sur un animal contaminé en phase aiguë de la maladie. C'est en effet durant les trois premières semaines de la maladie que les monocytes infectés circulants sont les plus nombreux [53]. Des antigènes d'*E. canis* circulant ont par ailleurs été mis en évidence expérimentalement chez de tels chiens [96].

La détection d'ADN d'*Ehrlichia canis* dans le sang de chiens infectés expérimentalement 34 mois après l'infection pourrait faire des chiens en phase subclinique une source possible de contamination, et donc un réservoir potentiel [97].

Les bactéries se multiplient dans les hémocytes et les cellules des glandes salivaires de la tique, et rejoignent éventuellement l'épithélium intestinal [5].

La transmission chez la tique est uniquement trans-stadiale. Elle transmet alors le parasite au chien lors de son repas de sang aux stades suivants. La tique peut rester infestante pendant plus de 155 jours ; il lui est donc possible de survivre l'hiver et de transmettre la maladie au chien au printemps suivant. Elles peuvent ainsi constituer un réservoir de la maladie malgré l'absence de transmission trans-ovarienne [54].

Les tiques infestées et les chiens en phase aiguë de la maladie constituent donc le principal réservoir d'*E. canis*. Le réservoir sauvage est également considéré comme important (Canidés sauvages et peut-être rongeurs) [98]. Etant donné l'absence de véritable hôte intermédiaire, les transfusions sanguines sont des sources potentielles de contamination.

D'autres tiques pourraient également jouer un rôle dans la transmission de cette bactérie, dont *Dermacentor variabilis* [99] ou encore *Boophilus microplus* qui est une tique de la chèvre [38].

II.2.3. Répartition de la maladie

E. canis est connue à travers tous les continents, sauf, semble-t-il, sur le territoire australien, malgré la présence de son vecteur naturel ; ceci a été confirmé récemment par une étude sérologique dans ce pays [82].

L'incidence est plus importante dans les régions tropicales et sub-tropicales [2 , 15, 38, 86, 100, 101]. Dans les régions tempérées, elle augmente durant les mois chauds, de mai à novembre globalement dans l'hémisphère nord [69, 77].

Sa répartition dépend de celle de son vecteur ; en Europe, elle concerne essentiellement le bassin méditerranéen (Sud-est de la France, Corse, Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Turquie...), où la maladie est endémique et où sa prévalence sérologique peut atteindre 20% ou plus [20, 102]. Des cas retrouvés dans d'autres pays d'Europe comme l'Allemagne, la Suisse ou le Royaume-Uni semblent être des cas importés [1]. Toutefois, la présence relativement **ubiquitaire** de *R. sanguineus* permet de penser que l'installation définitive de micro-foyers endémiques dans ces régions est probable, même si elle n'a pas encore été démontrée [103 , 104 , 105].

Aux Etats-Unis, l'EMC est une des maladies infectieuses du chien les plus répandues dans plus de 34 états dans lesquelles *R. sanguineus* réside [53].

Il semble exister une **diversité antigénique** à travers le monde comme le montre une étude en Western-blot réalisée récemment sur des sérums de chiens infectés par la bactérie dans différentes régions du globe [34]. Dans cette étude, on remarque une

homogénéité dans les profils de chiens d'Amérique, de France, d'Israël et des Iles Vierges, alors que les chiens d'Italie ou du Zimbabwe présentent des profils légèrement différents (cf. II.4. Pouvoir immunogène)

II.3. Pouvoir pathogène

Les mécanismes immunologiques apparaissent de plus en plus évidents comme base essentielle de la pathogénie de l'EMC, à tous les stades de la maladie, comme semblent le montrer l'infiltration plasmocytaire diffuse, l'hypergammaglobulinémie polyclonale, le test de Coombs parfois positif, la démonstration récente d'anticorps anti-plaquettes [106], et la présence de complexes immuns [107]. Toutefois, l'absence de modèle expérimental d'ehrlichiose chronique rend encore la pathogénie de cette phase de la maladie assez mystérieuse.

La réponse immunitaire humorale se traduit par la production d'anticorps ne présentant aucun pouvoir protecteur ; cette **production d'anticorps inadéquate** pourrait intervenir dans la pathogénie de la forme chronique. On constate par ailleurs, dans les études menées en Western-blot, que la production d'anticorps (Ac) est d'abord dirigée contre les molécules de faible poids moléculaire durant la phase aiguë, puis contre des molécules de plus hauts poids moléculaires par la suite [106].

Suite à la pénétration dans l'organisme, *E. canis* se loge dans les ganglions et est prise en charge par les cellules du système des phagocytes mononucléés de la rate et du foie principalement. Puis ces cellules mononucléées infectées se disséminent dans l'organisme et entraînent des lésions de **vascularite** en interagissant avec les cellules endothéliales. Ces lésions sont responsables des principales observations cliniques, variables selon les organes atteints [3 , 11].

On a également pu mettre en évidence l'antigène soluble, bien qu'*E. canis* soit une bactérie intracellulaire stricte [96]. Cette détection est à priori limitée à la phase aiguë de la maladie, sur des durées courtes mais très variables, et en quantités très variables également. Elle semble liée à la multiplication très rapide d'*E. canis* dans les premiers temps et à un certain niveau de relargage d'antigène dans le plasma. On a également remarqué une présentation importante de l'antigène à la surface des cellules-hôtes ; il se

peut donc qu'une certaine quantité de ces antigènes se retrouve dans le torrent circulatoire, suite aux phénomènes d'ADCC (*Antibody-Dependant Cell Cytotoxicity*) sur les cellules infectées, favorisés par la présence rapide d'IgG, comme c'est le cas lors d'infections à *N. (Ehrlichia) risticii* chez le cheval [108]. On a également pu suspecter une parasitémie cyclique lors de la phase subclinique de la maladie [109].

L'**incubation** dure entre 8 et 20 jours. Les premiers symptômes sont de la fièvre et de l'anorexie, probablement liés. La rate semble jouer un rôle important dans la pathogénie de la maladie [110]. Les chiens non splénectomisés présentent une anorexie plus notable que les chiens splénectomisés dans cette étude. Cette observation semble s'expliquer par le fait que la fièvre apparaît significativement plus tôt et est significativement moins importante dans ce dernier groupe de chiens. L'élimination du principal organe colonisé par la bactérie semble donc diminuer l'intensité des symptômes. L'hypothèse d'une synthèse de médiateurs de l'inflammation d'origine splénique a également été avancée [106].

La rate semble également être le dernier organe à contenir le parasite durant la guérison, et il est possible que la bactérie se « cache » dans les macrophages spléniques, échappant ainsi au système immunitaire [97 , 109]. On a ainsi pu mettre *E. canis* en évidence par PCR à partir de ponction de rate sur des Beagles trois ans après l'infection expérimentale [97].

II.3.1. Modifications hématologiques

II.3.1.1. Troubles de l'hémostase primaire

II.3.1.1.1. Thrombopénie

Les mécanismes de la thrombopénie lors de la phase aiguë ne sont pas encore totalement élucidés ; elle semble être **pluri-factorielle**. Les principales hypothèses sont une consommation accrue due à une **vascularite** généralement observée, une **séquestration splénique**, une **destruction à médiation immune**, et toutes sortes de dommages entraînant une moindre durée de vie des plaquettes [106].

Des études de marquage au Phosphore 32 ont montré une durée de vie des plaquettes plus faible chez des chiens infectés, de l'ordre de 4 jours au lieu de 9, dès le deuxième

jour de l'infection [111]. De plus, un **facteur soluble** produit par les plasmocytes a été mis en évidence par Kakoma, et coll., et appelé **PMIF** (Platelet Migration Inhibiting Factor). Ce facteur est identique à celui observé dans les maladies auto-immunes humaines et agit en inhibant la formation de pseudopodes et peut-être en favorisant la séquestration des plaquettes dans divers organes dont la rate [112].

L'hypothèse d'**anticorps anti-plaquettes (AcAP)** avait longtemps été rejetée ; cela ne semblait pas compatible avec la précocité de la thrombopénie, observée en moyenne 4 jours après l'infection. De plus, on a observé une libération de PF-3 diminuée, alors que celle-ci est généralement augmentée dans les cas de thrombopénies dues à des anticorps anti-plaquettes, du fait des lésions membranaires engendrées par ces derniers [113].

Mais la démonstration de ces AcAP a été faite plus tard sur des chiens infectés expérimentalement, par une méthode indirecte en cytométrie [114]. La cinétique de ces anticorps a été également étudiée [115]. On a ainsi pu détecter, des AcAP dès le 7^e jour post-infection chez un chien, et au plus tard à 17 jours. La détection ne se faisant a priori que lorsque toutes les plaquettes sont saturées, la production de ces auto-anticorps serait encore plus précoce.

En effet, plus récemment, des anticorps fixés aux plaquettes de chiens infectés expérimentalement ont été détectés en cytométrie de flux dès le 3^{ème} jour après l'infection [116].

Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'*E. canis* serait responsable d'une surproduction d'AAP naturels, avec une affinité supérieure. Les lymphocytes B porteurs de récepteurs à auto-anticorps naturels seraient amenés à se multiplier sous l'effet de la bactérie, qui aurait des antigènes proches des antigènes plaquettaires du chien [106].

On peut également penser que cette augmentation est due à la destruction massive de plaquettes dans les premiers temps de l'infection, par divers mécanismes non immunologiques (par des lymphocytes ; [112]), et à une production accrue d'AcAP face à la libération massive de constituants plaquettaires dans le torrent circulatoire. Cela perturberait l'équilibre pré-établi entre auto-anticorps naturels et plaquettes, et favoriserait l'entretien de la thrombopénie [114].

On observe également une **consommation de fractions du complément** concomitante de la thrombopénie. Une injection de CVF (Cobra Venom Factor), une substance permettant une consommation du complément, avant l'infection par *E. canis*, permet

d'obtenir une thrombopénie moins marquée [117]. Cela conforte encore l'hypothèse de la destruction à médiation immune.

On note, en plus de la thrombopénie progressive, une augmentation du VPM (Volume Plaquettaire Moyen) de 9,5 fL à 13 fL environ. Cette présence de **mégathrombocytes** en quantité croissante s'explique par une thrombocytopoïèse augmentée en début d'infection, compatible avec une **destruction périphérique** [118], et également avec la **mégacaryocytopoïèse** déjà constatée au cours de l'infection [113].

Lors de la phase chronique, c'est une hypoplasie médullaire qui est responsable de la thrombopénie. Compte tenu du renouvellement quotidien important du pool plaquettaire (15 %) et la faible durée de vie des plaquettes, la thrombopénie survient rapidement et elle est durable [95]. On ne connaît pas encore le mécanisme de cette hypoplasie, mais des mécanismes à médiation immune sont encore une fois évoqués.

II.3.1.1.2. Thrombopathie

Une thrombopathie est également constatée et expliquerait, conjointement avec la thrombopénie, la tendance aux saignements observée. Lovering et coll. ont montré, dès 1980, qu'il existait une diminution de l'adhésion plaquettaire lors d'ehrlichiose aiguë [117].

Des observations en microscopie électronique ont révélé que le PMIF empêchait la formation de pseudopodes. Les plaquettes ainsi affectées s'arrondissent et ne peuvent alors s'agglutiner [98, 112].

Il a également été montré que la libération de PF-3 par les plaquettes de chiens sains, après incubation avec la fraction des globulines du plasma d'un chien infecté, est plus lente. Un **facteur soluble**, contenu dans la fraction des globulines a donc longtemps été suspecté. Il serait produit dès la première semaine et a son maximum après 3 à 4 semaines [113].

Des études plus récentes en agrégométrie ont mis en évidence une thrombopathie chez les chiens atteints d'ehrlichiose expérimentale [119]. Dans cette étude, l'agrégation la plus lente est observée 20 jours après l'infection, date à laquelle ces mêmes chiens présentaient le plus fort taux d'**AcAP**. Ces derniers seraient donc en partie responsables

de cette thrombopathie. Une interaction avec les glycoprotéines membranaires est une explication retenue. L'utilisation de divers agonistes de l'agrégation plaquettaire dans cette étude a par ailleurs permis de suspecter que ces auto-anticorps (ou d'autres facteurs solubles) auraient une plus grande affinité pour les récepteurs de type Ia/IIa ou l'adrénorécepteur alpha 2, bien que l'adrénaline ne semble pas avoir d'effet agrégant à elle seule chez le chien.

II.3.1.1.3. Vascularite

Cette vascularite, liée à l'interaction des cellules infectées avec les cellules endothéliales, pourrait également expliquer les signes cliniques comme l'épistaxis en particulier [11].

II.3.1.2. Variations de la formule blanche

On observe dans la phase aiguë une leucopénie suivie d'une leucocytose [95, 120]. L'origine supposée de cette leucopénie est une réaction à médiation immune puisqu'elle est concomitante de la thrombopénie. Une autre origine serait une redistribution des leucocytes dans le système vasculaire (margination). On a pu mettre en évidence un **facteur d'inhibition de la migration lymphocytaire** (LMIF) [112].

La leucocytose lui succédant est un signe de l'inflammation, mise en évidence également par une plasmocytose périvasculaire qui se développe dans différents organes, comme le foie, la rate, les reins et les poumons. On peut noter la présence de grands lymphocytes granuleux sur les frottis sanguins [11].

Lors de la phase chronique, une atteinte médullaire de toutes les lignées entraîne une leucopénie modérée à sévère [11].

II.3.1.3. Anémie

L'anémie, lors de la phase aiguë de l'ehrlichiose, est inconstante. Elle est due à une **hémolyse intravasculaire**, qui se manifeste cliniquement par une hémoglobinurie.

On suppose que le mécanisme responsable de cette destruction est encore une fois à médiation immune ; les anticorps dirigés contre *E. canis* se fixeraient à la membrane des globules rouges, entraînant leur lyse par les cellules effectrices du système immunitaire.

Le test de Coombs direct est en effet positif dans 31 % des cas dans une étude sur les signes hématologiques de l'EMC, ce qui correspond au pourcentage d'animaux anémiés [95].

Lors de la phase chronique, l'anémie rencontrée est centrale, liée à l'hypoplasie médullaire. On a également très tôt évoqué la possibilité de mécanismes à médiation immune comme cause de cette anémie [121, 122].

II.3.2. Modifications biochimiques

II.3.2.1. Protéines sériques

L'**hypoalbuminémie** constatée peut être due à une fuite rénale d'albumine (albuminurie sans lésions rénales notables associées) observée au début de cette phase aiguë. Mais l'atteinte hépatique (infiltration plasmocytaire péri-vasculaire) ainsi que les saignements, l'exsudation et l'anorexie transitoire constituent également des causes possibles [106, 123].

Certains auteurs pensent également qu'elle est purement physiologique : Le taux d'albumine est en partie régulé par la pression oncotique. Une augmentation de cette dernière, suite à la **synthèse massive de globulines** (alpha-2, bêta et gammaglobulines) observée durant le début de la maladie entraînerait, par compensation, une diminution de la synthèse hépatique d'albumine. Cela permettrait d'éviter l'apparition d'une hyperviscosité sanguine [69, 106, 123].

L'augmentation des alpha2-globulines est la conséquence de la synthèse hépatique de protéines de l'inflammation. Rikihisa a pu noter une augmentation de la CRP (protéine C réactive) 4 à 6 jours après l'inoculation d'*E. canis* [124]. Et plus récemment, la cinétique de cette augmentation a été étudiée : Shimada et coll. ont mis en évidence un pic très important (> 200 µg/mL) entre 15 et 42 jours, suivi d'une baisse rapide des concentrations sériques. Ce pic correspond à la période à partir de laquelle *E. canis* a pu être mise en évidence par PCR et l'auteur suppose que la multiplication intense du parasite dans le sang serait la cause de cette **réponse inflammatoire** [125].

La **production précoce d'IgM et d'IgA** explique la montée rapide du bloc des bêta-2-globulines [123]. Cette importance du bloc bêta-2 s'atténue lors de la phase chronique, et en particulier chez les animaux pancytopéniques.

L'augmentation des gammaglobulines correspond notamment à la production d'immunoglobulines G. Ces dernières ne présentent toutefois aucun pouvoir protecteur. On peut penser que la plasmocytose importante est responsable d'une production exagérée et inappropriée d'IgG, comme cela est observé dans d'autres maladies chroniques avec une stimulation antigénique importante et prolongée [106 , 120, 123]. On ne note d'ailleurs aucune corrélation entre le titre en anticorps anti-*E. canis* et l'**hypergammaglobulinémie** [123 , 126 , 127].

Durant la phase aiguë, l'hypergammaglobulinémie est également liée à la production de facteurs humoraux comme le PMIF [128].

Les anticorps anti-nucléaires (AcAN) ne sont généralement pas détectés, mais on a pu mettre en évidence, sur des chiens infectés naturellement et expérimentalement, des **complexes immuns circulants**, aussi bien durant la phase aiguë que lors de la phase subclinique [107], et qui pourraient jouer un certain rôle dans la pathogénie de la maladie (glomérulonéphrite) [3].

Une baisse des protéines totales, des globulines, et notamment des gammaglobulines, est observée en phase finale de la phase chronique grave, suggérant une baisse de l'état d'immunité de l'animal [69]. La leucopénie observée chez les animaux pancytopéniques serait responsable d'une mauvaise communication entre lymphocytes B et T-helper et d'une baisse de la synthèse des cytokines intervenant dans la différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgG [123].

II.3.2.2. Atteinte hépato-rénale

L'atteinte hépatique comme l'atteinte rénale sont liées à une **infiltration lymphoplasmocytaire interstitielle** que l'on retrouve dans le tableau lésionnel [93, 120 , 129].

Lors de phases chroniques compliquées, il est possible également d'observer une glomérulonéphrite, vraisemblablement liée au dépôt de complexes immuns circulant [3].

Même si elle laisse beaucoup de questions en suspend, la pathogénie de l'ehrlichiose monocyttaire canine reste aujourd'hui encore la mieux connue et la plus étudiée chez le chien ; elle sert de référence à la compréhension de la maladie humaine causée par E. chaffeensis. La découverte au Japon, sur Ixodes ovatus, d'un isolat d'Ehrlichia sp. très pathogène pour la souris, et génétiquement très proche d'E. canis, d'E. muris et d'E. chaffeensis, permettra sans doute de faciliter les recherches sur des modèles murins jusqu'alors insensibles à ce groupe d'agents pathogènes [2].

II.4. Pouvoir immunogène

L'infection naturelle ou expérimentale du chien par *E. canis* entraîne la production d'**anticorps spécifiques**. Weisiger et coll. ont étudié la cinétique des anticorps suite à une infection expérimentale [127] : 4 à 7 jours après l'infection par transfusion de sang à partir de chiens infectés en phase aiguë, on peut noter l'apparition d'IgM et d'IgA, alors que les IgG n'apparaissent qu'à partir du 15^{ème} jour.

Toutefois, l'apparition des IgG semble pouvoir être plus précoce, et notamment dépendante de la « dose infectante » [130]. Ainsi, à partir d'isolats de culture cellulaire, on a pu déclencher des infections expérimentales avec apparition d'IgG à partir de cinq jours [125], voire même du troisième jour [131].

La séroconversion peut aussi être beaucoup plus lente, notamment lors d'infections naturelles ; il est admis que les chiens peuvent présenter des **délais de séroconversion allant jusqu'à 4 semaines** [83].

Une équipe israélienne a montré l'existence d'une réponse immunitaire de type Th1 prédominante, par la mise en évidence d'une présence majoritaire d'immunoglobulines de type IgG2, induites par l'IFN γ , chez des chiens atteints d'ehrlichiose naturelle comme expérimentale [132 , 133]. La « dose infectante », la réponse immunitaire de l'hôte ou encore la pathogénicité de la souche sont autant de facteurs pouvant influencer la mise en place de cette réponse immunitaire humorale.

Expérimentalement, le titre initial en IFI après les 15 premiers jours est de 160 à 640, mais il augmente très vite de 320 à 1280 à J17 et de 1280 à 2560 à J20 [96 , 134].

Durant les premières jours de l'infection, les anticorps produits sont dirigés contre des protéines de faibles poids moléculaires, notamment des antigènes majeurs de 28 et 36 kDa. Par la suite, la **protéine de 28 kDa** est toujours reconnue par un sérum de chien en phase subclinique et chronique, ainsi que de nombreux autres antigènes de plus haut poids moléculaire (44, 53, 60, 65 kDa...) [135].

On a néanmoins pu noter une certaine **diversité antigénique** à travers le monde : une étude menée sur des sérums de chiens infectés par *E. canis* provenant de différentes régions du globe a montré que, malgré un caractère relativement homogène des profils antigéniques en Western Blot (WB) des chiens provenant des Etats-Unis, de France, d'Israël et des Iles Vierges, les sérums des chiens provenant d'Italie et du Zimbabwe ont des profils légèrement différents [34]. Même si dans cette étude, une infection concomitante avec *E. (Cowdria) ruminantium* n'a pas été exclue pour les sérums provenant du Zimbabwe, aucun des sérums provenant d'Italie n'a reconnu la protéine immunodominante de 28 kDa, mais une autre protéine de 27 kDa et d'autres protéines de 24 à 34 kDa notamment. La souche *Florida d'E. canis* utilisée présenterait donc des différences antigéniques avec les souches rencontrées dans ces deux pays. Cette diversité antigénique internationale est aujourd'hui admise pour *E. canis* et existe probablement pour les autres *Ehrlichieae* [1].

Les protéines de 28 à 32 kDa, qui sont des **protéines membranaires majeures** et constituent l'**antigène dominant** [2] ; ces protéines sont codées par les gènes *p30s*, une famille de multigènes très polymorphique, comme nous l'avons vu dans la première partie [7]. On connaît plus de 20 copies de ce gène, qui sont homologues mais légèrement différentes, et codent donc pour des protéines différentes [136].

Malgré ce que nous venons de voir, la structure de ces gènes semblent assez conservée pour différentes souches *d'E. canis*, et ils sont transcrits en ARNm monocistroniques, au moins en culture cellulaire. L'homologie des séquences d'acides aminés entre ces diverses protéines varie de 24,7 à 71,8 % [33].

Cette diversité et le nombre important de copies du gène *p30s* expliquerait la survie et la possibilité d'**échappement** d'*E. canis* au système immunitaire malgré la faible taille de son génome [2 , 137].

L'isolement et l'amplification de 14 de ces protéines par RT-PCR a été réalisée sur des prélèvements sanguins de chiens infectés expérimentalement et sur des tiques infectées artificiellement également [138]. On a retrouvé 11 ARNm différents dans les monocytes de chiens infectés, alors qu'un seul gène a été détecté chez les tiques, adultes ou nymphes. L'expression de ces différents paralogues semble par ailleurs liée à la température, comme le prouve l'expérimentation sur des cultures cellulaires. Une étude plus poussée de ces gènes devraient permettre de comprendre leur rôle dans la pathogénie et la transmission d'*E. canis*, et de cibler, pourquoi pas, ces protéines à des fins vaccinales.

Un certain degré d'**immunosuppression** a pu être noté chez les chiens de race Berger allemand, mis en évidence par des tests de migration leucocytaire et par des modifications de la réponse au test d'hypersensibilité de type IV, expliquant certainement leur plus grande sensibilité à la maladie, et notamment le développement de formes chroniques sévères [94].

II.5. Étude clinique

L'**infection expérimentale** a permis de mettre en évidence trois phases bien distinctes de la maladie : une **phase aiguë**, une **phase subclinique** et une **phase chronique**. De nombreuses études expérimentales ont largement documenté ces différentes observations cliniques [95 , 120 , 126, 139 , 140].

Dans les conditions naturelles, la distinction entre ces trois phases peut être délicate, voire impossible. Il convient généralement de distinguer une **phase chronique modérée** et une **phase chronique sévère** [53].

II.5.1. Phase aiguë

II.5.1.1. Symptômes

Après une période d'incubation de 8 à 20 jours, l'infection par *E. canis* se manifeste par un **syndrome fébrile** durant 1 à 4 semaines.

Les principaux symptômes rencontrés sont : **hyperthermie** (40,5°C en moyenne [95]), **abattement, perte de poids, anorexie, splénomégalie, lymphadénomégalie, toux et jetage oculo-nasal.**

D'autres symptômes ont été décrits, comme une dyspnée, des vomissements, des signes nerveux (ataxie, paraparésie, convulsions, déficits des nerfs crâniens...) ou encore des tendances aux saignements. La **présence de tique** est possible durant cette phase [69].

L'hyperthermie est rencontrée dans 95 % des cas [95] et c'est le signe clinique le plus constant de la phase aiguë.

La symptomatologie durant cette phase peut être frustrante et passer inaperçue, se manifestant par de la fièvre, une légère hypertrophie ganglionnaire, une perte de poids modérée et un jetage oculo-nasal passager [120].

La phase aiguë peut être sévère chez certains chiens, notamment les animaux âgés, comme le montre l'étude de Davoust et coll. [120]. Cette forme aiguë sévère se manifeste par une atteinte hépato-splénique grave (hémosidérose hépato-splénique, nécrose splénique, infiltrats inflammatoires hépatiques diffus).

II.5.1.2. Signes biologiques

II.5.1.2.1. Signes hématologiques

Une étude de Davoust et coll. [95] portant sur des chiens atteints expérimentalement et sur des chiens contaminés naturellement par *E. canis* fait le point sur les signes hématologiques de la phase aiguë de la maladie.

D'après cette étude, on rencontre une **thrombopénie** (numération plaquettaire inférieure à 200000/mm³) dans 100 % des cas, avec 31000 plaquettes/mm³ en moyenne. Ceci est également rapporté par d'autres auteurs [69].

On rencontre également une **anémie périphérique modérée** (29,4 %), une numération érythrocytaire basse (52,6 %) et un taux d'hématocrite bas (11,7 %). Les indices érythrocytaires sont légèrement modifiés, avec une tendance à l'hypochromie. Certains

évoquent au contraire une anémie centrale modérée, comparables aux **anémies d'inflammations chroniques** ou aux anémies centrales (hypoplasie érythroïde) observées lors d'infections virales [69, 121].

Quant à la numération blanche, on observe soit une leucocytose (10,5 %), soit une leucopénie (42,1 %). On note la présence de nombreux granulocytes neutrophiles (PNN) peu segmentés, ce qui est en corrélation avec l'augmentation du rapport G/E sur le myélogramme [121]. On remarque également dans cette étude que seuls les chiens atteints expérimentalement ont tendance à la monocytose [95].

La moelle osseuse est normocellulaire ou hypercellulaire. Le myélogramme présente généralement une **mégacaryocytose** durant la phase aiguë, ainsi qu'une **plasmocytose** en îlots et quelques fois une légère augmentation du nombre de mastocytes [141]. Le rapport G/E est augmenté et l'on observe une diminution de la lignée érythroïde [121].

Le temps de saignement est augmenté suite à la thrombopénie, mais parfois même chez des chiens ayant une numération plaquettaire supérieure à 100 000/mm³, ce qui révèle la présence d'une thrombopathie.

Par contre, les temps de coagulation (temps de prothrombine, taux de thrombine, temps de céphaline activée) et les produits de dégradation de la fibrine et du fibrinogène (PDF) sont habituellement normaux [95].

On note également, lors de cette phase aiguë, une augmentation des protéines de l'inflammation comme la **CRP** [124] et une augmentation de la vitesse de sédimentation [98].

II.5.1.2.2. Signes biochimiques

On note des modifications des protéines sériques et du profil électrophorétique. Dans les premiers temps de l'infection, on peut voir une diminution des protéines totales, due à une **hypoalbuminémie** et une hyperglobulinémie relative, suite à une augmentation des IgA et des IgM [128] et à la production de facteurs humoraux [112].

Un **pic en bêta-gamma** est visible dès 19 jours après inoculation et la **gamma-globulinémie** augmente très rapidement [120].

Les phosphatases alcalines (PAI) et les transaminases (AIAT) plasmatiques augmentent, ce qui est la conséquence de lésions infiltratives du foie.

II.5.1.3. Évolution de la phase aiguë

Cette phase aiguë se résout habituellement spontanément, même sans traitement, et commence alors une phase subclinique.

Le traitement à base de doxycycline à 10 mg/kg pendant 21 jours durant cette phase semble stériliser les chiens. Les chiens traités ne transmettent alors plus la maladie, mais les anticorps présents ne les protègent pas d'une nouvelle infection [120]. Toutefois, un traitement de 28 jours est plus largement recommandé [83].

II.5.2. Phase subclinique

Durant cette phase, le chien reste porteur de la bactérie, mais ne présente que des **anomalies hématologiques et biochimiques**, sans aucune conséquence clinique [97].

On note généralement une thrombopénie et une hyperprotéïnémie chez le chien séropositif. Cette dernière est la conséquence d'une hyperglobulinémie, notamment en bêta et en gamma, et l'albuminémie est généralement élevée également. Les alpha2-globulines restent stables ou diminuent légèrement durant cette phase de silence clinique. L'augmentation des gammaglobulines suit de façon linéaire celle du titre en anticorps, ce qui correspond à la production d'IgA, d'IgM et surtout d'IgG [128].

Le titre ne cesse généralement d'augmenter à partir du septième jour de l'infection, ce qui suggère une **stimulation antigénique permanente** [97]. Il diminue lentement après traitement pour s'annuler après 6 à 16 mois.

Le myélogramme se révèle généralement normal durant cette phase [121]. Une neutropénie peut aussi être observée [69], mais la plus souvent, il s'agit d'une simple baisse des neutrophiles par rapport aux valeurs avant l'infection [106].

Les chiens peuvent rester en phase subclinique durant plusieurs mois à plusieurs années [128 , 142]. Expérimentalement, cette phase dure 40 à 120 jours. Les chiens immunocompétents seraient à même d'éliminer le parasite, alors que certains animaux développeront une phase chronique plus ou moins grave [69 , 96].

On ne connaît toujours pas les conditions nécessaires au développement de la phase chronique. La race, le statut immunitaire de l'hôte, le stress, des infections par d'autres parasites, la souche en cause ou encore la localisation géographique sont autant d'hypothèses avancées [97].

Woody décrit le cas d'une chienne présentée à la consultation pour une compression médullaire, et qui a déclenché une ehrlichiose sévère une semaine après son opération [53]. Il décrit également le cas d'un jeune Berger allemand de un an qui a succombé à une forme chronique sévère en 3 jours ; chez ce chien, un court passage fébrile avec anorexie de 3 jours, qui a disparu spontanément, avait été décrit 2 mois plus tôt et pouvait correspondre à la phase d'infection primaire.

Breistchwerdt a également émis l'hypothèse que des **infections répétées** puissent être à l'origine de la phase chronique sévère [91].

II.5.3. Phase chronique

On distingue une phase chronique modérée, avec des symptômes non spécifiques tels que perte d'appétit, périodes d'abattement... La forme chronique sévère peut faire suite à une phase chronique modérée plus ou moins longue ou apparaître d'emblée.

De nombreuses études rétrospectives permettent de faire le point sur les observations cliniques faites lors de cas d'infections expérimentales et naturelles [53 , 69 , 77 , 87, 90 , 141 , 143].

II.5.3.1. Symptômes

Les symptômes de la phase chronique sévère sont peu spécifiques et extrêmement **variés** : perte de poids, cachexie, anorexie, apathie, hyperthermie, déshydratation, pâleur des muqueuses... L'adénomégalie semble quant à elle rare durant cette phase [77].

La tendance aux saignements est un signe clinique fréquemment retrouvé sous différentes formes : épistaxis dans de nombreux cas, méléna, hématurie, hémoptysie, hématurie, hyphéma, hémorragies rétiniennes, hémarthrose, hémorragies cérébrales, ecchymoses, pétéchies... De ces saignements peuvent découler les présentations cliniques les plus variées.

Une **pâleur des muqueuses** est le signe plus ou moins marqué d'une anémie très souvent présente ; des **pétéchies** sont également parfois observées, ou encore un ictère révélateur la plupart du temps d'une atteinte hépatique, avec hépatomégalie. Une splénomégalie et une polyadénomégalie périphérique sont parfois constatées.

Les signes digestifs observés sont variés mais inconstants : vomissements, méléna, anorexie, hématurie...

Sur le plan locomoteur, des boiteries dues à des hémarthroses sont un signe possible et des œdèmes des membres sont souvent observés dans les formes chroniques aux stades terminaux.

Les signes neurologiques rencontrés peuvent être attribués à une infiltration plasmocytaire, ou à des saignements au niveau des méninges, de la moelle épinière ou encore du cerveau. Ils sont donc également très variés : ataxie, convulsions, stupeur, motoneurone central ou périphérique, déficits des nerfs crâniens, douleur cervicale... [53]

Des signes dermatologiques ont également été suspectés, avec une vascularite, des macules érythémateuses, un purpura et des lésions en cibles de type impétigo avec halo hémorragique [144].

Des signes de chorioretinite sont fréquemment observés dans le fond d'œil. D'autres signes comme un hyphéma, une **uvéite antérieure** ou une opacité cornéenne sont également fréquents. Les signes oculaires ne peuvent se manifester parfois que par un simple écoulement purulent ou par des suffusions conjonctivales.

Au niveau cardio-vasculaire et respiratoire, on peut observer une tachycardie et une tachypnée directement liées à l'intensité de l'anémie. L'auscultation d'un souffle cardiaque

est par là même une observation inconstante. L'apparition de troubles du rythme et de déficit pulsatile peut être liée à des hémorragies myocardiques ou péricardiques.

Des signes tels qu'une modification de la courbe respiratoire ou des bruits pulmonaires augmentés sont parfois observés, avec des opacités de type interstitielle et péri-bronchique sur les radiographies.

L'appareil uro-génital peut être le siège de différentes anomalies : hématurie, protéinurie, signes d'insuffisance rénale chronique (polyuro-polydipsie, anorexie, vomissements, ulcérations buccales...), œdème scrotal, saignements importants et prolongés durant le pro-oestrus, infertilité, avortements, saignements vaginaux après la mise-bas ou encore mortinatalité.

Enfin, le tableau clinique est très souvent enrichi et aggravé par des **infections opportunistes**, particulièrement chez les individus pancytopéniques [123].

II.5.3.2. Signes biologiques

II.5.3.2.1. Signes hématologiques

Ils sont principalement dus à une **hypoplasie voire une aplasie médullaire**. On observe donc une **pancytopénie**, à savoir :

- Une thrombopénie d'origine centrale, due à une atteinte des mégacaryocytes [121].
- Une anémie arégénérative [121, 145].
- Une leucopénie.

La baisse des mégacaryocytes et des précurseurs granulocytaires est visible sur le myélogramme dès 6 à 8 semaines après une infection expérimentale chez des Bergers allemands développant la forme chronique sévère [121].

Une hyperfibrinogénémié (900 mg/dL) a été décrite sur un chien berger allemand en phase chronique sévère [53].

Le test de Coombs est positif dans un certain nombre de cas d'ehrlichioses chroniques. La destruction à médiation immune et les saignements chroniques participent donc également à la pathogénie de l'anémie [141].

II.5.3.2.2. Signes biochimiques

On constate fréquemment une augmentation des enzymes hépatiques PAI, LDH et AIAT, parfois accompagnée d'une hyperbilirubinémie modérée.

Une protéinurie et une hématurie sont parfois constatées, avec ou sans élévation de l'urémie et de la créatininémie.

L'électrophorèse des protéines sériques permet de mettre en évidence une **hyperprotéinémie** (> 80 g/L), marquée par une augmentation des fractions alpha-2, bêta et gamma [128, 146]. L'albumine est généralement basse durant cette phase chronique [128], et l'**hypergammaglobulinémie** s'accroît, avec dans de rares cas une gammopathie monoclonale et une hyperviscosité sanguine [147].

Enfin, une baisse de la protéinémie, de la gammaglobulinémie et de la globulinémie globale sont souvent présentes en phase terminale [69].

II.6. Tableau lésionnel

Il varie selon la phase de la maladie et selon sa gravité. On observe globalement des lésions de type pétéchies et ecchymoses, une hyperplasie réticulo-endothéliale généralisée accompagnée d'un œdème des organes concernés.

Du point de vue histologique, on observe le plus souvent une **infiltration plasmocytaire périvasculaire** concernant divers organes dont les méninges, les reins, les poumons, le foie, la rate, la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques [93].

Des lésions précoces de **phlébite** et de **vasculite** sont souvent observées dans les reins, suivies d'une infiltration lympho-plasmocytaire. Les poumons sont d'abord le siège de lésions de pneumonie interstitielle, puis de lésions hémorragiques et infiltratives interstitielles et péri-bronchiques. La rate présente généralement une hyperplasie réticulo-endothéliale, une infiltration lympho-plasmocytaire, une hématopoïèse extra-médullaires et

de nombreuses images d'érythrophagocytose. Enfin, dans le foie, une infiltration d'intensité variable par des macrophages, des lymphocytes ou encore des plasmocytes peut être observée au niveau de la triade porte. On note également parfois des dépôts d'hémosidérine dans le foie et la rate [120].

C'est dans les **poumons**, la **rate** et les **nœuds (ganglions) lymphatiques** de chiens atteints expérimentalement que l'on retrouve le plus grand nombre de morulae. Au niveau des poumons, les germes peuvent être mis en évidence dans les macrophages alvéolaires [5].

II.7. Pronostic, traitement et prophylaxie

II.7.1. Pronostic

Il est variable selon le stade de la maladie. La forme aiguë est généralement bénigne et de bon pronostic si elle est correctement traitée et à temps. La mortalité est essentiellement rencontrée lors de la phase chronique grave, pour laquelle le pronostic devra toujours être très réservé. Les chiens en phase subclinique devraient impérativement recevoir un traitement, car ils risquent de déclarer une forme chronique [69 , 97].

Une étude rétrospective de la maladie en Israël sur 100 cas d'infection naturelle a permis d'établir les **facteurs de risque** en terme de mortalité ; cette dernière est plus élevée lors d'anémie sévère, de leucopénie sévère, de pancytopénie, de tendances aux saignements et chez les chiens de race Berger allemand [77].

II.7.2. Traitement

II.7.2.1. Antibiothérapie

Le traitement de l'EMC repose sur l'administration de **tétracyclines**, qui exercent une activité bactériostatique en inhibant la synthèse protéique au niveau ribosomal. Ceci permettrait de favoriser la fusion lysosomiale avec la vacuole parasitophore, en supprimant l'activité métabolique de ces bactéries [5].

L'administration d'oxytétracycline à raison de 66 mg/kg/j en deux prises pendant 14 jours a d'abord été utilisée [148]. D'autres tétracyclines ont ensuite été utilisées, ainsi que le chloramphénicol [69]. La doxycycline semble être la molécule la plus efficace pour inhiber *E. canis* en culture [149].

La **doxycycline** et la minocycline sont aujourd'hui les anti-infectieux de choix [83], administrés à la posologie de **10 mg/kg/j** en une seule prise **pendant au moins 3 semaines** [20, 69] voire un mois [83, 90], et même **jusqu'à deux mois en phase chronique** [53].

En phase aiguë, lors d'infection expérimentale, il semble qu'une dose de 5 mg/kg matin et soir pendant 10 jours soit suffisante [150]. L'ADN d'*E. canis* a toutefois été détecté par PCR après 6 semaines de traitement chez des chiens en phase subclinique, ce qui impose un traitement plus long durant cette phase [109].

Il semble que les chiens traités peuvent guérir du point de vue clinique et hématologique, mais peuvent tout de même rester porteurs de la bactérie, notamment lors d'un traitement de trop courte durée ou trop tardif [20, 109, 131].

Dans une étude de Iqbal et Rikihisa, les chiens infectés expérimentalement ne sont traités qu'après 20 jours d'infections, pendant une semaine, avec une dose de 10 mg/kg/j en une prise quotidienne de doxycycline ; une cinquantaine de jours après le début du traitement, on a pu isoler *E. canis* en culture à partir de différents organes (rate, reins, poumons, foie, nœuds lymphatiques) et du sang de certains de ces chiens [131]. Les animaux n'exprimaient aucun signe clinique, avaient une baisse de la gammaglobulénémie, mais un titre en Ac stable ou peu diminué.

Le traitement en phase aiguë à la doxycycline pendant 21 jours permet à priori de rendre le sang du malade non-infectieux, ce qui a un intérêt notable en terme d'épidémiologie et de prophylaxie [120].

L'utilisation de **dipropionate d'imidocarb** (CARBESIA®) est recommandée en plus par certains auteurs, si son utilisation ne présente pas de contre-indication [69]. On l'utilise à la posologie de **5 mg/kg**, à raison de **deux injections à 2 semaines d'intervalle**. Ce traitement semble aussi efficace même si la numération plaquettaire semble s'améliorer moins rapidement [83].

L'utilisation d'autres antibiotiques comme l'enrofloxacin e s'est révélée inefficace dans le traitement d'ehrlichioses aiguës expérimentales [150].

II.7.2.2. Traitements complémentaires

Des traitements symptomatiques des différentes complications sont proposés. Une **transfusion sanguine** peut être indiquée dans les cas graves, à l'aide de sang total frais ou de plasma riche en plaquettes.

La mise en place d'un **second traitement antibiotique** pourra être proposé afin de lutter contre les surinfections, dans la mesure des indications et interactions médicamenteuses possibles [53].

La présence de mécanismes immunologiques intervenant dans la pathogénie de la maladie suggère la possibilité de l'utilisation d'un **traitement immunosuppresseur**, à base de prednisolone notamment, lors d'ehrlichiose aiguë [69]. Toutefois, en l'absence de mécanisme auto-immun avéré, Woody et coll. déconseillent l'utilisation de glucocorticoïdes à dose immunosuppressive ou d'agent immunosuppresseurs sur des longues périodes, compte-tenu du ralentissement probable de l'élimination de la bactérie [53].

Des **anabolisants** sont parfois utilisés pour la stimulation des cellules souches de la moelle osseuse, comme la **nandrolone** (1 à 1,5 mg/kg IM, une fois par semaine) [53].

II.7.2.3. Evolution

L'amélioration clinique et biologique est rapide, dès 24 à 48 heures après la mise en place du traitement en phase aiguë [83]. La température rectale redevient normale et la thrombopénie disparaît progressivement en quelques jours [120] ; toutefois, la numération plaquettaire revient à son niveau de base en 14 jours en moyenne seulement [83].

La **disparition de la thrombopénie** semble être un marqueur intéressant de l'efficacité du traitement [109]. Une absence d'amélioration de la numération plaquettaire après 7 jours

de traitement peut évoquer un mécanisme de destruction à médiation immune ou une infection concomitante avec *Babesia sp.* ou *Bartonella sp.* Cela a également été rapporté avec des traitements inefficaces à l'enrofloxacin. Neer et coll. proposent de ré-évaluer également la thrombopénie après la fin du traitement pour juger de l'efficacité. La **baisse progressive de la gammaglobulinémie** sur 6 à 9 mois est également un marqueur d'amélioration [83].

On note également une baisse progressive sur plusieurs mois des taux d'anticorps dès la fin du traitement. Face à une absence de diminution, on doit évoquer la possibilité d'une réponse immunitaire aberrante ou d'un échec du traitement [69]. De plus la cinétique de diminution dépend du titre initial : sur un titre très élevé en IFI, la baisse peut prendre plusieurs mois compte-tenu de l'imprécision liée aux fortes dilutions, et il est difficile de savoir si cela est lié à une maladie en cours d'évolution, une persistance de l'agent infectieux ou de la pression d'infection [83]. **La sérologie n'est donc pas un moyen de contrôle efficace du traitement** quelle que soit la méthode.

II.7.3. Prophylaxie

Aucun vaccin n'est disponible à ce jour, mais c'est une voie d'avenir et de nombreux laboratoires pharmaceutiques s'y intéressent déjà [83].

En élevage ou dans les communautés canines, la prophylaxie repose donc essentiellement sur le **contrôle des infestations par les tiques**, mais aussi par la **quarantaine** et le **dépistage sérologique** des nouveaux arrivants, avec traitement des chiens testés positifs [83].

L'utilisation d'une **chimiothérapie préventive** à base de tétracyclines a également été proposée pour les déplacements en zone d'endémie pour les animaux sains (doxycycline à 3 mg/kg/j PO en une prise) ; elle est utilisée également avec succès dans les camps militaires situés en zones d'endémie [53 , 83 , 90]. Bien que non démontrée encore, cette pratique abusive pourrait toutefois conduire à des résistances au sein des *Ehrlichieae* [83].

Les donneurs de sang devraient également être systématiquement testés pour l'ehrlichiose monocyttaire canine [53, 69].

L'ehrlichiose monocyttaire à *Ehrlichia canis* est une maladie mondialement répandue dont les mécanismes physio-pathologiques complexes commencent à être élucidés.

Comme pour l'ehrlichiose à *A. phagocytophilum*, des mécanismes immunologiques semblent jouer un rôle essentiel dans les manifestations cliniques, et sans doute plus important que le pouvoir pathogène direct de la bactérie.

Les différentes phases cliniques décrites lors d'études expérimentales reflètent une réalité toute relative, et les présentations cliniques variées auxquelles le clinicien pourra être confronté seront revues dans la quatrième partie de ce travail dédiée au diagnostic.

Mais avant, il nous faut présenter brièvement les autres ehrlichioses rencontrées chez le chien.

III. TROISIEME PARTIE : LES AUTRES EHRlichIOSES DU CHIEN

En 1950, *N. helminthoeca* est identifiée chez le chien et ce n'est que 20 ans plus tard que sera faite la première description d'une *Ehrlichia* granulocytaire dans cette espèce. Dès lors, de nombreuses autres formes cliniques d'ehrlichioses canines ont été identifiées, et les outils récents de biologie moléculaire permettent encore aujourd'hui de reconnaître des infections jusqu'alors méconnues.

Nous tenterons donc de faire un point sur ces principales entités décrites chez le chien, en abordant tout d'abord la thrombopénie cyclique infectieuse et les ehrlichioses granulocytaires. Ensuite nous parlerons de quelques entités plus anecdotiques ou en tous cas moins bien caractérisées à ce jour, avant de nous intéresser enfin plus particulièrement aux infections multiples dues à plusieurs *Ehrlichieae* et arbo-bactérioses.

III.1. Ehrlichiose à *Anaplasma platys* ou thrombopénie cyclique infectieuse

III.1.1. Etiologie et épidémiologie

L'infection du chien par *Ehrlichia platys*, récemment renommée *Anaplasma platys* [8], a été décrite pour la première fois aux **Etats-Unis** en 1978 [151]. French et Harvey semblaient déjà penser à l'époque que sa répartition était probablement plus étendue et comparable à celle d'*E. canis* [152].

A. platys a en effet été décrite ultérieurement dans de nombreux autres pays d'**Europe** et d'**Asie** : en Allemagne [104], en Italie [20], en Grèce [20, 87], en France [20, 153], en Israël [154], en Thaïlande [15], en Chine [38, 101], en Corée [155], à Taïwan [156] ou encore au Japon [157, 158, 159]. Elle est également régulièrement observée en Espagne sous forme d'inclusion plaquettaires, sans toutefois de corrélation claire avec l'apparition de signes cliniques, ni de diagnostic étiologique précis [160].

Plus récemment, *A. platys* ou un agent très proche (99,7 à 100 % d'homologie sur 345 pb de l'ARNr 16S) a été décrit chez des chiens errants du centre de l'**Australie**. Il ne s'agit pour l'instant que d'une observation moléculaire, par PCR et séquençage, chez 10 chiens et 2 tiques du genre *Rhipicephalus sanguineus* [161]. C'est toutefois la première description d'une ehrlichiose dans ce pays, malgré des mesures drastiques aux frontières. Les conditions épidémiologiques favorables - présence de très nombreux Canidés et de la tique *R. sanguineus* dans l'ensemble du pays - font redouter une possible installation endémique en Australie. Il reste toutefois à isoler et caractériser plus précisément cet agent, et à en évaluer la répartition et l'incidence clinique.

Au **Vénézuela**, une jeune fille a été présentée avec un tableau clinique d'ehrlichiose. Testée positive pour *E. chaffeensis*, mais pour aucune autre ehrlichia, elle présentait toutefois des inclusions plaquettaires semblables à celles observées lors d'infections par *A. platys* chez le chien [162]. En microscopie électronique, ces inclusions semblent en effet être des inclusions de type rickettsie, mais de nature encore inconnue [163]. Les circonstances de l'infection ne sont également pas connues, mais laissent redouter un potentiel zoonosique pour cette bactérie, d'autant qu'*A. platys* est connue dans ce pays depuis 1982 [164].

Comme *E. canis*, *A. platys* est principalement transmise, semble-t-il, par la tique brune du chien *Rhipicephalus sanguineus* [165] ; les infections par *A. platys* sont d'ailleurs bien souvent accompagnées d'*E. canis* [5 , 20 , 53 , 101, 140 , 152 , 153 , 160 , 166].

A. platys a également été découverte récemment dans des tiques du genre *Dermacentor auratus* prélevées sur des chiens au Vietnam [167].

Une transmission par transfusion sanguine est également possible en théorie [5].

Les petits rongeurs pourraient servir de **réservoir** pour la maladie, comme cela a été évoqué sur un camp militaire en Corée, alors que l'ADN d'*A. platys* a été isolé dans 62 campagnols du genre *Apodemus agrarius* [155].

Des inclusions plaquettaires ont été observées également en **Afrique du Sud** sur des impalas (*Aepyceros melampus*). L'isolat n'a pas été génétiquement identifié, mais les auteurs supposent qu'il s'agirait d'*A. platys*, qui pourrait avoir un réservoir sauvage dans ce pays [168].

A. platys semble donc avoir une **répartition mondiale** [3], et l'incidence de la maladie semble la plus importante en été et au début de l'automne dans les pays tempérés [87], ce qui correspond au maximum d'activité du principal vecteur potentiel.

III.1.2. Pouvoir antigénique

On connaît relativement peu cette bactérie sur le plan antigénique du fait de l'absence de système de culture [8]. Un antigène majeur d'environ 36 kDa peut être détecté par Western Blot sur la souche Louisiane d'*A. platys* [160], et des réactions croisées ont été décrites avec *A. phagocytophilum* [159].

Par contre, il ne semble pas exister de réaction croisées avec *E. canis* [152].

Comme pour les autres espèces, il semble exister une diversité à travers le monde du point de vue génétique ; toutefois, la diversité antigénique reste à démontrer [38].

III.1.3. Histoire naturelle de la maladie

A. platys infecte uniquement les plaquettes ; la présence d'inclusions n'a jamais été démontrée dans aucun autre tissu même après immunomarquage [169].

Expérimentalement, l'incubation de la maladie est de 8 à 15 jours en moyenne, bien que des inclusions puissent être observées dès 6 à 8 jours après l'inoculation [156]. L'ehrlichiose aiguë ainsi décrite est caractérisée par une **parasitémie cyclique** accompagnée d'une **thrombopénie**, avec une hyperactivation plaquettaire [170], et d'une **polyadénomégalie**.

Les chiens atteints présentent rarement des signes importants, ni même des signes hémorragiques sévères, même lors de thrombopénie importante [70, 156]. Ce phénomène, également observé lors de purpura thrombopénique chez l'homme, peut être expliqué par la courte durée de la thrombopénie et par le renouvellement constant du pool plaquettaire [151].

La thrombopénie survient dès l'apparition de plaquettes infectées dans le sang ; elle peut atteindre des valeurs très basses de l'ordre de 10 000 plaquettes/mm³. Le nombre de plaquettes remonte alors rapidement jusqu'à atteindre des valeurs subnormales en 3 à 4 jours et l'on constate simultanément la disparition des plaquettes infectées dans le sang. La parasitémie, accompagnée de thrombopénies sévères, s'installe alors de façon cyclique, selon le même schéma, avec des intervalles de l'ordre de une à deux semaines.

On note une différence notable entre la première parasitémie (31-63 % de plaquettes infectées) et les suivantes (de 1 à 13 % de plaquettes infectées seulement). Toutefois, les thrombopénies observées sont toujours aussi importantes dans les deux cas ; un mécanisme à médiation immune est évoqué pour expliquer ce phénomène [151].

Lors d'atteintes chroniques, cette tendance à la cyclicité s'atténue, avec des thrombopénies plus persistantes et une parasitémie plus sporadique [70].

Les chiens atteints peuvent donc présenter une thrombopénie plus ou moins sévère ou un hémogramme normal [70]. Dans certains cas, on a pu constater des anomalies modérées de l'hémogramme, avec une anémie modérée, normochrome et normocytaire, ainsi

qu'une légère leucopénie. Il semble qu'il s'agisse d'une **anémie inflammatoire**, comme on peut en rencontrer dans diverses maladies infectieuses. Lors d'une infection expérimentale, on a en effet pu mettre en évidence une diminution de la ferrémie et de la capacité de fixation du fer, avec des réserves médullaires normales à augmentées [171]. D'autres signes biologiques incluent une légère hypoalbuminémie accompagnée d'une hyperglobulinémie, alpha-1 et gamma essentiellement, ainsi qu'une hypocalcémie [87, 171].

Il existe très peu de données récentes sur l'incidence et la répartition de cette maladie en France. Un syndrome s'accompagnant d'inclusions plaquettaires chez le chien avait été décrit en 1985 par Beauvils [153]. La morphologie des inclusions ainsi que les données épidémiologiques ont permis de penser qu'il pouvait s'agir d'*A. platys* ou d'un agent très proche. Toutefois, les signes cliniques étaient bien plus importants que ceux décrits dans la littérature, avec un syndrome fébrile et des signes hématologiques importants. Tout ceci permettait de penser que la souche française était plus virulente ou que les animaux étaient plus sensibles à une maladie peut-être nouvelle. Cette dernière hypothèse peut être corroborée par le fait que, durant les quatre années de l'étude, les cas cliniques se sont faits de plus en plus rares.

Une étude prospective menée en Grèce semble montrer également une **plus grande virulence de la souche autochtone** [87]. Des signes tels qu'une **fièvre élevée**, une **anorexie**, une **apathie** et des **hémorragies** ont été rapportées lors d'infections expérimentales avec cette souche ; la participation d'une thrombopathie ou d'une atteinte vasculaire expliquant cette plus grande tendance aux saignements n'a toutefois pas été explorée. Le caractère cyclique des thrombopénies n'a pas été observé dans cette étude.

Les 5 premiers cas décrits en Israël font également mention d'une plus grande pathogénicité, avec un tableau clinique comparable au précédent. L'auteur suggère toutefois que la participation d'*E. canis* ait favorisé l'infection à *A. platys*, ou alors qu'il s'agisse d'une souche plus virulente, compte tenu des légères variations génétiques observées [154].

Par contre, une enquête sérologique rétrospective menée à l'Université Vétérinaire de Madrid a révélé semble-t-il une faible pathogénicité de cette bactérie dans ce pays, puisque parmi les 6 chiens séropositifs uniquement pour *A. platys*, 3 étaient

asymptomatiques et les 3 autres ne présentaient aucun signe clinique imputable à la « rickettsie » [160]. Toutefois, la sérologie ne permet pas de déterminer l'ancienneté de l'infection. Des études et enquêtes supplémentaires devraient permettre de répondre plus clairement à cette question.

III.1.4. Traitement

Les tétracyclines constituent le traitement de choix, d'une durée de trois semaines en moyenne ; comme dans l'ehrlichiose monocyttaire, **la rémission des symptômes est rapide** [87].

Un traitement de deux semaines s'est révélé insuffisant chez un chien infecté expérimentalement, qui est apparemment resté porteur chronique de l'infection [172]. Les auteurs proposent donc un suivi du traitement par PCR afin de s'assurer de la disparition de l'agent infectieux dans le sang.

III.2. Ehrlichioses granulocytaires

L'observation d'une ehrlichiose granulocytaire (EG) chez le chien a été faite en 1971 chez un Berger allemand [173]. Dès lors ces infections ont été largement décrites dans plusieurs pays [174 , 175 , 176 , 177 , 178 , 179 , 180].

Il est encore difficile aujourd'hui de faire le point sur ces maladies, car les outils de biologie moléculaire n'ont permis que tardivement de lever des soupçons et confusions quant aux observations cliniques d'ehrlichioses granulocytaires et aux différents agents étiologiques impliqués. Nous manquons donc encore de recul pour faire le tri parmi toutes les données emmagasinées depuis plus de 20 ans, même si quelques études rétrospectives récentes permettent de définir un peu mieux ces nouvelles entités nosologiques.

La multiplication des études sur l'homme, suite à l'émergence dans plusieurs pays de l'HGE (ehrlichiose granulocytaire humaine à *A. phagocytophilum*) et la découverte du caractère zoonotique de *E. ewingii* [181], devrait permettre d'affiner ces données.

III.2.1. Ehrlichiose à *Ehrlichia ewingii*

III.2.1.1. Etiologie et épidémiologie

Aux Etats-Unis, les ehrlichioses granulocytaires n'ont été décrites que dans certains états seulement : la Virginie, le Mississippi, le Missouri, l'Oklahoma, le Tennessee, l'Arkansas, la Californie, la Caroline du Nord, le Minnesota, le Wisconsin [91, 182, 183]. Mais *E. ewingii* n'a été identifiée avec certitude par PCR qu'en Virginie, Caroline du Nord, Oklahoma, Missouri, et plus récemment dans l'Etat de New-York [184].

Malgré une forte similitude et des réactions croisées entre les deux bactéries, l'infection par *E. ewingii* n'offre pas de pouvoir protecteur vis à vis d'*E. canis* [185].

Elle est généralement diagnostiquée au printemps et en été [3], bien qu'on puisse observer des cas en hiver, de février à décembre [183, 184].

Amblyomma americanum semble en être le vecteur [88], même si un cas de méningite associée à une infestation massive par *Dermacentor variabilis* a été décrit ; l'agent n'a toutefois pas été isolé chez la chienne, ni chez la tique [176]. Plus récemment, *E. ewingii* a été détectée par PCR dans des tiques du genre *Dermacentor variabilis* et *Rhipicephalus sanguineus* [184].

L'aspect zoonosique de cette ehrlichiose a été mis en évidence récemment dans le Missouri et en Oklahoma [181, 185].

Il semble qu'*E. ewingii* n'existe qu'aux Etats-Unis, où elle est considérée comme la "véritable" ehrlichiose granulocytaire du chien, les autres étant parfois qualifiées de "fièvres à tiques" [1], et maintenant classées comme infections à *Anaplasma* [8].

Toutefois, dans un camp militaire en Corée, on a retrouvé des fragments d'ADN par PCR sur 10 % des rongeurs ramassés, essentiellement des petits campagnols du genre *Apodemus agrarius* [155]. Il est probable que la maladie ait été importée dans ce pays et que les rongeurs constituent un réservoir.

E. ewingii n'étant pas disponible en culture à ce jour, on manque d'informations quant à ses caractéristiques antigéniques notamment [186].

III.2.1.2. Histoire naturelle de la maladie

Les symptômes initialement décrits lors d'EG étaient généralement modérés ; on observait une hyperthermie et une thrombopénie en phase aiguë, le plus souvent asymptomatiques, et une polyarthrite lors d'une phase supposée chronique [187].

Depuis lors, trois grandes présentations cliniques ont été décrites en association avec *Ehrlichia ewingii* : une **anémie chronique** modérée à sévère, un **syndrome fébrile aigu avec thrombopénie**, et un **syndrome ambulatoire polyalgique** représenté par une **polyarthrite neutrophilique** [184, 187 , 188].

Une étude américaine rapporte par ailleurs un rare cas d'ehrlichiose granulocytaire asymptomatique, qui semble évoquer une **possible phase subclinique**. Chez ce chien, le traitement à base de doxycycline permet l'élimination de la parasitémie sans toutefois que la numération plaquettaire ne revienne à la normale [183].

Dans une étude rétrospective récente, Goodman et coll. ont noté l'existence de trois cas pour lesquels une **maladie intercurrente** pourrait expliquer l'émergence de l'ehrlichiose. Les deux premiers chiens étaient sous traitement corticoïdes depuis plusieurs semaines pour des douleurs articulaires et pour une anémie hémolytique à médiation immune, et le dernier chien présentait un sarcome pleural, qui pouvait d'ailleurs à lui seul expliquer les signes de fièvre et de thrombopénie observés. La persistance de l'infection pourrait donc, comme lors d'infection par *E. canis*, être réactivée par une baisse de l'immunité ou une maladie intercurrente [184].

Les signes cliniques observés sont le plus souvent **fièvre, léthargie, anorexie**, pica, **boiteries**, vomissements ou encore diarrhée. A l'examen, on note différents symptômes tels qu'un souffle cardiaque (souffle d'anémie), des douleurs articulaires, une hépatosplénomégalie ou des bruits pulmonaires surajoutés. Quelques signes **d'une tendance hémorragique** peuvent parfois être notés : hémorragies aux sites de ponctions veineuses, vomissements ou diarrhée hémorragiques, pétéchies suite à la tonte...[184]

Les différentes découvertes biologiques incluent une **anémie centrale normochrome et normocytaire**, une **thrombopénie fugace**, sévère à modérée, avec une

mégathrombocytose, une **hyperglobulinémie**, une **hypoalbuminémie**, une élévation des enzymes hépatiques plasmatiques (PAI et ALAT), un test de Coombs parfois positif et une moelle osseuse présentant une hyperplasie myéloïde et des réserves en fer diminuées [183].

Un chien a toutefois été présenté avec des signes sévères (neutropénie et leucopénie sévères), pour lesquels aucune autre cause n'a pu être détectée. Une réaction médicamenteuse ou d'autres mécanismes à médiation immune sans relation avec *E. ewingii* ont tout de même été évoqués [184].

On peut observer des inclusions dans environ 1 à 7 % des granulocytes sanguins et dans environ 1 % des précurseurs myéloïdes. Lors de tableaux cliniques dominés par une polyarthrite, il est par contre rare d'observer des *Ehrlichia* sur les frottis sanguins, mais on peut en observer dans quelques neutrophiles présents dans les liquides de ponctions articulaires [183].

Une description d'ehrlichiose granulocytaire associée à une **méningite** a également été faite [176]. La chienne présentait des signes cliniques classiques de méningite (hyperthermie, léthargie, cervicalgie, amaigrissement) et des saignements (épistaxis, saignements gingivaux) ; du point de vue biologique, on constatait une lymphopénie, une anémie centrale, une neutrophilie et une thrombopénie sévère. Le liquide céphalo-rachidien, richement cellulaire, contenait jusqu'à 9 % de granulocytes neutrophiles infectés par des inclusions d'*Ehrlichia sp.* La sérologie était fortement positive pour *E. canis*, et également plus faiblement pour *R. rickettsii* et *E. equi* (*A. phagocytophilum*). Une séroconversion a été notée après 32 jours et la chienne a été traitée avec succès par la doxycycline, mais pas avec le premier traitement au chloramphénicol, ce qui semble signifier que l'infection par *R. rickettsii* n'était pas responsable des symptômes observés.

III.2.1.3. Traitement

Le traitement à base de **tétracycline** ou de **doxycycline** permet une rémission rapide des symptômes dans la majorité des cas de polyarthrite, avec une baisse de la parasitémie et un retour à la normale de la numération plaquettaire sous 24 à 48 heures. Les chiens atteints d'anémie nécessitent un traitement plus long et récupèrent en plusieurs semaines [3, 91, 183, 184].

Le **dipropionate d'imidocarb** semble également pouvoir être utilisé avec succès [88].

Un traitement à base d'anti-inflammatoires non-stéroïdien peut être préconisé en cas de douleurs articulaires, alors que les corticoïdes sont plutôt déconseillés [183 , 184].

III.2.2. Infection du chien par *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum*

Comme nous l'avons vu, *Anaplasma phagocytophilum* est une nouvelle espèce qui regroupe trois entités, précédemment dénommées ***Ehrlichia phagocytophila***, agent de la fièvre à tique des petits ruminants, ***Ehrlichia equi***, responsable de l'ehrlichiose granulocytaire du cheval, et l'agent de l'**ehrlichiose granulocytaire humaine (HGE)**. L'infection du chien par cette *Anaplasma* est maintenant bien documentée ; un rappel historique s'impose afin de faire le point sur l'étiologie et l'épidémiologie de cette affection.

III.2.2.1. Historique

En 1975, Lewis et coll. montrent la sensibilité du chien à l'*Ehrlichia* du cheval expérimentalement [189]. *E. equi* a été retrouvée plus tard dans les polynucléaires neutrophiles circulants de chiens pour la première fois aux Etats-Unis en 1982 [174]. Elle est ensuite surtout décrite dans le Minnesota et le Wisconsin, qui sont aussi des foyers d'ehrlichiose granulocytaire humaine (HGE). Cette observation de cas de HGE associés à des cas de CGE (ehrlichiose granulocytaire canine) a pu être étendue ultérieurement à plusieurs états des Etats-Unis [175]. Au vu de la grande proximité phylogénique de ces deux espèces, le caractère zoonosique avait déjà été soulevé ; le chien, qui présente des signes cliniques modérés, servirait alors de réservoir [190].

Cette ehrlichiose a également été décrite dans la seconde moitié des années 90 en Suède [179 , 191] puis en Suisse [180] ; le séquençage de l'ADN 16S de ces *Ehrlichia* diffèrait seulement de quelques nucléotides d'*E. equi* et d'*E. phagocytophila*, et était par contre totalement identique à une souche américaine de HGE.

Plusieurs observations d'inclusions dans les neutrophiles de chiens, proches des inclusions d'*E. phagocytophila* observées chez les moutons, ont été faites en Angleterre et

en Ecosse à la même période [178]. Les animaux présentant cette “fièvre à tiques” avaient tous un historique d’exposition massive aux tiques ; aucune corrélation n’a toutefois été faite entre la présence de ces inclusions et les signes cliniques observés. Une étude sérologique dans la même région a pu montrer l’existence de plusieurs chiens positifs et asymptomatiques, ne présentant aucune inclusion.

Une étude en Slovénie sur 26 chiens a permis de détecter 20 chiens avec une sérologie positive pour *E. phagocytophila* et négative pour *E. canis*. Les deux chiens testés pour *E. chaffeensis* étaient également positifs. Les signes cliniques et hématologiques étaient très variables et la corrélation avec la clinique n’est pas forcément évidente ; les chiens traités ont montré une amélioration clinique dans tous les cas, mais les signes hématologiques n’ont pas toujours été améliorés, voire se sont empirés. D’autre part, aucun diagnostic direct n’a été fait (aucune morula n’a été détectée) ; les chiens ont donc pu avoir un contact antérieur avec ces agents [192]. Toutefois, il n’est pas à exclure que le chien puisse être un hôte accidentel de ces maladies dans ce pays ; un cas humain a par ailleurs été détecté récemment chez une jeune fille présentant des signes évidents d’HGE [193].

Malgré la grande uniformité de cette nouvelle entité et sa position taxonomique établie, **il existe des différences importantes dans l’incidence et la prévalence des maladies, leur présentation clinique et leur sévérité**, particulièrement chez l’homme, et les espèces sensibles différent selon les pays. Dumler et coll. ont mis en évidence une uniformité importante du génome de différentes souches américaines d’*A. phagocytophilum*. Il semble toutefois exister des **différences entre les souches américaines et européennes**, qui pourraient être liées à une plus longue évolution dans l’ancien continent, et qui expliquerait en partie la variabilité clinique et l’adaptation à différentes espèces [194].

Pour plus de clarté dans la suite de cet exposé, nous utiliserons la seule appellation ***Anaplasma phagocytophilum*** pour désigner cette bactérie, bien que les références puissent faire mention des autres dénominations.

III.2.2.2. Epidémiologie

Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'épidémiologie de cette affection semble très intimement liée à celle de la maladie de Lyme, mondialement répandue [1, 195].

Le vecteur de cette *Anaplasma* est en effet, comme pour *Borrelia burgdorferi*, la tique dure *Ixodes ricinus* en Europe, bien que d'autres *Ixodes spp.* comme *I. trianguliceps* puisse apparemment l'héberger [1, 196], ou encore *I. scapularis* et *I. pacificus* aux Etats-Unis, ou *I. persulcatus* en Chine [45, 88, 175, 190]. *Ixodes dentatus* semble également être un vecteur compétent expérimentalement, ce qui évoque la possibilité d'un cycle épidémiologique faisant intervenir les oiseaux [197].

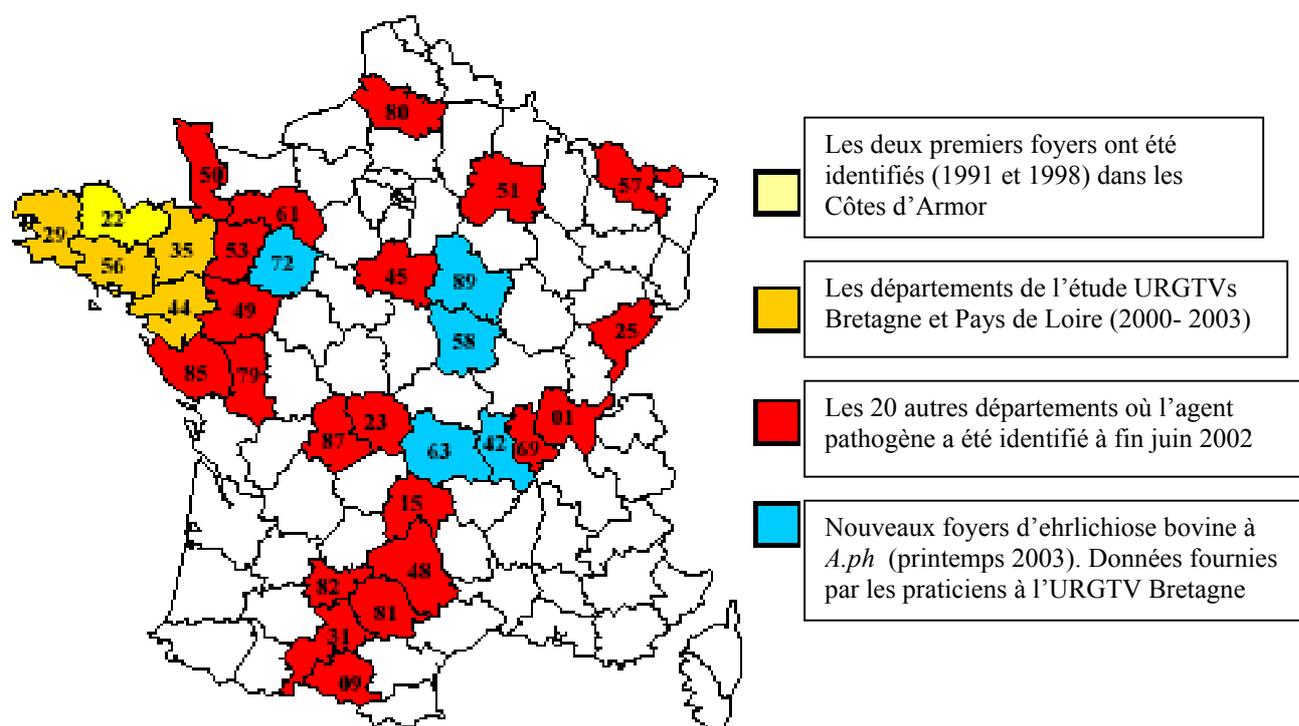
Les formes nymphales et imaginaires semblent jouer un rôle dans la transmission de cette bactérie, les réservoirs étant constitués de grands mammifères comme les chevaux, les chiens ou les ruminants, domestiques ou sauvages, ainsi que de petits rongeurs et lapins [1, 45, 190, 196, 197]. Les carnivores sauvages pourraient également intervenir dans le cycle épidémiologique et servir d'**espèces sentinelles** [105].

La transmission du germe semble pouvoir se faire même chez des individus immunisés contre les tiques, malgré une fixation et un repas de sang incomplet [198]. Chez la souris infectée expérimentalement, on peut détecter l'ADN pendant plus de 50 jours [199].

Les pays concernés par cette maladie sont très nombreux comme nous avons pu le voir. En **Europe**, l'ehrlichiose granulocytaire, humaine et animale, concerne de nombreux pays comme la France, l'Allemagne, l'Italie, le Royaume-Uni, la Suisse, le Danemark, la Suède, la Norvège, la Slovénie...[1]

En **France**, *A. phagocytophilum* a été décrite chez les bovins dans au moins 25 départements répartis sur tout le territoire [39, 44], comme la Bretagne ou plus récemment la région Rhône-Alpes [200] (cf. Figure 3) ; mais son incidence chez le chien reste encore inconnue, et elle est également probablement sous-diagnostiquée chez l'homme. La maladie sévit de façon anadémique et biphasique, au printemps et à l'automne [44].

Figure 3 : Foyers d'ehrlichiose bovine à *A.phagocytophilum* en France (d'après [44])



Aux **Etats-Unis**, parmi les Etats où des cas ont été décrits, on compte le Minnesota, le Wisconsin, la Virginie, la Caroline du Nord, le Connecticut (Rhode Island), l'Etat de New-York, l'Oklahoma, l'Arkansas ou encore la Californie [45 , 88 , 91 , 175 , 182 , 190 , 201 , 202 , 203]. La maladie concerne donc essentiellement le **Nord-Est**, le **nord du Midwest** et la **Californie**.

Cette maladie sévit également en **Asie** [38 , 195]. Une étude sérologique a été menée sur 49 chiens malades en Thaïlande ; 58 % des chiens étaient séropositifs, et deux d'entre eux n'étaient positifs en IFI et en WB que pour ce germe. Il semble donc qu'*A. phagocytophilum* puisse exister dans ce pays et entraîner des symptômes chez le chiens, bien qu'aucun agent n'ait été isolé par PCR sur ces deux individus [15]. Notons qu'il existe de possibles réactions croisées lors d'infections chroniques par *E. canis* sur les antigènes d'*A. phagocytophilum*, au moins pour la souche *Israeli* d'*E. canis* [204].

L'ehrlichiose à *A. phagocytophilum* semble sévir davantage en **automne** chez le chien [3].

III.2.2.3. Pouvoir antigénique

Plusieurs techniques sérologiques permettent de détecter *A. phagocytophilum*, et la propagation récente sur culture cellulaire (promyélocytes humains HL60) devrait permettre un plus grande disponibilité de l'antigène pour l'étude de cette bactérie [27].

En WB, on peut révéler un marquage multiple (plusieurs bandes) entre 32 et 43 kDa ou entre 48 et 80 kDa, ainsi que des bandes simples à 25, 29, 40, 42, 44, 80, 100, 105, 120 et 160 kDa [175, 205].

Les **protéines de 44 kDa** en moyenne sont des antigènes de surface majeurs, retrouvés uniformément dans les infections à *A. phagocytophilum*. Elles pourraient intervenir comme ligand avant la pénétration dans les neutrophiles [67].

Toutefois, il semble que les sérums hyperimmuns de chiens infectés par *E. canis* puissent reconnaître cette protéine [201, 204]. Les protéines de 42-47 kDa sont en fait codées par une famille de multigènes proches de *msp-2* d'*A. marginale* [206], et dans une moindre mesure des gènes *map-1* et *p30* d'*E. ruminantium* et d'*E. canis* respectivement [2, 8]. Elles semblent toutefois présenter des variations génétiques entre les différentes souches, hôtes et milieu de cultures [206, 207, 208]. Cette capacité de modification de la région hypervariable de ces antigènes permettrait d'échapper au système immunitaire de l'hôte [209].

Une protéine de 80 kDa semble être semblable à HSP-70 de *Borrelia burgdorferi*, et donnerait des réactions croisées chez des humains séropositifs pour la maladie de Lyme [210].

III.2.2.4. Histoire naturelle de l'infection

Cette ehrlichiose a d'abord été décrite comme **modérée** chez le chien lors d'infection expérimentale, passant généralement inaperçue ou ne donnant que des signes légers. Des inclusions cytoplasmiques sont visibles dans les granulocytes neutrophiles et éosinophiles de chiens de 3 à 7 jours après l'infection expérimentale et persistent quelques jours seulement. Les signes cliniques et biologiques durant cette **parasitémie transitoire** consistent en une légère **hyperthermie**, une **thrombopénie** et une **anémie**

modérée ; la leucopénie est un signe moins constant. Les signes cliniques et biologiques se sont améliorés rapidement, et sont devenus normaux dès la deuxième semaine après l'infection [189].

Toutefois, **l'ehrlichiose granulocytaire décrite en Europe est différente**. Il s'agit d'une maladie aiguë entraînant des **signes cliniques sévères** tels qu'une hyperthermie importante (40,5°C), de l'apathie ou de l'anorexie, pouvant persister plusieurs jours ; d'autres signes peuvent être retrouvés (diarrhées, signes neurologiques...) [1, 179]. Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une infection persistante ou récurrente pouvait être la cause des signes cliniques et biologiques importants, certains chiens présentant un profil sérologique d'infection chronique [179].

Dans cette publication de Egenvall et coll., le signe hématologique le plus constant semble être la **thrombopénie**, avec une moyenne de 82000/mm³ ; l'anémie ou la leucopénie sont plus rarement décrites. Le pourcentage de neutrophiles infectés peut être élevé, allant de 7 à 21 %. Les chiens testés pour les AcAN sont tous négatifs [179].

On retrouve les mêmes signes cliniques et biologiques dans une observation de deux cas cliniques en Suisse [180], et dans la plupart des cas décrits aux Etats-Unis, qui sont assez diversifiés et pour lesquels la polyarthrite semble moins constante que lors d'ehrlichiose à *E. ewingii* [3, 91, 175, 190]

Plus récemment toutefois, la description de 6 cas détectés au Royaume-Uni, et diagnostiqués par PCR (gène *epark1*) fait mention pour 5 d'entre eux de **signes neurologiques de type méningite et/ou de polyarthrite**, alors qu'une thrombopénie n'est présente que sur 3 de ces chiens [211]. La présentation clinique incluait abattement, fièvre et douleurs articulaires et/ou cervicales. Aucune inclusion n'a pu être mise en évidence, mais la PCR positive et l'amélioration rapide des signes cliniques sous doxycycline semblent confirmer que, tout comme *E. ewingii*, les souches d'*A. phagocytophilum* rencontrées en Europe peuvent entraîner des signes nerveux et articulaire.

III.2.2.5. Traitement

La rémission clinique peut être spontanée [179]. Un traitement à base de **doxycycline** à raison de **5 mg/kg/j** pendant 10 à 28 jours semble efficace ; les chiens récupèrent en quelques jours [179, 180 , 211].

Chez l'homme, la **rifampicine** a également été utilisée, notamment en cas de gestation, pour éviter les problèmes liés aux tétracyclines durant cette période [212]. Toutefois, son utilisation devrait être limitée compte-tenu des résistances possibles qu'une utilisation massive pourrait induire, comme cela a été observé avec d'autres bactéries [213].

L'efficacité de différents antibiotiques a été testée *in vitro* sur 8 souches géographiquement distinctes d'*A. phagocytophilum*, et aucune différence de susceptibilité n'a été noté entre les différentes souches. La doxycycline et la rifampicine sont les antibiotiques les plus actifs, mais les tétracyclines présentent l'avantage d'être également efficaces contre *Borrelia burgdorferi*. La lévofloxacine s'est également révélée très efficace [213].

L'évaluation de ces différents traitements alternatifs chez le chien n'est pas documentée à notre connaissance.

III.2.3. Ehrlichiose à Ehrlichia sp

Une ehrlichiose granulocytaire a été décrite en France chez le chien, dans des polynucléaires neutrophiles infectés par un gamétocyte d'*Hepatozoon canis* [177]. De morphologie proche des morulas d'*E. canis*, elles ne sont présentes que dans certaines cellules infectées par un gamétocyte. (Cf. III.4. Infections multiples)

III.3. Autres ehrlichioses canines

III.3.1. Ehrlichiose à *N. risticii* var. *atypicalis*

N. (Ehrlichia) risticii est l'agent de l'ehrlichiose monocyttaire des équidés ou fièvre de Potomac, causant une maladie souvent grave chez le cheval. Elle a été décrite chez cet animal essentiellement aux **Etats-Unis**, mais aussi en **Europe** et en **France** [5]. Le

vecteur de cette maladie est un trématode parasite de poisson, d'escargots ou d'insectes aquatiques, comme nous l'avons vu dans la première partie [2 , 57]

Des **infections expérimentales** ont été décrites chez le chien, entraînant des symptômes modérés, ou passant inaperçues cliniquement ; elles ont permis de penser que le chien avait un rôle épidémiologique de réservoir pour cette maladie [53, 214].

La description aux Etats-Unis de cas d'**ehrlichioses canines atypiques naturelles** a permis de renforcer cette suspicion [215 , 216]. Les chiens présentaient des **signes hémorragiques** souvent sévères, des œdèmes, de la **fièvre**, une **polyarthrite**, une anémie et une **thrombopénie**. La sérologie en IFI était négative pour *E. canis* mais positive pour *N. risticii*.

L'isolement de cette ehrlichia sur des monocytes canins a pu être effectuée, ainsi que des analyses d'hybridation et de PCR, qui ont permis de montrer que cet agent était fortement similaire, morphologiquement et génétiquement, à *N. risticii*.

En Europe, des cas canins séronégatifs pour *E. canis* mais positifs pour *N. risticii* ont été décrits, mais l'agent pathogène n'a pas été isolé et n'est donc pas clairement identifié [217].

III.3.2. Empoisonnement au saumon

Cette ehrlichiose, due à ***Neorickettsia helminthoeca***, n'existe qu'aux **Etats-Unis** ; elle a été décrite pour la première fois chez le chien en 1950 [218]. Elle est surtout décrite sur la côte Ouest des Etats-Unis entre la Californie et l'Etat de Washington [2, 5] ; cette localisation est liée à celle de l'hôte intermédiaire, *Oxytrema silicula*, un escargot que l'on ne retrouve que dans ces régions [3]. La transmission se fait par l'ingestion de saumon ou de salamandres parasités par un trématode (*Nanophyetus salmonicola*) dont les métacercaires peuvent héberger la bactérie. Les animaux atteints naturellement sont les chiens, renards (*Vulpes vulpes*, *Vulpes fulva*...) et coyotes (*Canis latrans*).

N. helminthoeca parasite essentiellement les cellules mononucléées et principalement les lymphocytes et les macrophages des villosités intestinales et des ganglions mésentériques, mais rarement ceux du sang. Les signes cliniques sont assez caractéristiques et évoquent une parvovirose : **fièvre**, abattement, anorexie,

amaigrissement, déshydratation, **diarrhée aqueuse** parfois hémorragique, et **vomissements**. La mortalité est très importante en l'absence de traitement, mais les chiens atteints acquièrent une **immunité solide** pendant au moins 56 jours [3, 5, 20].

III.3.3. Ehrlichiose à *E. chaffeensis*

Une « rickettsie » génétiquement très proche d'*E. canis* a été isolée chez un patient humain en 1986 [219]. Puis aux Etats-Unis, de nombreux cas diagnostiqués chez l'homme comme des « fièvres pourpre des montagnes rocheuses » (infection à *Rickettsia rickettsii*) furent reconsidérés, et les sérums testés rétrospectivement pour *E. canis* [92]. Les nombreux cas positifs ont soulevé à nouveau le problème de l'aspect zoonosique de la maladie, déjà évoqué par Donatien et Lestoquard ("Son rôle pathogène possible pour l'homme doit être recherché" [74]) et par Kallick et coll. [220].

L'agent étiologique fut isolé du sérum d'un patient en 1990 [221] et fut baptisée ***Ehrlichia chaffeensis*** [222]. Elle montre une similitude de 92.8 % au niveau du gène de l'ARNr 16S avec *Ehrlichia canis*.

Chez l'homme, la maladie se caractérise par des signes cliniques fébriles (hyperthermie, maux de tête, myalgies...) et peut être fatale en l'absence de traitement [3].

On a pu montrer **expérimentalement** la sensibilité du chien à cette *Ehrlichia* par inoculation de parasites en culture [223]. Les chiots infectés n'ont toutefois présenté que des **signes modérés** (léger pic thermique, écoulement nasal...) et pas de thrombopénie. Ils ont développé rapidement une réponse sérologique homologue, puis une réponse hétérologue pour l'antigène d'*E. canis* avec un titre 2 à 8 fois plus faible. *E. chaffeensis* a pu être isolée du sang du 7^e au 26^e jour. Les chiens infectés par *E. chaffeensis* n'acquièrent aucune protection vis à vis d'*E. canis*. Ils pourraient donc servir de réservoir pour ce parasite. On ignore toutefois combien de temps les chiens sont susceptibles d'héberger la bactérie et leur rôle exacte dans le cycle épidémiologique demande des études supplémentaires.

Une étude sérologique et par PCR menée en Virginie a permis de conforter l'hypothèse de la sensibilité naturelle du chien à *E. chaffeensis*, 42,1 % des chiens testés présentant une

PCR positive [224]. *E. chaffeensis* a également été détectée dans un chenil de Caroline du Nord [88].

Dermacentor variabilis, la tique américaine du chien [224], ou encore ***Amblyomma americanum*** [88], peuvent en être les vecteurs.

E. chaffeensis a également été isolée en Chine dans des tiques du genre *Amblyomma testudinarium* et *Haemaphysalis yeni* [225].

Au Vietnam, une souche proche d'*E. chaffeensis* a été isolée dans des tiques du genre *Hemaphysalis hystricis* [167].

En Afrique du Sud, une enquête sérologique a permis de détecter des chiens positifs en IFI pour *E. chaffeensis* avec des titres supérieurs à ceux observés pour *E. canis*, ce qui peut supposer la présence de cet agent pathogène chez le chiens dans ce pays [226].

Dans une étude plus récente, un **rôle pathogène important** d'*E. chaffeensis* a pu être mis en évidence **chez des chiens atteints naturellement**. Ces chiens seraient d'ailleurs plus réfractaires au traitement à base de doxycycline [91]. Toutefois, il est difficile de savoir aujourd'hui si cette persistance de l'agent pathogène est due à une moindre efficacité de l'antibiotique, ou simplement à une réinfestation liée au contact permanent avec le vecteur [83].

Le dipropionate d'imidocarb serait une alternative thérapeutique efficace [88].

III.3.4. Ehrlichiose Sud-Africaine

En Afrique du Sud, les chiens présentant des symptômes caractéristiques d'ehrlichiose sont souvent négatifs aux PCR utilisant des sondes du gène de l'ARNr 16s des souches d'*Ehrlichia canis* nord-américaines.

Une équipe d'Onderstepoort a donc testé par PCR des échantillons de chiens malades et de chiens asymptomatiques provenant d'un chenil, avec des sondes d'*E. (Cowdria) ruminantium*, *Ehrlichia spp.* et *Anaplasma spp.* ; 72 % des échantillons ont donné un résultat positif pour *E. ruminantium*, et aucun pour les deux autres sondes testées [86].

Une autre PCR a été menée sur des sondes du gène *pCS20* qui est spécifique d'*E. ruminantium* ; 32 % des échantillons testés ont donné des amplicons visibles après électrophorèse et 74 % ont donné des signes d'hybridation.

L'étude du séquençage des gènes de la fraction légère 16s de l'ARN a montré une forte homologie avec la souche *Mara87/7* d'*E. ruminantium*, et le gène *map1* ne diffère que

d'une pb avec un autre isolat. Il semble donc que ce nouveau germe sud-africain soit **très proche d'*E. ruminantium***.

Parmi les chiens testés dans cette étude, certains étaient en quarantaine, en provenance d'autres pays d'Afrique ; 8 chiens sur 17 étaient positifs pour la PCR sur le gène *pCS20*, ce qui tend à montrer que le chien peut être porteur de ce germe dans divers pays.

Cet agent n'a pas pu être mis en culture et son pouvoir pathogène chez le chien n'a pas été testé. On n'a donc pas pu mettre en évidence de corrélation entre la clinique et l'isolement et l'amplification de ces gènes par PCR, d'autant plus qu'aucune inclusion n'a été observée chez ces animaux.

III.3.5. Ehrlichiose Vénézuélienne

Suite à la découverte au Venezuela sur un patient humain d'une ehrlichiose proche d'*E. canis* [10], une étude a été menée sur des chiens et des tiques de l'espèce *R. sanguineus*. Cette étude a révélé que l'ehrlichiose du chien était identique et le séquençage du gène 16s a révélé 99,9 % d'homologie avec ***E. canis Oklahoma*** [78].

C'est la première étude qui rapporte l'existence et la mise en culture d'une ehrlichiose canine en Amérique du Sud. Le chien pourrait alors servir de réservoir ou de sentinelle pour cette ehrlichiose, et les humains la contracter par les piqûres occasionnelles de tiques brunes.

III.3.6. Agent SF

Cette *ehrlichia* a été découverte en 1973, au Japon, dans les mêmes zones que *E. sennetsu*. Elle a pu être isolée chez son hôte, *Stellanthasimus falcatus*, par injection intrapéritonéale et administration orale de métacercaires à des souris, et maintenues chez la souris par transfert de cellules spléniques infectées [46].

Chez le chien, elle est responsable **expérimentalement** d'un **syndrome fébrile modéré** et peut être réisolée après quelques jours [227]. On ne connaît actuellement pas d'infections naturelles de l'animal ou de l'homme par cet agent pathogène.

III.3.7. Ehrlichia muris et le nouvel agent découvert sur Ixodes ovatus

E. muris a été isolée au Japon en 1983 à partir de souris sauvages ; elle entraîne une maladie bénigne chez la souris de laboratoire, avec splénomégalie. Elle a aussi été isolée dans les tiques du genre *Haemaphysalis flava*. Une enquête sérologique a permis de détecter **plusieurs chiens séropositifs au Japon**. Toutefois, on ne sait pas si cet agent est pathogène dans cette espèce [2].

Une autre souche croisant avec *E. muris* en sérologie a été isolée dans des tiques *Ixodes ovatus*, mais cet isolat est bien plus pathogène pour la souris [2]. Ce nouvel agent *Ehrlichia sp.* isolé sur *Ixodes ovatus* a pu être détecté par PCR chez un chien au Japon [158] ; aucune observation clinique n'a toutefois été faite sur ce chien.

L'intervention de ces deux isolats en tant qu'ehrlichioses chez le chien reste à déterminer. Mais la pathogénicité du nouvel isolat *Ehrlichia sp.* sur *I. ovatus* aura tout de même un intérêt en recherche sur le modèle murin, puisqu'il est génétiquement très proches des *Ehrlichiae* du groupe « canis » [2].

III.3.8. Wolbachia

Au Japon, on a pu isoler une espèce proche d'une *Wolbachia sp.*, parasite de *Dirofilaria immitis*, dans le sang d'un chien suspect d'ehrlichiose [80]. Cette découverte évoquée, d'après l'auteur, la participation possible de cet agent dans les états fébriles inexplicables du chien, mais demande encore d'autres observations et recherches.

III.4. Infections multiples

De très nombreuses études rapportent aujourd'hui des cas d'infections multiples par plusieurs agents pathogènes transmis par les tiques, ou tout au moins une exposition à plusieurs espèces d'*Ehrlichieae* et d'autres « arbo-bactérioses » ou protozooses [15 , 88 , 91 , 101 , 183 , 228 , 229 , 230].

Dans une même zone, plusieurs espèces de tiques sont susceptibles de transmettre différents agents pathogènes, et il semble également que certains de ces agents puissent s'adapter à de nouveaux vecteurs comme nous l'avons déjà vu dans la première partie [3 , 38, 88 , 177] :

- ***Rhipicephalus sanguineus*** transmet *Ehrlichia canis*, mais également *Babesia canis* ou *B. gibsoni*, *Hepatozoon canis*, certaines *Rickettsia spp.* et probablement *Bartonella vinsonii*, *E. ewingii* ou encore *E. platys*.
- Les tiques du genre ***Ixodes spp.*** transmettent *A. phagocytophilum*, mais aussi *B. gibsoni* et *B. canis*, certaines *Rickettsia spp.* ou *Borrelia burgdorferi*.
- ***Amblyomma americanum*** transmet *E. chaffeensis*, *E. ewingii* ou encore certaines *Rickettsia spp.*

L'infection par plusieurs espèces bactériennes ou parasites peut provenir de la transmission de plusieurs agents pathogènes par la même tique, mais aussi par la morsure simultanée de plusieurs espèces de tiques différentes ou par la persistance d'infections chroniques transmises par différentes tiques à des moments différents.

Les chiens sont susceptibles, bien plus que l'Homme, à des morsures multiples de tiques de même espèce, voire d'espèces différentes ; ils sont probablement victimes d'espèces et de stades plus variés que l'Homme et pourraient ainsi servir de **sentinelles** pour prévoir certaines infections humaines, pour peu qu'un diagnostic étiologique précis ait été établi [88].

En 1965, Ewing décrivait déjà les manifestations combinées d'infections par *Babesia canis* et *Ehrlichia canis* chez le chien [75], puis elles ont été largement évoquées par la suite [5 , 15 , 20 , 53 , 88, 140 , 153 , 154 , 166].

En France, *Babesia canis* semble avoir une distribution comparable à celle d'*E. canis* ; les **babésioses** devraient également être recherchées lors de suspicion d'ehrlichiose et inversement [103].

En Espagne, un cas d'infection multiple à *E. canis*, *A. platys* et *Babesia canis* a été décrit, et ce cas ne semble pas isolé dans ce pays, comme le montre l'enquête sérologique rétrospective menée suite à cette découverte [160].

Le chien, croisé Drahtaar de 3 ans, est présenté en consultation suite à une **infestation massive de tiques** et deux épisodes d'**épistaxis** unilatérale. Il est en mauvais état

général, abattu et anorexique depuis quelques jours. A l'examen, il présente une **détresse respiratoire**, des **muqueuses pâles**, une **hyperthermie** (39,8°C), un épiphora, une hyperkératose de la truffe et une **splénomégalie**. La protéinémie est normale avec toutefois une **hyperglobulinémie** et un rapport albumine/globuline bas (0,29). Le chien est **anémié**, **thrombopénique** (81000/mm³) et **leucopénique** (1400/mm³) ; le temps de saignement est élevé mais l'hémostase secondaire est normale (temps de prothrombine, temps de céphaline activée, antithrombine III). Sur le frottis sanguin, des **inclusions caractéristiques** de *B. canis* et d'*A. platys* sont observées. Aucune inclusion d'*E. canis* n'est détectée, mais la sérologie est positive au 1/2560, et elle est également positive pour *A. platys* au 1/640. En WB, le sérum donne une bande caractéristique, identique à celle d'un chien infecté par la souche Louisiane d'*A. platys*.

L'animal est traité avec de la doxycycline à 10 mg/kg/j durant 28 jours et du dipropionate d'imidocarb (5 mg/kg) le premier jour et deux semaines ensuite. Une nette amélioration est notée en 15 jours, avec toutefois un épisode d'épistaxis survenu après le début du traitement. Les signes biologiques se sont améliorés progressivement sur les 15 jours suivants, et les titres en anticorps pour les deux *ehrlichieae* ont diminué également. La PCR *A. platys* était négative à J75 et à J240 ; le chien se portait bien alors.

Ce cas illustre la **gravité d'une infection due à plusieurs agents pathogènes transmis par *Rhipicephalus sanguineus***, avec un tableau clinique qui évoque largement une ehrlichiose monocyttaire, comme le souligneront Kordick et coll. [88].

La participation d'*A. platys* dans ce tableau clinique est difficile à interpréter, mais la détection d'inclusions plaquettaires ne laisse aucun doute quant à sa présence au moment du diagnostic. Pour certains auteurs, **la présence d'*E. canis* permettrait de révéler des infections à *A. platys*** [154].

La présence d'*E. canis* lors d'infection multiple semble être d'ailleurs non seulement un facteur associé à la **présence de signes cliniques** mais aussi à un **pronostic plus sombre** [88].

La présence de multiples agents pathogènes entraîne parfois un enrichissement du tableau clinique. Des infections par *Rickettsia rickettsii*, agent de la fièvre pourprée des montagnes rocheuses, ont été détectés par PCR chez deux chiens atteints d'EG à *E. ewingii*, et présentant des signes neurologiques que l'auteur n'attribue pas à l'ehrlichiose (absence d'inclusions dans les granulocytes du LCR) [184].

Beaufils et coll. ont également décrit la présence simultanée d'*Hepatozoon canis* et d'une *Ehrlichia sp.* dans des neutrophiles de chiens en France [177]. Cliniquement, les animaux présentaient un abattement, une hyperthermie, une anorexie et un jetage oculo-nasal, imputables à un agent comme à l'autre. Par contre, une **anémie**, une **leucopénie** et une **thrombopénie majeure**, caractéristiques des infections à *Ehrlichia sp.*, étaient également présentes.

L'infection par plusieurs agents pathogènes est donc certainement responsable de **modifications cliniques, biologiques, thérapeutiques et pronostiques** par rapport à toutes ces maladies isolées [53 , 88]. Il est d'ailleurs probable que les infections multiples représentent un biais important dans les études rétrospectives cliniques, et qu'elles expliquent au moins pour partie la **diversité** de présentations cliniques des ehrlichioses [3 , 88]. C'est également une explication retenue par Suksawat et coll. pour expliquer la plus grande pathogénicité apparente d'*E. canis* en Thaïlande [15].

Enfin, la recherche d'infections multiples devrait permettre de détecter et mieux définir certaines maladies mal connues comme la bartonellose canine à *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii*, récemment décrite chez le chien et associée à des signes graves de lymphadénites, d'endocardites ou de rhinites granulomateuses. Les infections par cette *Bartonella sp.* et *E. canis* semblent fréquentes aux Etats-Unis [91, 231].

Ainsi, le chien peut être naturellement infecté par plusieurs espèces d'*Ehrlichieae* issues de tous les groupes - *E. ewingii*, *E. chaffeensis*, *A. platys*, *A. phagocytophilum*, *N. risticii*, *N. helminthoeca*... - et développer des signes cliniques qui ne permettent souvent pas de faire la différence entre ces différentes infections.

De plus, dans les régions concernées par plusieurs types d'ehrlichioses, de rickettsioses, de babésioses, de bartonelloses, l'hépatozoonose, la borréliose de Lyme ou encore d'autres agents d'infections opportunistes, des infections multiples sont possibles, et sont à même de modifier le tableau clinique et le pronostic.

Même si les connaissances sur certaines entités sont encore récentes et mal définies, le clinicien vétérinaire doit donc être à même d'intégrer ces nouvelles données afin d'établir une stratégie diagnostique cohérente de ces différentes maladies, de connaître les facteurs pronostiques, et de proposer le meilleur traitement ainsi qu'un suivi adapté à chaque animal.

IV. QUATRIEME PARTIE : DIAGNOSTIC DES EHRLICHIOSES CANINES

Le diagnostic des ehrlichioses a longtemps été basé sur la sérologie. Malgré les réactions croisées, il était de bon ton de penser que ce diagnostic sérologique ne posait pas de problèmes, compte-tenu de la méconnaissance de certaines infections (ou de leur apparition récente), de la distribution géographique limitée des différentes espèces, de la spécificité d'hôte longtemps admise, et de présentations cliniques différentes. En outre, la sensibilité apparente de toutes les espèces aux tétracyclines, notamment lors des premiers temps de l'infection, permettait de se prémunir d'un diagnostic étiologique précis.

Mais au regard des données actuelles et de l'existence d'infections multiples, le diagnostic peut s'avérer difficile, tant les signes cliniques peuvent être peu spécifiques, les présentations cliniques variées, et les connaissances sur la pathogénie et l'épidémiologie des différentes ehrlichioses encore assez limitées.

L'impact du point de vue de la Santé Publique n'est pas à négliger puisqu'on sait aujourd'hui que la majorité des ehrlichioses décrites chez le chien - *E. chaffeensis*, *A. phagocytophilum*, *E. ewingii* et peut-être *E. canis* et *A. platys* - peuvent également infecter l'Homme.

La vigilance clinique est donc essentielle pour dépister et mieux connaître ces maladies. Nous ferons donc un tour d'horizon des différents aspects du diagnostic, épidémiologique tout d'abord, puis clinique, pour nous attarder enfin plus longuement sur le diagnostic expérimental, et faire un dernier point rapide sur le diagnostic différentiel.

IV.1. Diagnostic épidémiologique

Si les ehrlichioses ont souvent été considérées comme des maladies rares, en particulier aux Etats-Unis, l'amélioration des méthodes diagnostiques et de meilleures connaissances de ces maladies ont permis d'augmenter considérablement leur diagnostic dans diverses régions du globe. L'ehrlichiose monocyttaire à *E. canis* est une des maladies infectieuses les plus répandues chez le chien dans certains états des Etats-Unis ! [53]

IV.1.1. Incidence saisonnière

Ces maladies étant à priori exclusivement vectorielle, l'incidence clinique saisonnière est liée à la **présence des différents vecteurs**. Il faut toutefois garder en mémoire la possibilité de **formes latentes** pour certaines affections (phases chroniques et sub-cliniques) et **le maintien de cycles parallèles** faisant intervenir différents hôtes intermédiaires ou réservoirs.

L'ehrlichiose monocyttaire aiguë semble plus fréquente durant les **mois d'été**, de mai à octobre dans notre hémisphère [69, 77] mais des cas sont décrits toute l'année [89]. Comme le souligne Cohn, le diagnostic est établi principalement lors des phases chroniques de la maladie, qui peuvent s'étaler toute l'année ; il n'y a donc **pas réellement d'incidence saisonnière** relevée dans les études rétrospectives publiées [3].

Aux Etats-Unis, il semble que les cas d'ehrlichioses granulocytaires dues à *E. ewingii* soient nettement majoritaires au printemps et en été, alors que curieusement, les formes dues à *A. phagocytophilum* seraient davantage observées en automne [3 , 184].

En Europe, la séroprévalence des ehrlichioses granulocytaires du bétail augmente progressivement lors des périodes de pâture au printemps et diminue avec le retour en stabulation au début de l'automne, ce qui est lié à l'exposition au vecteur *Ixodes sp* [1 , 44]. Il existe toutefois peu de données chez le chien dans l'ancien continent ; Egenvall et coll. rapportent des cas européens canins entre juillet et octobre [179].

IV.1.2. Répartition géographique

Le Tableau 4 fait le point sur la répartition des ehrlichioses à travers le Monde et sur leurs différents vecteurs. **Seule *E. canis* et *A. platys* sont considérées aujourd'hui comme ubiquitaires**, les autres semblant avoir des localisations géographiques plus limitées ; toutefois, les ehrlichioses granulocytaires dues à *A. phagocytophilum* sont de plus en plus rapportées dans de nombreux pays à travers le Monde, principalement chez l'Homme [11 , 232].

Les Etats-Unis abritent l'ensemble des principales espèces atteignant le chien, avec toutefois des répartitions géographiques différentes. L'EG due à *Ehrlichia ewingii* n'a à ce jour été décrites qu'aux Etats-Unis, et l'ADN identifié sur des rongeurs en Corée [1 , 38].

En Europe, les infections les plus rapportées chez le chien sont l'ehrlichiose monocytaire, l'infection par *A. platys* et les ehrlichioses granulocytaires, due à *A. phagocytophilum* ou peut être à une autre *Ehrlichia* non encore identifiée. Il existerait en effet une certaine diversité génétique dans les isolats d'*A. phagocytophilum* testés. Toutefois, dans les différentes études menées, les sondes n'étaient pas identiques et les longueurs d'ADN analysées étaient variables [1 , 194].

L'EMC est principalement décrite dans le Sud de la France, la Grèce, l'Espagne, le Portugal, l'Italie et l'Allemagne [1]. Récemment, une équipe britannique a dressé des cartes européennes concernant la répartition de ces foyers d'ehrlichiose monocytaire [103]. Cet outil très intéressant, bien qu'incomplet, permet de donner une idée quant à la répartition de cette maladie en Europe. Ces foyers et les cas rapportés d'ehrlichiose monocytaire remontent bien plus au nord que les cas de dirofilariose. Même s'il est probable que la plupart soient des cas importés, notamment en Allemagne et en Grande-Bretagne, la présence ubiquitaire de *Rhipicephalus sanguineus* entre le 50^{ème} degré de latitude nord et le 35^{ème} degré de latitude sud pourrait permettre l'installation de micro-foyers endémiques dans ces régions tempérées [104].

Tableau 3 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET VECTEURS DES EHRLICHIOSES DU CHIEN (d'après [1 , 2 , 57, 83 , 103 , 161 , 167 , 194 , 216 , 225 , 226])

Espèce	Distribution Géographique	Vecteurs naturels	Remarques
<i>E. canis</i>	Ubiquitaire, principalement régions tropicales et subtropicales.	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Possibilité de cas importés ou de foyers endémiques isolés hors de ces zones [103].
<i>E. chaffeensis</i>	Etats-Unis (Etats du Sud).	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Ixodes scapularis</i> , <i>Amblyomma testudinarium</i> et <i>Haemaphysalis yeni</i> [225], <i>Hemaphysalis hystricis</i> [167].	Description d'une souche génétiquement proche au Vietnam [167]. DéTECTÉE sur des tiques en Chine [225]. Existence possible en Afrique du Sud [226]
<i>E. ewingii</i>	Etats-Unis (Etats du Sud et dans la partie sud du Mideast dont le Missouri).	<i>A. americanum</i> , <i>Otobius megnini</i> , <i>Ixodes sp. ?</i> , <i>D. variabilis</i> et <i>R. sanguineus</i> [184]	Décrite au Nord dans l'Etat de New-York récemment [184]. Isolée dans un camp militaire américain en Corée[155].
<i>A. phagocytophilum</i>	Etats-Unis (Nord-Est, partie Nord du Midwest, Californie), Europe, Afrique, Asie.	<i>Ixodes spp.</i>	Répartition probablement mondiale, avec des variations génétiques ; répartition liée à celle de <i>Borrelia burgdorferi</i> [1 , 194].
<i>A. platys</i>	Ubiquitaire Etats-Unis (Sud-Est), Europe (Sud), Amérique du Sud, Asie.	<i>R. sanguineus</i> , <i>Dermacentor auratus</i> [167] ?	Seule ehrlichiose australienne détectée [161].
<i>N. risticii</i> et <i>N. risticii</i> var. <i>atypicalis</i>	Etats-Unis, Canada, Europe.	Trématodes [57]	Description du variant <i>atypicalis</i> infectant le chien uniquement aux Etats-Unis [216]
<i>N. helminthoeca</i>	Etats-Unis (Côte Ouest)	Trématode : <i>Nanophyetus salmonicola</i>	

Les EG canines, ou "fièvres à tiques" du chien, ont été rapportées dans plusieurs pays d'Europe comme l'Ecosse [178], la Suisse [180], la Suède [179] ou la France [1 , 177]. Mais d'autres pays européens, comme le Pays de Galles, l'Angleterre, la Grèce, la Norvège, l'Espagne ou l'Italie, ont rapporté l'existence de cet agent pathogène, soit par l'intermédiaire de cas humains, soit détecté dans des tiques du genre *Ixodes* par PCR [1 , 217]. Dans les pays scandinaves, où elle sévit depuis 1988, la maladie est devenue courante chez les chiens et les chats [233].

Les ehrlichioses sévissent généralement de façon **endémique** et la répartition est liée au vecteur ; mais il semble également, au moins expérimentalement, que les *Ehrlichieae* puissent s'adapter à d'autres vecteurs [167]. Les réservoirs potentiels sont variables également et beaucoup sont encore hypothétiques ; l'adaptation à de nouvelles espèces permettrait aussi l'expansion géographique de ces maladies. Pour *E. canis*, on pense toujours que les chiens infectés de façon chronique, les formes imaginaires de *R. sanguineus*, et les Canidés sauvages sont les seuls réservoirs de la maladie. Toutefois, l'ADN d'*E. canis* a pu être détecté par PCR sur des petits rongeurs [38]. Ceci expliquerait en partie l'expansion de certaines formes d'ehrlichioses, aux Etats-Unis mais aussi en Europe. Une meilleure connaissance des différents vecteurs et de leur répartition géographique permettra une meilleure approche diagnostique des ehrlichioses [45 , 104].

IV.1.3. Facteurs de prédispositions

Comme nous l'avons déjà vu dans la seconde partie, il semble que le **Berger allemand** soit particulièrement sensible à l'ehrlichiose monocyttaire, expérimentalement comme naturellement [83]. Dans une étude rétrospective menée sur 100 cas à l'Université de Jérusalem, 28 % des chiens atteints étaient des Bergers Allemands, alors que cette race ne représente que 14 % des chiens présentés en consultation [77].

La présence d'une **maladie intercurrente** ou d'un **traitement immunosuppresseur** pourrait également favoriser l'apparition d'une maladie parfois latente, ou simplement favoriser une infection par une souche peu virulente [53 , 91, 97 , 184].

Les ehrlichioses du chien sont donc des maladies mondialement reconnues, sévissant de façon endémique et potentiellement anadémique, durant toute l'année avec un pic durant les mois d'été et d'automne.

IV.2. Synthèse clinique et biologique

L'infection des cellules sanguines et épithéliales par une *Ehrlichia* peut entraîner une ehrlichiose clinique aiguë, habituellement caractérisée par une atteinte systémique, avec un passage fébrile généralement accompagné de signes hématologiques, d'une polyadénomégalie, et d'une élévation des enzymes hépatiques plasmatiques (PAL, AIAT) [2]. Toutefois, la diversité des ehrlichioses entraîne une **variété de signes cliniques et biologiques** qui rendent cette définition incomplète. Comme le soulignait déjà Woody en préambule de sa revue de 1991 [53], "***At the outset, it is important to stress that the only consistent finding among cases of ehrlichiosis is inconsistency***", c'est à dire qu'il faut bien garder en mémoire dès le départ que le seul signe constant parmi les cas d'ehrlichioses est la diversité !

De plus, l'existence d'infections multiples peut rendre difficiles l'interprétation des signes cliniques et l'attribution de ces signes à tel ou tel agent pathogène [3, 83].

IV.2.1. Éléments symptomatiques

Les ehrlichioses du chien sont, comme nous l'avons vu à travers les différentes monographies, des **affections multi-systémiques** dues à plusieurs agents pathogènes. Au cours de l'évolution des différentes phases d'ehrlichioses cliniques, on peut noter la présence, isolée ou simultanée, de plusieurs **signes cliniques non spécifiques** : abattement, apathie, anorexie, perte de poids modérée... [3, 83]

Les signes les plus évocateurs ne sont par contre pas toujours présents au moment de la consultation et du diagnostic, et l'anamnèse n'en fait pas toujours mention : il s'agit en particulier des **tendances hémorragiques**, de la **fièvre**, de la **polyadénomégalie** et de **l'infestation par les tiques** [53].

La présence de saignements est très variable, et liée à une thrombopénie, une thrombopathie ou une vascularite. Il s'agit généralement d'**ecchymoses** ou de **pétéchies**, et de saignements muqueux, principalement sous forme d'**épistaxis** (voir Tableau 4) [83]. Mais dans une étude rétrospective de Woody et coll. en 1985, seuls 15 % des chiens présentent des pétéchies, alors que 37 % ont une numération plaquettaire inférieure à $40000/\text{mm}^3$; et certains chiens qui ont une numération plaquettaire inférieure à $10000/\text{mm}^3$ ne présentent aucun signes de saignements [234]. Au contraire, Frank et Breitschwerdt observent une thrombopénie inférieure à $40000/\text{mm}^3$ pour seulement un tiers des chiens avec épistaxis [89].

Le Tableau 4 ci-dessous fait la moyenne des signes cliniques observés à partir de 5 études rétrospectives d'ehrlichiose monocyttaire naturelle. On remarque que les 4 signes évocateurs mentionnés plus haut sont présents dans moins de 50 % des cas en moyenne, et rarement dans plus de 50% des cas dans chaque étude prise individuellement.

Les 4 principaux signes cliniques mis en évidence dans ce tableau correspondent bien à des signes non-spécifiques : abattement, perte de poids, anorexie et pâleur des muqueuses.

L'étude rétrospective de Frank et Breitschwerdt portant sur 62 chiens donne des résultats sensiblement différents, avec des signes non-spécifiques pour 25 à 35 % des cas, alors que les tendances hémorragiques constituent le signe le plus constant avec 60% des cas. Notons toutefois que le seul critère d'inclusion était une sérologie positive (IFI) avec un titre de 20, dans une zone d'endémie importante, et qu'il existe des biais et imprécisions intrinsèques à ce type d'études, liés à la récolte des résultats, à l'échelonnement dans le temps (1986 à 1994) et à l'approche clinique des différents praticiens [89].

L'halètement est constaté dans 58 % des cas pour une seule étude portant sur 100 chiens [77]. Il peut être lié au stress, à la chaleur, à une hyperthermie, mais également à des **lésions pulmonaires**, parfois mises en évidence sur des clichés radiographiques, sous forme d'opacités interstitielles et péri-bronchiques [234, 235], et également observés dans quelques cas sérieux d'ehrlichioses humaines [83].

Le caractère multi-systémique peut être mis en évidence à travers d'autres **affections inflammatoires** : uvéites, polymyosites, troubles nerveux centraux (affections vestibulaires, ataxie, affections cérébelleuses, convulsions...) ou encore polyarthrites. Ces

deux dernières manifestations cliniques semblent davantage liées, chez le chien, aux ehrlichioses granulocytaires (*A. phagocytophilum* et *E. ewingii*) [83]. Une insuffisance rénale peut également survenir chez le chien [3, 83].

La description de la Pancytopénie Tropicale Canine qui a sévit durant la guerre de Corée puis du Viêt Nam semble aujourd'hui très rare aux Etats-Unis, et ce tableau clinique très marqué ne fait plus référence en terme d'ehrlichiose [3].

L'étude rétrospective de Goodman et coll. a permis de faire le point sur les différentes présentations cliniques de l'**ehrlichiose due à *E. ewingii***, même si elle ne porte que sur 15 chiens. Les signes les plus souvent observés sont l'**hyperthermie** et les **boiteries** (53 %). Il est intéressant de constater que dans cette étude, que 5 chiens sur les 8 présentant une boiterie avaient d'abord été référés en neurologie, avec des signes de douleurs cervicales, de déficits proprioceptifs, d'augmentation du polygone de sustentation, d'ataxie ou de paraparésie. Il semble après étude que ces anomalies de posture et de réponse aux placés proprioceptifs aient été liés pour 4 chiens sur 5 à la douleur articulaire ! Les auteurs concluent donc que l'ehrlichiose à *E. ewingii* devrait, en zone d'endémie, faire partie du diagnostic différentiel des boiteries et des fièvres d'origine inexpiquée, notamment chez les jeunes animaux [184].

Outre la présentation très caractéristique de la « maladie de l'empoisonnement au saumon » due à *N. helminthoeca*, que tout vétérinaire de la côte Ouest américaine se doit de bien connaître (cf. III.3.2. Empoisonnement au saumon), les signes d'appel pour une ehrlichiose peuvent être globalement considérés comme non spécifiques : **léthargie, perte de poids modérée, anorexie et hyperthermie**, avec ou sans **tendances hémorragiques** [53, 83].

Certains auteurs continuent de différencier les phases aiguës et chroniques de l'ehrlichiose monocyttaire [3], ce qui dans la pratique ne semble pas toujours réaliste, ni se retrouver dans les autres ehrlichioses [83, 89]. Parmi les nombreux signes cliniques associés aux ehrlichioses, **il semble que les signes locomoteurs soient davantage liés aux ehrlichioses granulocytaires** [3, 83].

Tableau 4 : Synthèse des principaux signes cliniques observés au cours de 5 études rétrospectives de cas d'ehrlichiose monocytaire canine naturelle (D'après [77, 143 , 145 , 234 , 236])

Etude	Etude 1	Etude 2	Etude 3	Etude 4	Etude 5		
Référence bibliographique	[143]	[145]	[234]	[236]	[77]		
Nombre de chiens (N)	30	56	135	27	100		
Signes cliniques	POURCENTAGE D'ANIMAUX					TOTAL	N
Abattement	53 %	59 %	70 %	85 %	78 %	70 %	348
Perte de poids	60 %	39 %	70 %	44 %	NR	59 %	248
Halètement	NR	NR	NR	NR	58 %	58 %	100
Anorexie	60 %	27 %	64 %	67 %	57 %	56 %	348
Muqueuses pâles	NR	NR	NR	NR	45 %	45 %	100
Tendances hémorragiques*	50 %	34 %	53 %	37 %	42 %	45 %	348
Fièvre	50 %	20 %	48 %	37 %	57 %	45 %	348
Polyadénomégalie	13 %	27 %	36 %	NR	75 %	44 %	321
Infestation par les tiques	40 %	NR	39 %	11 %	NR	35 %	192
Splénomégalie	7 %	14 %	20 %	37 %	20 %	19 %	348
Déshydratation	NR	NR	NR	NR	16 %	16 %	100
Souffle cardiaque	NR	NR	10 %	44 %	NR	16 %	162
Vomissements	NR	9 %	17 %	11 %	13 %	14 %	318
Décharge oculaire	NR	NR	NR	NR	11 %	11 %	100
Ataxie	7 %	NR	14 %	7 %	5 %	10 %	292
Diarrhée	NR	NR	NR	NR	9 %	9 %	100
Boiterie	NR	NR	NR	NR	7 %	7 %	100
Ictère	NR	NR	NR	NR	6 %	6 %	100
Décharge nasale	NR	NR	NR	NR	3 %	3 %	100
Troubles nerveux	NR	NR	NR	NR	1 %	1 %	100

* Tendances hémorragiques : épistaxis dans 31 % des cas (sur 292) ; NR = Non rapporté

IV.2.2. Signes biologiques

IV.2.2.1. Signes hématologiques

La **leucopénie**, les **anémies régénératives ou centrales**, mais surtout la **thrombopénie** sont actuellement les critères de choix dans le dépistage des ehrlichioses. Mais ces signes ne sont pas systématiques, et l'incidence de la thrombopénie lors de cas d'ehrlichioses naturelles rapportés dans la littérature a pu être surestimée, du fait de l'utilisation fréquente de ce critère de suspicion par les cliniciens, en accord avec les données expérimentales. Certains praticiens écarteraient en effet probablement l'hypothèse diagnostic d'ehrlichiose sur un chien présentant une numération plaquettaire normale [11, 53, 83].

Certains chiens atteints d'ehrlichiose monocyttaire peuvent présenter une numération plaquettaire normale, avec toutefois des signes cliniques d'hémorragies liées à un défaut d'hémostase primaire, notamment en phase aiguë de la maladie. La réalisation d'un temps de saignement à la muqueuse buccale ou gingivale permet dans ce cas de détecter d'éventuelles thrombopathies ou anomalies vasculaires [120].

L'infection par *E. ewingii* se manifeste par une thrombopénie dans de très nombreux cas, accompagnée ou non d'autres signes généralement modérés : neutrophilie, anémie, leucocytose, lymphopénie et monocytose [184].

Lors d'infections par *A. platys*, il est possible d'observer un caractère cyclique, avec une numération plaquettaire normale suivi d'un effondrement de cette valeur ($< 10000/\text{mm}^3$). Toutefois, lors de passage à la chronicité, les phases de thrombopénie sévère semblent persister [1, 189].

Le Tableau 5 ci-dessous fait la moyenne des signes hématologiques observés à partir de des 5 études rétrospectives d'EMC naturelle présentées précédemment.

Tableau 5 : Synthèse des principaux signes hématologiques observés au cours de 5 études rétrospectives de cas d'ehrlichiose monocytaire canine naturelle (D'après [77, 143 , 145 , 234 , 236])

Etude	Etude 1	Etude 2	Etude 3	Etude 4	Etude 5		
Référence bibliographique	[143]	[145]	[234]	[236]	[77]		
Nombre de chiens (N)	30	56	135	27	100		
Signes hématologiques	POURCENTAGE D'ANIMAUX					TOTAL	N
Thrombopénie	100 %	64 %	92 %	84 %	73 %	83 %	348
Anémie centrale	NR	85 %	80 %	60 %	NR	79 %	248
Anémies	90 %	72 %	68 %	81 %	73 %	73 %	100
Lymphopénie	NR	41 %	44 %	48 %	52 %	46 %	348
Eosinopénie	NR	27 %	51 %	63 %	8 %	34 %	100
Leucopénie	53 %	25 %	30 %	22 %	35 %	32 %	348
Neutropénie	47 %	18 %	24 %	19 %	24 %	25 %	348
Pancytopénie	NR	13 %	19 %	NR	30 %	22 %	321
Anémie régénérative	NR	15 %	20 %	40 %	NR	21 %	192
Leucocytose	17 %	14 %	21 %	30 %	13 %	18 %	348
Neutrophilie	NR	14 %	20 %	37 %	13 %	18 %	100
Monocytose	23 %	9 %	20 %	0 %	14 %	15 %	162
Lymphocytose	NR	7 %	11 %	11 %	2 %	7 %	318
Basophilie	NR	5 %	10 %	0 %	NR	7 %	100
Eosinophilie	NR	9 %	2 %	4 %	NR	4 %	292
Détection de morulae sur frottis sanguin	17 %	0 %	2 %	NR	NR	4 %	100

NR = Non rapporté

Les signes dominants sont donc bien les signes attendus expérimentalement, avec une **thrombopénie** et une **anémie généralement centrale et modérée**. Lymphopénie, anémies centrales sévères ou pancytopénie sont généralement rencontrées lors de formes chroniques sévères [3, 83].

IV.2.2.2. Signes biochimiques

Comme le montre le Tableau 6 ci-dessous, les signes les plus fréquemment rencontrés lors d'ehrlichiose monocyttaire sont une **hyperglobulinémie** et une **hypoalbuminémie**, associées ou non à une hyperprotéinémie. Seule l'étude de Kuehn fait mention du rapport albumine/globulines, qui est bas ($< 0,22$) dans 50 % des cas (50 chiens testés) [145].

Le dosage des protéines sériques et surtout l'**électrophorèse** permettent donc d'orienter le diagnostic d'ehrlichiose. On observe généralement une **gammopathie polyclonale**, ainsi que d'une élévation des fractions bêta et alpha-2. L'observation d'un pic monoclonal en gamma peut exister lors de cas d'ehrlichiose monocyttaire chronique, et même s'il est très rare, il faudra faire la différence avec un myélome multiple par exemple [3, 53, 83].

Aussi, lors d'ehrlichiose monocyttaire aiguë, le pic bêta-gamma peut apparaître tardivement [120], alors que la phase fébrile est déjà passée. On ne devrait donc pas écarter l'hypothèse d'une ehrlichiose aiguë sur la base de l'électrophorèse des protéines sériques.

Une **élévation des concentrations plasmatiques des transaminases et phosphatases alcalines hépatiques** est également très fréquente (environ 40 % des cas).

On note enfin dans un peu moins d'un tiers des cas des signes d'**insuffisance rénale** (élévation de l'urémie et de la créatininémie), et d'autres signes peuvent coexister, comme une élévation de la bilirubinémie (13 %), une hypoglycémie, ou encore une baisse des protéines sériques et des globulines en particulier.

Tableau 6 : Synthèse des principaux signes biochimiques observés au cours de 5 études rétrospectives de cas d'ehrlichiose monocytaire canine naturelle (D'après [77, 143 , 145 , 234 , 236])

Etude	Etude 1	Etude 2	Etude 3	Etude 4	Etude 5		
Référence bibliographique	[143]	[145]	[234]	[236]	[77]		
Nombre de chiens (N)	30	56	135	27	100		
Signes biochimiques	POURCENTAGE D'ANIMAUX					TOTAL	N
Hyperglobulinémie	NR	46 %	39 %	23 %	57 %	45 %	309
Élévation AIAT	31 %	36 %	48 %	44 %	36 %	42 %	334
Hypoalbuminémie	NR	36 %	46 %	42 %	29 %	39 %	309
Élévation PAI	0 %	39 %	28 %	58 %	56 %	38 %	335
Élévation LDH	NR	NR	NR	NR	38 %	38 %	100
Hyperprotéinémie	37 %	38 %	30 %	NR	18 %	28 %	313
Élévation urémie	NR	20 %	20 %	19 %	35 %	25 %	309
Élévation créatininémie	NR	30 %	5 %	19 %	29 %	17 %	308
Élévation bilirubinémie	19 %	NR	10 %	15 %	NR	13 %	179
Hypoglycémie	NR	10 %	NR	NR	NR	10 %	49
Hypoprotéinémie	NR	5 %	4 %	NR	NR	4 %	183
Hypoglobulinémie	NR	7 %	1 %	4 %	NR	3 %	209
Hyperalbuminémie	NR	2 %	NR	NR	NR	2 %	50

NR = Non rapporté

Les chiens atteints d'ehrlichioses présentent donc principalement des signes cliniques variés et non spécifiques, dont les plus caractéristiques sont les tendances hémorragiques et les polyarthrites. La thrombopénie, l'anémie, principalement centrale modérée, l'élévation des enzymes hépatiques (AIAT, PAI, LDH) sériques, l'hyperglobulinémie, avec une gammapathie polyclonale et l'hypoalbuminémie constituent les critères biologiques d'appels les plus importants d'une ehrlichiose dans cette espèce [3, 53 , 83].

IV.3. Diagnostic expérimental

IV.3.1. Diagnostic direct

IV.3.1.1. Infection expérimentale et mise en culture cellulaire

Il est possible de mettre l'agent infectieux en culture à partir du « *buffy coat* » d'un patient que l'on injecte à une espèce sensible, ou dans un milieu cellulaire spécifique (cf. I.2.2.2. Cultures bactériennes). Pour *E. canis*, la mise en culture prend 14 à 34 jours. L'avantage de la méthode est sa grande sensibilité : elle peut détecter *E. canis* dans le sang de l'animal dès le deuxième jour de l'infection et même en début de traitement [237].

Mais cette méthode est aujourd'hui considérée uniquement comme un **outil de recherche**, du fait de son coût et du délai de réponse variant de 3 jours à plus de deux mois [83].

IV.3.1.2. Frottis sanguins

Un examen attentif des frottis sanguins colorés au May-Grümwald et Giemsa (MGG) permet de rechercher des inclusions cytoplasmiques ; certains auteurs utilisent aussi la coloration rapide Diff-Quick® [5], la technique de Wright ou une simple coloration au Giemsa [1 , 217].

IV.3.1.2.1. Morphologie et cellules infectées

Les inclusions d'*Ehrlichiae* se présentent sous plusieurs formes. La forme classique de **morula** déjà décrite dans la première partie est la plus caractéristique. Elle se présente sous la forme d'une **inclusion de 2,5 à 4 µm de diamètre**, de **couleur mauve** et en **forme de mûre**, qui lui a valu son nom [5].

Toutefois, la morphologie des inclusions peut varier, notamment entre les cas d'infections naturelles et expérimentales, ou après la mise en culture [238]. Ainsi, il est possible d'observer des morulas très condensées ou encore des formes plus lâches. Elias avait également décrit plusieurs formes d'inclusions associées à l'ehrlichiose monocyttaire, dont une forme d'inclusions lymphocytaires violacées, de 0,2 à 0,4 µm de diamètre, qu'il ne faut pas confondre avec des inclusions de lymphocytes T CD8+ ou de cellules NK (cf.

IV.3.1.2.3. Spécificité). La deuxième forme décrite consistait en des inclusions plus larges (1,2 à 1,5 µm de diamètre) rondes à ovales en grappes irrégulières, qui pourraient correspondre à des morulas en cours de formation [239].

Les espèces autres que *E. canis* peuvent également donner des inclusions différentes [8]. Comme nous l'avons déjà vu dans la première partie, chaque espèce d'*Ehrlichia* parasite des cellules sanguines qui lui sont propres, comme le rappelle le Tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Cellules cibles et morphologie des différentes espèces d'*Ehrlichieae* atteignant le chien (d'après [5 , 8 , 179 , 215 , 216])

Espèces	Cellule(s) cible(s)	Types d'inclusions
<i>E. canis</i>	Lymphocytes	Morulas
	Monocytes - Macrophages	Inclusions lilas (corps élémentaires)
<i>A. platys</i>	Plaquettes	Morulas
<i>A. phagocytophilum</i>	Granulocytes (neutrophiles)	Morulas de 1,5 à 6 µm
<i>E. ewingii</i>	Granulocytes neutrophiles	Morulas
<i>E. chaffeensis</i>	Lymphocytes	Morulas
	Monocytes - Macrophages	
<i>N. helminthoeca</i>	Macrophages (noeuds lymphatiques uniquement)	Nombreuses petites inclusions granuleuses fortement basophiles
<i>N. risticii var. atypicalis</i>	Monocytes	-

Contrairement aux taux élevés de neutrophiles infectés (> 90 %) observés chez le mouton en phase fébrile d'ehrlichiose granulocytaire [1], l'infection expérimentale du chien par *A. phagocytophilum* se résume à des taux bien plus limités, de l'ordre de **0,5 à 3% de granulocytes infectés**, neutrophiles et éosinophiles [240]. Madewell rapporta précédemment des valeurs sensiblement identiques (4%) dans deux observations d'ehrlichiose granulocytaire naturelle [174] et des valeurs similaires sont rapportées pour les infections à *E.ewingii* [183].

La recherche de morulas d'*Ehrlichiae* monocytaires (*E. canis*, *N. risticii*) et d'*A. platys* s'avère d'autant plus difficile et parfois infructueuse, du fait du nombre limité de cellules parasitées, de la faible représentation de ces lignées cellulaires (monocytes,

lymphocytes), et de la présentation fréquente des chiens en phase chronique de la maladie au moment du diagnostic, avec une parasitémie limitée [3].

Il faudra rechercher *E. canis* aussi bien dans les lymphocytes que dans les monocytes, contrairement aux descriptions initiales ; cette observation est probablement liée à la plus grande quantité de lymphocytes présents sur les frottis [238]. Ainsi, certains auteurs ont relevé plus de 90 % des inclusions dans les lymphocytes [239].

Dans une étude de Mylonakis portant sur 50 chiens en phase aiguë d'ehrlichiose monocyttaire, les frottis réalisés sur sang périphérique n'ont permis d'apercevoir que 1 à 3 morulas par lame (médiane à 2) après examen de 1000 champs en immersion, ce qui représente tout de même une heure de travail pour un œil averti [238] !

IV.3.1.2.2. Sensibilité

Outre le faible nombre de cellules parasitées sur les frottis, la fugacité des bactériémies ou leur cyclicité, souvent rapportée lors d'infections par *A. platys* notamment, laissent à cet examen direct une **faible sensibilité** [53]. La **probabilité d'observer des inclusions en phase fébrile de la maladie est toutefois plus importante** [239].

La sensibilité a surtout été rapportée pour *E. canis*. Une seule étude rétrospective menée sur 15 chiens rapporte une sensibilité proche de 50 % pour la détection d'*E. ewingii* sur frottis sanguin [184].

Le Tableau 5 ci-dessus rapporte une moyenne de 4 % de cas diagnostiqués d'ehrlichiose monocyttaire pour lesquels des morulas ont été détectées sur frottis sanguin. Dans l'étude rétrospective de Kuehn, portant sur 56 chiens, aucun frottis n'a été détecté positif [145]. Ceci s'explique probablement par le fait que les animaux recrutés dans cette étude l'étaient sur la base unique d'une sérologie positive pour *E. canis*, avec un titre faible (> 20) ; il s'agissaient d'animaux tout venant, et non pas uniquement d'animaux présentés avec des signes cliniques attribuables à une ehrlichiose. Parmi ces animaux, il est donc probable que certains étaient en phase chronique ou subclinique de la maladie, avec donc une bactériémie faible ou inexistante, ou encore avait été en contact avec *E. canis* et traités quelques mois auparavant. La possibilité de faux positifs en sérologie est également à prendre en compte (cf. IV.3.2. Diagnostic indirect : Sérologies).

Une étude récente sur 50 chiens avec un diagnostic avéré d'ehrlichiose monocyttaire aiguë (PCR positive, IFI positive, réponse au traitement et absence d'autres inclusions sanguines) a permis de mettre en évidence une **sensibilité de 8 % seulement sur des frottis de sang périphérique** [238], ce qui confirme encore l'intérêt limité de cette méthode déjà rapporté par les autres auteurs, même lors d'ehrlichioses aiguës [143, 145].

Dans cette même étude l'incubation d'un prélèvement sanguin (10 mL) à 37°C durant 48 à 96 heures n'a pas permis d'augmenter nettement la sensibilité de l'examen (14,6 %) mais permet par contre d'observer beaucoup plus de morulas sur les frottis (de 1 à 52, médiane à 10) [238].

Seule la technique de **leucoconcentration** (cf. encadré 1) permet d'augmenter nettement la sensibilité de l'examen. Une double centrifugation permet de récupérer la couche leucoplaquettaire ("buffy-coat") qui sera étalée sur lame avec précaution (cf.IV.3.1.2.3. Spécificité).

Ainsi, Mylonakis et coll. rapportent une sensibilité de 66 % pour cet examen [238], alors que Sainz ne rapportait que 20,4 % [241]. Là encore, les critères d'inclusions, et notamment la phase de la maladie, expliquent certainement cette différence.

Encadré 1 : Technique de leucoconcentration ou « buffy coat » (d'après [238]).

- **Prélever 5 mL de sang sur EDTA.**
- **Centrifuger 5 minutes à 3 000 tours par minute.**
- **Enlever le surnageant.**
- **Récupérer la couche intermédiaire (leucocytaire) dans un tube à hématocrite.**
- **Centrifuger 3 minutes à 12 000 tours par minute.**
- **Scier le tube au niveau de la couche intermédiaire.**
- **Étaler la couche intermédiaire sur une lame porte objet.**
- **Colorer au MGG.**

IV.3.1.2.3. Spécificité

Cette étape diagnostique est simple et peu coûteuse, mais il est important de bien connaître la morphologie des différentes inclusions, ainsi que les cellules parasitées, afin de ne pas poser de diagnostic par excès.

Les morulas d'*Ehrlichiae* peuvent en effet être facilement **confondues avec d'autres images en microscopie optique** [238, 239, 242 , 243, 244] :

- Les images d'**érythrophagocytose**, notamment observées lors de babésiose canine.
- Des **plaquettes phagocytées**, ou simplement en superposition avec un leucocyte.
- Des **granules lymphocytaires**, qui prennent eux une coloration plutôt azurophile. Il s'agit de petites inclusions observées dans les grands lymphocytes (lymphocytes T cytotoxiques ou cellules NK). Ces cellules peuvent toutefois être présentes en grande quantité lors d'affections chroniques comme l'ehrlichiose ou la brucellose, et peuvent alors constituer un **signe d'appel**. Mais elles existent également lors de certaines leucémies [83].
- Des **corps lymphoglandulaires**, qui sont des fragments de cytoplasme provenant de cellules fragiles (lymphocytes surtout) écrasées lors de l'étalement. Ces inclusions libres présentent une forme ronde, discrète et fortement basophile, à ne pas confondre avec une morula libre. C'est pourquoi les étalement doivent être réalisés avec douceur, en particulier avec le « buffy coat ».
- Des **corps de Lentz-Sinigaglia**, inclusions cytoplasmiques azurophiles liées à l'infection par le virus de la maladie de Carré.
- Du **matériel nucléaire phagocyté**.

Bien qu'il s'agisse d'une méthode séduisante, car facile et peu onéreuse, l'observation des frottis sanguins présente des pièges diagnostiques par défaut ou par excès, et demande un temps d'examen important.

*Une bonne connaissance de ses limites ainsi qu'un œil aguerri sont nécessaires pour éviter ces erreurs. L'examen du « buffy coat » semble la méthode de choix, même si elle ne permet pas de détecter toutes les ehrlichioses, comme par exemple *N. helminthoeca* ou *E. ruminantium*. Elle peut également être utilisée avec d'autres méthodes cytologiques que nous allons décrire.*

*D'autre part, le frottis sanguin conserve tout son intérêt pour mettre en évidence d'autres agents infectieux responsables de tableaux cliniques superposables et transmis également par les tiques (*Babesia*, *Hepatozoon*...).*

IV.3.1.3. Ponctions et biopsies

La recherche d'inclusions dans les cellules lors de **ponctions d'organes** ou de **calques de pièces de biopsies** (rate, nœud lymphatique...) est une technique peu employée en pratique ; sa sensibilité n'a donc pas été largement évaluée. Elle a été utilisée dans la confirmation du diagnostic de l'EMC et de l'empoisonnement au saumon [5, 53].

IV.3.1.3.1. Ponction de nœuds (ganglions) lymphatiques

L'étude récente de Mylonakis est la première à rapporter la sensibilité de cet examen sur des cas d'ehrlichiose monocyttaire aiguë avérés [238]. L'examen de frottis de ponctions ganglionnaires permet de détecter des morulas avec une sensibilité de 60,9 %. **Cette méthode couplée à l'examen du « buffy coat » donne une sensibilité globale élevée, de 74 %.**

Il est intéressant aussi dans cette étude de constater que la sensibilité de cette seule méthode est nettement plus importante (74 %) pour les chiens présentant une polyadénomégalie, en ayant soin toutefois de **prélever sur l'ensemble des nœuds lymphatiques hypertrophiés** ! Lors de ces ponctions ganglionnaires, on trouvera les morulas d'*E. canis* principalement dans les lymphocytes et en milieu extra-cellulaire ; là

encore, la confusion avec des corps lymphoglandulaires, notamment lors de lymphomes, est à redouter.

Les inclusions de *N. helminthoeca* peuvent être recherchées lors de la phase aiguë de la maladie sur des ponctions de nœuds lymphatiques également. On observe une diminution des populations de petits lymphocytes et un envahissement par des macrophages, contenant pour la plupart de très nombreux petits « granules » fortement basophiles [5, 244].

IV.3.1.3.2. Ponction de moelle osseuse hématopoïétique (MOH)

Cette méthode diagnostique a également été évaluée lors d'ehrlichiose monocyttaire. En phase aiguë de la maladie, elle permet de détecter des morulas denses aussi bien dans les lymphocytes que dans les monocytes, avec toutefois une **sensibilité faible** et environ 2 morulas par lame en moyenne [238].

En phase aiguë de la maladie, on peut également observer des **signes indirects** comme une MOH hypercellulaire, une **mégacaryocytose** ou encore une **plasmocytose en îlots** [141].

Lors de la phase chronique sévère, c'est l'**aplasie médullaire** qui prédomine [121]. Aucune observation de morulas n'a été faite durant cette phase à notre connaissance.

IV.3.1.3.3. Ponctions articulaires

Des ponctions articulaires peuvent être pratiquées lors de suspicion d'infections par une *Ehrlichia* granulocytaire avec un **tableau clinique de polyarthrite**.

Goodman et coll. ont publié la première étude rétrospective clinique de cas d'ehrlichioses à *E. ewingii*, et proposent que l'ehrlichiose fasse partie du diagnostic différentiel des boiteries. **Les articulations douloureuses ne sont pas toujours hypertrophiées**, mais l'arthrocentèse révèle une neutrophilie importante, avec l'observation de morulas dans 100 % des cas dans cette étude [184]. Là encore, les morulas n'étaient pas présentes dans toutes les articulations et il est important de faire un **maximum de prélèvement sur plusieurs sites**.

IV.3.1.4. Diagnostic nécropsique

Si les lésions nécropsiques ne sont généralement pas spécifiques, le diagnostic peut aussi être confirmé par des calques du poumon pour *E. canis*, ou par des calques, ou des immunofluorescences sur des ganglions lymphatiques pour *N. helminthoeca* [5].

Chez l'homme, des techniques d'hybridation *in situ* ont été mises au point [245], mais leur utilisation courante chez le chien dans un avenir proche semble peu probable.

IV.3.1.5. PCR

La PCR est une **méthode directe très sensible et très spécifique qui permet de détecter les ehrlichioses aiguës** [83]. Son fonctionnement de base peut être visualisé de façon très didactique sur le site de l'E.N.S. de Lyon : <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/>.

D'après les différentes études en PCR menées par Suksawat, la sensibilité de cette méthode serait de 30 ng, 100 pg et 1 ng d'ADN respectivement pour *A. phagocytophila*, *E. chaffeensis* et *N. risticii* [15]. La technique mise au point par Gusa et coll. sur une partie de la séquence *p28* d'*E. ewingii* permet de détecter des quantités de l'ordre de 38 copies du gène seulement [246].

La première étude expérimentale remonte à 1994 sur *E. canis* ; elle a permis de montrer que cette méthode était presque aussi sensible que la mise en culture, et qu'elle avait l'avantage de donner un résultat bien plus rapidement. On pouvait ainsi détecter des doses de l'ordre de 20 pg d'ADN [237].

Une technique d'hybridation chimio-luminescente (PCR-CH) a permis d'augmenter d'un facteur 1000 la sensibilité de cette méthode, et de dépasser largement la sensibilité de la culture cellulaire. On peut ainsi détecter moins de 30 fg d'ADN en l'espace de 2 jours seulement [247]. La méthode n'a malheureusement pas été évaluée pour *E. ewingii* et *E. sennetsu*.

Wen et coll. ont mis au point une technique de nested-PCR basée sur la détection d'une portion de l'ADN 16S d'*E. canis*. Ce test semble également très spécifique et a une sensibilité de l'ordre de 0,2 pg d'ADN [248]. Elle a permis de détecter l'ADN chez des chiens infectés expérimentalement dès le 4^{ème} jour, avant même la séroconversion.

Toujours dans le but d'augmenter la sensibilité de ces tests, une équipe a utilisé des sondes biotinylées, détectables par des anticorps anti-biotine marqués d'un complexe enzymatique. Ce test ne permet de détecter l'ADN d'*E. canis* qu'à partir de 7 jours chez des chiens infectés expérimentalement, mais il apparaît aussi sensible que le test développé par Wen et coll., moins onéreux, et donne une réponse plus rapides, sous 2 jours seulement [249]. Il a permis notamment de détecter l'ADN d'*E. canis* chez deux chiens atteints d'ehrlichiose naturelle, positifs en IFI, et pour lesquels la PCR standard avait donné une réponse négative.

Enfin, d'autres techniques ont été mises au point plus récemment, comme des techniques de PCR en temps réel, qui donne des résultats quantitatifs [250] [251]

On peut donc détecter d'infimes fractions d'ADN d'*E. canis* à partir de 4 à 10 jours environ après l'infection expérimentale selon les méthodes décrites ci-dessus, même si certains auteurs rapportent des délais plus longs [125]. Mais, **le délai de détection après l'infection dans les conditions naturelles reste inconnu** [83].

Les autres limites de cette méthodes pour l'usage clinique courant tiennent à sa **technicité**, qui nécessite l'**envoi des échantillons à un laboratoire spécialisé**. En outre, il s'agit d'une **méthode onéreuse**, surtout si l'on multiplie les espèces recherchées [83]. De plus, la PCR ne distingue pas les organismes vivants ou morts, mais uniquement des fragments d'ADN, et n'apporte donc pas la preuve d'une infection active [3].

La multiplication des tests proposés, en l'**absence de standardisation**, et parfois de contrôle qualité au sein des laboratoires, peut entraîner des résultats faussement positifs ou faussement négatifs [83 , 252]. La possibilité de reconnaissances non spécifiques existe en effet, comme cela a été montré entre *A. platys* et *A. phagocytophilum* [253], ou encore même entre *A. phagocytophilum* et *E. chaffeensis* [252]. L'utilisation de sondes plus spécifiques et les recherches sur d'autres gènes que les gènes de l'ARNr 16S devraient permettre d'augmenter la spécificité de cette méthode. Des séquences ont déjà été décodées pour *A. platys*, permettant de proposer une PCR sur les gènes *groESL* et *glt-A* [254]. En tout état de cause ; **la validité des tests PCR devraient être systématiquement évalués afin de se munir d'un outil performant** [252].

Chez les chiens non traités, une PCR positive confirmera l'infection par une *Ehrlichia sp.*, alors que la sérologie ne fera que détecter un contact antérieur. Toutefois, **on ne sait pas actuellement quel tissu est le plus adapté pour détecter une ehrlichiose**. En routine, on utilisera plus volontiers le **sang sur EDTA**, bien que les cellules de MOH ou encore les cellules spléniques obtenues par ponction soient des tissus potentiels [83, 97]. Les PCR menées sur le liquide céphalo-rachidien (LCR) lors de troubles nerveux, sur les liquides de ponctions synoviales lors de polyarthrites, ou encore sur l'humeur aqueuse lors d'uvéites, pourraient s'avérer intéressantes également [83].

L'**utilisation de la PCR en conjonction avec la sérologie** devrait permettre le diagnostic biologique initial des ehrlichioses aiguës. Les PCR peuvent être menées en utilisant des sondes multi-espèces dans un premier temps, reconnaissant toutes les *Ehrlichia spp.*, puis de cibler spécifiquement une ou plusieurs espèces avec des **sondes spécifiques** [3, 83].

La PCR pourra enfin s'avérer intéressante comme outil pour le **suivi du traitement**. Le consensus actuel veut que la PCR soit utilisée deux semaines après l'arrêt du traitement afin d'évaluer l'efficacité et l'élimination de l'agent pathogène [83].

Il est toutefois important de garder en mémoire la possibilité de **ré-infestation** et peut être de **séquestration** d'*Ehrlichieae* dans des organes profonds comme la rate [97]. Toutefois, il n'est pas certain que l'ADN détecté dans la rate corresponde effectivement à des organismes vivants et potentiellement actifs, et, en l'absence de données sur cette retraite éventuelle des *Ehrlichieae* dans les macrophages spléniques, on admet généralement que la guérison clinique et biologique progressive correspond à une élimination définitive de l'organisme [83].

IV.3.1.6. Détection de l'antigène soluble

La détection de l'antigène d'*E. canis* dans le plasma a été réalisée par une méthode ELISA de type sandwich sur 6 Beagles suite à une infection expérimentale [96]. Mais chez le chien, contrairement aux observations réalisées sur le cheval infecté par *N. risticii* et par *A. phagocytophila (E. equi)*, l'apparition de la bactériémie s'est révélée plus tardive (15 jours après inoculation) que l'apparition des signes cliniques et de la séroconversion, et elle s'est révélée très inconstante en temps (1 à 10 jours) et en intensité (titres très variables). L'auteur conclue donc que sa valeur diagnostique est restreinte, et que

l'antigénémie est plus certainement liée à une réplication massive du parasite dans le système réticulo-endothélial, avec un relargage des antigènes lié à une cytotoxicité directe contre les cellules infectées.

Parmi les méthodes de diagnostic direct, la lecture des frottis sanguins et de ponctions de ganglions restent sans doute encore aujourd'hui les méthodes les plus utilisées en pratique « canine ».

La PCR est une méthode en plein essor qui devrait prendre une importance grandissante, notamment pour la discrimination des différentes ehrlichioses et la détection d'infections multiples.

Il faut toutefois garder en mémoire que la sensibilité de ces méthodes dépendent de la phase de la maladie et du tissu utilisé, et qu'elles devraient être réservées le plus souvent à la détection de cas aigus.

IV.3.2. Diagnostic indirect : Sérologies

Comme nous l'avons vu dans la première partie, il existe une grande communauté antigénique au sein des différents génogroupes, et parfois entre les membres de ces différents groupes. Toutes les *Ehrlichieae* entraînent potentiellement une réponse immunitaire de l'hôte, même accidentel, avec une production d'anticorps plus ou moins importante et persistante. Nous avons également pu noter la sensibilité du chien à diverses *Ehrlichieae*, naturellement ou expérimentalement.

Après avoir présenté les différents tests sérologiques disponibles, nous évoquerons les possibilités de réactions croisées, puis nous terminerons par une discussion générale sur l'interprétation des tests sérologiques.

IV.3.2.1. Différents tests sérologiques disponibles

IV.3.2.1.1. Immunofluorescence indirecte

L'IFI consiste à faire réagir le sérum du patient après différentes dilutions sur une préparation de cellules infectées ; la fixation est révélée par un conjugué marqué par un fluorochrome qui émet une fluorescence sous un microscope adapté.

Cette technique a longtemps été utilisée pour le diagnostic des ehrlichioses et fait toujours référence, compte-tenu de sa grande sensibilité et de sa bonne spécificité. Elle est disponible pour *A. platys* [152], *E. canis* [24, 255], *A. phagocytophilum* [29, 256], *E. ruminantium* [257], *E. chaffeensis* [258, 259], *N. helminthoeca* [26] et *N. risticii* [260].

E. ewingii n'étant pas disponible en culture cellulaire, on ne dispose pas de technique IFI pour cette espèce à ce jour ; mais étant donné la réactivité croisée avec *E. canis*, il est possible d'utiliser ce test diagnostique sur cet antigène [130, 261].

L'IFI est donc un examen très sensible, et dont la précision dépend du lecteur. Cette technique demande donc une certaine expérience et un équipement de laboratoire important. Elle permet de réaliser assez rapidement un examen sur plusieurs échantillons à la fois.

IV.3.2.1.2. ELISA et Dot-blot

Les méthodes ELISA et Dot-Blot permettent également d'obtenir des **résultats quantitatifs**, et de tester éventuellement plusieurs échantillons simultanément. Il existe des techniques en phase liquide, essentiellement utilisées en laboratoires, mais des méthodes en phase solide ont été commercialisées et sont disponibles pour le clinicien.

Cette méthode a essentiellement été développée au départ pour la recherche sur *N. risticii* chez le cheval, lors de fièvres du Potomac [262], et pour *E. ruminantium* [5]. L'utilisation d'un ELISA IgM est très utile pour détecter la maladie précocement, mais ne permet pas de détecter des infections chroniques ou des réinfections.

Un test ELISA utilisant la protéine recombinante p44, très spécifique d'*A. phagocytophilum*, a été développé et évalué [203]. Ce test a été comparé à l'IFI et au WB, et présente une sensibilité et une spécificité globales identiques. En particulier, les sérums

de chiens infectés par *E. canis* ne donnent pas de réaction positive, alors qu'une réaction croisée en IFI existe pour les cas d'infections expérimentales persistantes (voir IV.3.2.2.1. Réactions sérologiques croisées) [204].

Alleman et coll. ont développé une méthode ELISA à partir d'une protéine MAP-2 recombinante d'*E. canis* [263]. Ce test semble très sensible et spécifique, et particulièrement intéressant dans des populations à forte prévalence [264].

Les **Dot-Blot** ont l'avantage d'une **lecture plus rapide** et **plus facile** que l'IFI, et nécessitant moins d'équipement et d'expérience. Une méthode développée en 1994 a permis d'obtenir des résultats proches de ceux de l'IFI pour *E. canis* [265].

Ces outils, aussi qualifiés de « Dot-ELISA », ont été développés par des laboratoires pour la mise à disposition directe des praticiens vétérinaires. Ils peuvent pour certains donner des résultats quantitatifs ou semi-quantitatifs, qui permettent un suivi sérologique du patient et l'observation d'une éventuelle séro-conversion.

Le **Snap®Combo Canine Diro/Ehrli** (IDEXX Laboratories Inc., USA) permet la détection d'anticorps anti-*E. canis* et des antigènes de *Dirofilaria immitis*. L'antigène utilisé est dans ce cas des cellules infectées par *E. canis* (souche Jake) [264]. Existente également le **Snap®3Dx assay** (IDEXX Laboratories Inc., USA), qui utilise deux protéines recombinantes p30 et p30-1, et le test **Immunocomb®** (Biorgral, Israël), qui utilise un isolat purifié d'*E. canis* comme source d'antigène.

Ces deux derniers tests ont été évalués dans une étude portant sur 67 chiens suspects d'ehrlichiose ou infectés expérimentalement [79]. Comparativement à la technique de référence qu'est l'IFI, il n'existe pas de différence statistique significative sur les résultats qualitatifs pour ces deux tests. Ils permettent donc une détection des anticorps anti-*E. canis* avec une sensibilité de 71 % et 86 %, et une spécificité de 100 % et de 98 % pour le Snap®3Dx assay et pour le test Immunocomb® respectivement. La faible sensibilité apparente de ces tests est largement améliorée en ne considérant que les sérums ayant un titre supérieur ou égal à 320 en IFI. Ainsi, considérant qu'un chien atteint d'ehrlichiose monocyttaire clinique voit son titre augmenter largement en quelques jours en cours d'infection, il est prudent de répéter un test négatif sur une suspicion clinique une à deux semaines après le premier.

IV.3.2.1.3. Western-Blot

Cette méthode d'immuno-empreinte est au moins aussi sensible que l'IFI ; elle a l'avantage également d'être indépendante de l'expérience du lecteur, mais demande un équipement de laboratoire important [237]. Le principe consiste à dénaturer l'antigène et à faire migrer les peptides obtenus sur un gel ; après l'électrophorèse, les peptides sont transférés sur une membrane de nitrocellulose, qui est mise à incuber avec le sérum dilué du patient. Le marquage se fait généralement par une réaction colorée sur le conjugué.

Cette méthode permet une analyse plus fine de la réponse immunitaire de l'hôte. Son interprétation devra tenir compte de la possibilité de **variations mineures entre les différentes souches au sein d'une même espèce** [34 , 37].

L'utilisation de protéines recombinantes devrait permettre de rendre cette technique plus abordable et plus précise. Une technique utilisant la protéine P30 recombinante d'*E. canis*, exprimée par *E. coli*, a été proposée pour augmenter la sensibilité, la spécificité et la facilité du diagnostic [2 , 7]. Une technique identique a également été mise en place récemment par MacBride et coll. sur P43 d'*E. canis* [266]. Cette dernière ne semble pas croiser avec *E. chaffeensis* (Cf. IV.3.2.2.1. Réactions sérologiques croisées).

IV.3.2.1.4. Tests immuno-chromatographiques

Ces tests "au chevet du malade" sont basés sur le principe de l'immunomigration sur membrane ; ils sont **faciles d'emploi** et permettent une **lecture instantanée**. Ils ne donnent toutefois que des **résultats qualitatifs**. L'antigène utilisé peut être soit une protéine purifiée, soit des isolats obtenus à partir de cultures cellulaires.

A notre connaissance, ils n'ont été développés que pour le diagnostic de l'ehrlichiose monocyttaire canine à *E. canis* en France et à l'étranger. Le **Speed®EHRLI** du laboratoire BVT et le **WITNESS®Ehrlichia** de SYNBIOTICS seront étudiés dans la partie expérimentale de ce travail. D'autres tests existent comme le **Dip-S-Ticks** (PanBio InDx Inc., Baltimore, Md) qui donne des résultats semi-quantitatifs [264].

IV.3.2.2. Sérologies ehrlichioses : interprétation

IV.3.2.2.1. Réactions sérologiques croisées

Les réactions croisées entre les *Ehrlichieae* peuvent poser des problèmes d'interprétation, notamment pour l'IFI, les tests de type ELISA ou les tests immuno-chromatographiques. Ces tests isolés ne permettent pas forcément de faire la différence entre des infections par des espèces différentes et pour des infections dues à plusieurs *Ehrlichieae* [261]. Egalement, certains antigènes, comme les protéines HSP60, sont conservés à travers tous les groupes, et croisent également potentiellement avec les *Rickettsiaceae* [2].

Le Tableau 10 résume les principales réactions croisées observées entre les *Ehrlichieae* du chien.

E. canis et *E. chaffeensis* partagent un complexe antigénique très proche, de 28-30 kDa (cf. I.2.3. Principaux antigènes) [2]. Il est donc difficile voire impossible de distinguer une infection par l'une ou par l'autre bactérie par l'IFI [91] ; mais Rikihisa suggère qu'un double Western-Blot, mené sur les deux antigènes, devrait permettre de faire la différence. Toutefois, la distinction sera plus difficile sur des infections chroniques, car les polypeptides communs sont plus nombreux [186]. Il restera également impossible de distinguer une infection concomitante par les deux agents pathogènes [91].

Une méthode de WB mise au point par MacBride et coll. et utilisant une protéine recombinante P43 d'*E. canis* semble ne pas réagir avec *E. chaffeensis* [266].

Les sérums de chiens infectés par *E. ewingii* réagissent plus ou moins en IFI avec *E. canis* ou *E. chaffeensis* ; la différence sérologique entre les trois infections pourra donc être délicate pour les cas chroniques. En WB, les sérums de chiens infectés de façon chronique par *E. ewingii* marquent de façon importante, et similaire à des sérums de chiens atteints d'ehrlichiose monocyttaire, les principaux antigènes d'*E. canis*, alors que les sérums de chiens récemment infectés, en début de séroconversion, ne réagissent que faiblement et uniquement sur des polypeptides de haut poids moléculaires [130, 186]. Il n'est donc pas certain que l'utilisation du WB puisse différencier avec certitude ces deux infections, notamment en phase chronique, comme cela avait été proposé [130]. De même, en phase aiguë de la maladie, cette confirmation sérologique ou une confirmation moléculaire pourraient s'avérer utile [83].

E. ruminantium ou un agent très proche semble pouvoir infecter le chien [86]. Comme nous l'avons vu, il existe une forte similitude entre les antigènes de surface majeurs P28, P30 et MAP1, et les protéines de 27-28 kDa d'*E. canis* semblent partager des épitopes communs avec les antigènes de 25 et 32 kDa d'*E. ruminantium* [267]. L'interprétation sérologique, même après WB, permet donc difficilement de différencier les infections par *E. ruminantium*, *E. canis* ou les deux [268], même s'il semble que les sérums de chiens infectés par *E. ruminantium* réagissent plus faiblement sur l'antigène hétérologue que sur l'antigène homologue, en IFI comme en WB [267]. Là encore, un double test sérologique pourrait permettre de faire le diagnostic, sans toutefois écarter l'hypothèse d'une infection multiple dans les zones endémiques, notamment en Afrique Tropicale, ou pour les chiens y ayant séjourné [268].

E. canis, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *N. risticii* et *N. sennetsu* réagissent également parfois en IFI avec *A. phagocytophilum*, mais il semble que ces réactions n'aient lieu qu'à des titres faibles et pour des antigènes très conservés au sein des *Ehrlichieae* [205].

Dans une étude expérimentale, les chiens infectés par *E. canis* développent, mais tardivement (à partir de J55), des anticorps réagissant en IFI avec *A. phagocytophilum* [114]. On a noté également le cas d'un chien naturellement infecté par *A. phagocytophilum*, qui a montré une séroconversion pour *E. canis* [91], bien que ce cas ne soit pas observé par d'autres auteurs [201].

Dumler a remarqué, dans une étude sérologique par immuno-empreinte, une réaction faible des sérums anti-*E. canis* et anti-*E. chaffeensis* pour des polypeptides de 40 et de 44 kDa d'*A. phagocytophilum* [205]. Cette observation, et le marquage d'autres polypeptides, a également été faite dans une autre étude [201], avec les souches *Florida* et *Jake* d'*E. canis*. Les polypeptides de 42-44 kDa constituent des antigènes de surface majeurs codés par les multigènes *mSP4* (*p44*), qui partagent un faible niveau de similitude avec les multigènes *p30* d'*E. canis* [2]. Dumler et coll. suggèrent que les réactions croisées observées soient dues à l'utilisation de **sérums hyperimmuns**, comme dans une étude précédente de Nyindo et coll., qui a montré de fortes similitudes entre *E. canis*, *E. equi* (*A. phagocytophilum*), *E. (Neorickettsia) risticii* et *E. (Neorickettsia) sennetsu* en WB [135].

Suksawat et coll. proposent donc que la différenciation sérologique de l'une ou l'autre infection soit faite sur la base d'une association entre WB et IFI pour les deux espèces [201].

En 1986, Logan rapporte également des réactions croisées entre *E. equi* (*A. phagocytophilum*) et *E. (Cowdria) ruminantium* [269], alors qu'aucune relation entre ces deux agents pathogènes n'est rapportée par d'autres auteurs [270].

L'agent de la thrombopénie cyclique infectieuse ne réagit apparemment pas en IFI avec *E. canis*, et les chiens atteints d'ehrlichiose monocyttaire ne semblent pas détecter d'antigènes d'*A. platys* [152].

Les réactions sérologiques prévisibles avec *A. phagocytophilum*, qui appartient au même génogroupe, sont peu documentées. Une seule observation a été faite sur des inclusions plaquettaires chez un chien au Japon, qui réagissaient en IFI avec un sérum anti-*A. phagocytophilum* [159].

Des sérologies positives pour *Borrelia burgdorferi* ont été mises en évidence chez des patients humains atteints d'HGE, ce qui rend cette hypothèse envisageable chez le chien également, mais n'a pas été confirmée à priori [1]. Même si l'inoculation à des souris n'a pas permis d'observer de réactions croisées avec *B. burgdorferi* [68], il semble qu'une protéine de 80 kDa d'*A. phagocytophilum* puisse toutefois réagir avec des sérums de patients humains atteints de maladie de Lyme, puisqu'elle présente une forte similitude avec la protéines HSP70 de *B. burgdorferi* [210].

Des réactions sérologiques croisées sont fréquentes entre *E. canis* et *N. helminthoeca*, l'agent de l'empoisonnement au saumon chez le chien, et également entre les autres membres du groupe des *Neorickettsia sp.* [5]. Les antigènes concernés sont encore une fois des polypeptides de haut poids moléculaire, de 64 kDa et 78-80 kDa [271].

Le fait que les sérums de chiens infectés par *N. helminthoeca* réagissent aussi fortement sur l'antigène d'*E. canis* que sur l'antigène homologue pose un problème pour le diagnostic sérologique de ces deux maladies dans les régions où elles sont endémiques. Toutefois, les sérums de chiens infectés par *E. canis* semblent réagir avec des titres plus faibles en IFI sur *N. helminthoeca* que sur l'antigène homologue ; une double sérologie ou le WB sur *E. canis* devraient donc permettre de trancher [271].

Il faut également garder en mémoire la susceptibilité du chien à *N. risticii* ou à une *Neorickettsia sp.* assez proche [216]. Cette espèce ne semble pas réagir en IFI avec *E.*

canis [83], bien qu'en WB, on ait pu montrer une réactivité croisée avec des sérums anti-*N. risticii* et anti-*N. sennetsu* pour des protéines de haut poids moléculaires (70 kDa) [141].

Des réactions croisées ont été également rapportées entre les *Neorickettsia spp.* et *A. phagocytophilum* pour des sérums hyperimmuns, et principalement dirigées contre une protéine de 25 kDa [135]. Ces réactions n'ont pas été rapportées par d'autres auteurs à notre connaissance.

Tableau 8 : Réactions sérologiques croisées entre les différentes espèces d'*Ehrlichiae* atteignant le chien (d'après [91 , 130 , 135 , 141, 152 , 159 , 204 , 205 , 261 , 267])

Source de l'infection	Réactions sérologiques croisées* avec l'antigène							
	<i>E. canis</i>	<i>E. chaffeensis</i>	<i>E. ruminantium</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>A. platys</i>	<i>N. helminthoeca</i>	<i>N. risticii</i>	<i>N. sennetsu</i>
<i>E. canis</i>	+++		+++	- /++\$	-	+ /++	- /+\$	- /+\$
<i>E. chaffeensis</i>	++ /+++	+++		- /++\$				
<i>E. ewingii</i>	- /+++	- /+++		- /++\$				
<i>E. ruminantium</i>	+ /++		+++					
<i>A. phagocytophilum</i>	- /++\$			+++	++ /+++		-	- /++&
<i>A. platys</i>	-				+++			
<i>N. helminthoeca</i>	++ /+++					+++	+ /+++	+ /+++
<i>N. risticii</i>	- /+&			- /++\$&		+ /++	+++	++ /+++

* - : Absence de réaction ; + : réaction faible ; ++ : réaction modérée ; +++ : réaction forte.

\$ Sérums hyperimmuns essentiellement, sur des antigènes fortement conservés au sein des *Ehrlichieae* [91, 135 , 204 , 205]

& Sérums hyperimmuns ; espèces différentes (chien, cheval et souris) [135 , 141]

Groupe 1 Groupe 2 Groupe 3

IV.3.2.2.2. Interprétation des résultats sérologiques

L'IFI reste encore la méthode la plus utilisée pour le diagnostic des ehrlichioses sur le plan international ; il existe toutefois des variations concernant les méthodes et souches utilisées notamment, mais aussi sur les « seuils de positivité ». Il est donc important de faire appel à des laboratoires spécialisés et de faire préciser le titre au laboratoire, qui ne répond parfois qu'avec un résultat qualitatif [83 , 272].

Des faux-positifs en IFI sur *E. canis* ont été rapportés pour des titres faibles (< 80) lors de certaines infections bactériennes [273]. Ainsi, Waner et coll. proposent un « seuil de positivité » au delà de 64 [261]. **Un titre supérieur ou égal à 80 est maintenant largement admis comme « seuil de positivité »** ; les titres inférieurs, ou les résultats négatifs, devraient faire l'objet d'un **suivi sérologique** après 2 ou 3 semaines, ou être confirmés directement par d'autres méthodes diagnostiques. Il faut également garder en mémoire que **le titre sérologique n'est pas en rapport avec la sévérité ou l'avancement de la maladie** [83].

Pour *A. platys*, l'IFI semble spécifique et détecte la maladie de façon précoce, 7 à 17 jours après l'infection, au moment des premiers signes cliniques. Une IFI positive détectera des chiens exposés à *A. platys*, qui présenteront des titres généralement élevés de l'ordre de 5120. Il est probable que ce titre persiste dans la chronicité, mais l'absence de séroconversion indiquerait une maladie non-active. Un titre inférieur à 200 est à remettre en doute selon certains auteurs [53].

Dans de nombreux cas d'ehrlichiose, l'existence d'IgG permet d'établir un **contact passé avec la bactérie**, mais pas d'établir une infection en cours ou la relation avec les signes cliniques observés. En effet, un chien en phase subclinique d'ehrlichiose monocyttaire pourra présenter les signes d'une maladie intercurrente, sans rapport avec une ehrlichiose, et avoir un titre élevé en anticorps anti-*E. canis* [261]. C'est également le cas pour des chiens préalablement traités pour une ehrlichiose monocyttaire, et dont le titre en anticorps peut rester élevé pendant plusieurs mois [89]. Là encore, dans tous ces cas, répéter la sérologie après une à deux semaines devrait permettre de trancher. D'après la cinétique des Ac lors d'ehrlichiose monocyttaire canine aiguë expérimentale, la confirmation sérologique du diagnostic devrait faire apparaître soit la présence d'IgM

spécifiques de façon très précoce, soit une **séroconversion avec une hausse du titre de 4 dilutions** [5].

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, toutes les autres infections du chien par les *Ehrlichieae*, sauf par *A. platys*, peuvent potentiellement donner des résultats positifs en IFI pour *E. canis*. La possibilité de **réactions croisées** doit donc évidemment être prise en compte dans l'interprétation des résultats sérologiques. L'utilisation d'un panel de sérologies en IFI, voire du WB, pourrait permettre de proposer un diagnostic étiologique [261], avec toutefois les limites décrites pour chaque cas dans le chapitre précédent (IV.3.2.2.1. Réactions sérologiques croisées). **Il n'existe pas à priori aujourd'hui de standards mondialement admis pour interpréter ces sérologies combinées.**

Ces méthodes sérologiques combinées sont par ailleurs souvent incapables de différencier des **infections concomitantes** dues à plusieurs agents pathogènes, ou à donner un diagnostic étiologique précis en zone d'endémie chez des **chiens séropositifs pour plusieurs ehrlichioses**. Les infections par les différentes *Ehrlichieae* peuvent en effet, comme nous l'avons illustré, être très difficiles à distinguer aussi bien du point de vue clinique et biologique que sérologique, et la participation de divers autres agents pathogènes rend d'autant plus difficile l'interprétation de ces données sérologiques [88, 274]. Un chien qui ne répond pas au traitement après un tel diagnostic d'ehrlichiose devra aussi être testé pour d'autres agents pathogènes, tels que *Babesia canis*, *Bartonella vinsonii* ou encore *Rickettsia rickettsii* [83].

La sérologie peut également s'avérer être une méthode tardive, compte tenu de la **lenteur de la séroconversion chez certains chiens**, notamment dans le cas de l'ehrlichiose monocytaire aiguë ou d'ehrlichiose granulocytaire à *E. ewingii*. Dans l'étude rétrospective de Goodman et coll., seuls la moitié des chiens infectés de façon aiguë par *E. ewingii* étaient séropositifs pour *E. canis* [184]; ceci est certainement lié à la lenteur de la séroconversion pour les antigènes hétérologues, déjà évoquée au chapitre précédent.

Une forte suspicion clinique d'infection aiguë ne doit donc pas être écartée sur la base d'une sérologie négative, notamment pour des antigènes hétérologues [83].

Woody rapporte un cas d'ehrlichiose monocytaire aiguë chez un jeune chiot présentant des signes cliniques et biologiques précédemment décrits (présence de tiques brunes, hyperthermie, polyadénomégalie, thrombopénie, anémie) pour lequel la séroconversion

s'est faite plusieurs jours après l'apparition de ces signes et malgré la mise en place du traitement [53]. Face à un cas clinique suspect en zone d'endémie, l'auteur propose donc de ne pas attendre le résultat de la sérologie pour instaurer un traitement, et de répéter la sérologie pour observer la séroconversion et confirmer le diagnostic.

La sérologie a d'ailleurs été très utilisée pour le suivi du traitement des ehrlichioses [261]. Toutefois, il est difficile d'évaluer précisément le statut de l'animal, puisque le titre en anticorps peut mettre des années à devenir négatif, notamment pour *E.canis*, et l'on ne sait pas à ce jour si cette observation est liée à une persistance de l'infection ou à une production d'anticorps par des mécanismes indépendants de la bactérie, mais durables [83]. De plus, un chien continuellement exposé en zone endémique ne saurait être suivi aisément par des sérologies.

Parmi les différentes méthodes sérologiques évoquées au chapitre précédent, l'IFI reste la méthode de référence. Elle requiert toutefois un équipement important et coûteux, des manipulations nombreuses, ainsi qu'un opérateur compétent [261].

Les techniques plus accessibles aux cliniciens de type Dot-ELISA ou immunomigration ont été évaluées et donnent généralement des résultats très satisfaisants par rapport à l'IFI ou au WB [79, 134, 203, 257, 265, 266]. L'utilisation de protéines recombinantes pourraient également permettre d'augmenter la spécificité de ces tests en évitant les réactions croisées avec des antigènes moins spécifiques de type HSP [2, 7].

Ces tests ne permettent toutefois pas d'éviter les réactions croisées liées à des épitopes communs ou des protéines proches comme nous l'avons vu, notamment au sein d'un même génogroupe. De plus, il ne donnent que des résultats semi-quantitatifs qui ne permettent pas un suivi aisé des titres en Ac ou de l'activité de l'infection [261].

Avec l'utilisation de protéines recombinantes, qui devraient permettre d'améliorer encore la spécificité des tests sérologiques, les différentes situations que nous avons évoquées indiquent que la sérologie devrait être utilisée pour la confirmation du diagnostic, avec la prudence qui s'impose, mais qu'elle ne pourra pas conduire à un diagnostic étiologique. Elle devrait donc idéalement être complétée par l'utilisation des nouveaux outils de biologie moléculaire, notamment pour le suivi du traitement, comme le présente le Tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Interprétation de l'utilisation combinée de la sérologie et de la PCR pour le diagnostic des ehrlichioses (d'après [3, 83 , 261]).

	Séropositif	Séronégatif
PCR Positive	Ehrlichiose aiguë (signes cliniques) Ehrlichiose subclinique (absence de signes) Echec du traitement – ré-infection	Infection récente (ou pancytopénie ?) Faux positif (réaction croisée, contamination) => séroconversion ?
PCR négative	Guérison clinique (post-traitement) Ehrlichiose subclinique Faux positif – Réaction croisée => séroconversion ?	Absence d'ehrlichiose Autre espèce

IV.4. Diagnostic différentiel

Compte-tenu des multiples présentations cliniques des ehrlichioses, le diagnostic différentiel s'avère très complexe et il est illusoire de vouloir être exhaustif.

Cliniquement, les ehrlichioses pourront principalement s'inscrire, comme nous l'avons vu, dans le diagnostic différentiel des maladies cachectisantes chroniques, des fièvres inexplicables, des polyarthrites ou encore des syndromes hémorragiques, avec principalement épistaxis et pétéchies. Mais l'existence de présentations cliniques variées (uvéites, troubles neuro-musculaires, oedèmes...) doit laisser un champ plus large dans un contexte épidémiologique et biologique favorable.

Du point de vue biologique, on notera surtout l'importance du diagnostic différentiel des thrombopénies (principalement les thrombopénies à médiation immune), des anémies ou encore des affections avec une hyperglobulinémie persistante (maladies infectieuses ou parasitaires chroniques, certaines néoplasies...).

Il est particulièrement important de considérer les affections ou syndromes suivants [129 , 275 , 276] :

- les **autres maladies à tiques**, notamment si l'animal est porteur de tiques au moment du diagnostic ou provient d'un milieu très exposé : **Babésioses** (piroplasmose), **Hépatozoonose**, **Bartonelloses**, autres **Rickettsioses**, **Maladie de Lyme**... Comme nous avons pu le voir, des infections dues à plusieurs agents sont possibles et ont été largement décrites [15 , 88 , 91 , 101, 183 , 228 , 229].
- La **Leishmaniose** dans les zones endémiques (Bassin méditerranéen),
- les **thrombopénies** cliniques ou non (cf.Encadré 2) ; il faudra garder en mémoire la possibilité de thrombopénies à médiation immune secondaires dans les rickettsioses et en particulier les formes décrites lors d'infections par *E. canis* [106],
- les **arthrites et polyarthrites**, particulièrement les formes non-érosives, dont le **Lupus érythémateux systémique**,
- les autres **maladies cachectisantes d'évolution chronique** : néoplasies, maladies auto-immunes, infections chroniques...

Le Tableau 10 montre les différentes maladies qui nous semblent importantes à garder en mémoire lors du diagnostic différentiel d'ehrlichioses, avec leurs principales données cliniques et biologiques, et les éléments du diagnostic.

Encadré 2 : Thrombopénies chez les carnivores domestiques (D'après [276 , 277])

Maladies	Etiologie	Diagnostic
Thrombopénies à médiation immune		
Primaires	<i>Idiopathiques</i> Lupus érythémateux systémique Syndrome d'Evans	Mégacaryocytose médullaire Anémie hémolytique, AcAN Diagnostic thérapeutique
Secondaires	Infectieuses (dont Ehrlichioses) Médicamenteuses* Vaccinales** Néoplasiques Allo-immunisation	Mégacaryocytose médullaire Diagnostic étiologique <i>Diagnostic d'exclusion</i> Diagnostic thérapeutique
Thrombopénies de consommation	CIVD : infectieuse, mécanique, toxique, néoplasique, inflammatoire, etc... Affections thrombogènes Microangiopathies, vascularites (Ehrlichiose) (Hémorragies)	Troubles de la coagulation Diagnostic étiologique
Thrombopénies centrales	Infectieuses (dont Ehrlichioses) Toxiques / Médicamenteuses Néoplasiques Idiopathiques	Hypoplasie ou Aplasie médullaire
Thrombopénie liée à une séquestration plaquettaire	Splénique : inflammatoire (dont Ehrlichiose), congestive, infiltrative (néoplasique) Hépatique ou vasculaire : Néoplasique Mixte (hépatique et pulmonaire) : Endotoxémie	Splénomégalie Hépatomégalie Imagerie médicale

* dont céphalosporines, sels d'or, oestrogènes et sulfamides chez le chien. Potentiellement : autres anti-infectieux, anti-inflammatoires, anti-convulsivants, médicaments à visée cardiovasculaire...

** vaccin contre la maladie de Carré

Tableau 10 : **DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DES EHRlichIOSES : PRINCIPALES AFFECTIONS** (D'après [129 , 275 , 276])

Maladie	Etiologie / Epidémiologie	Dominantes Cliniques et Biologiques	Diagnostic Différentiel
Thrombopénies à médiation immune	Auto-immun primaires ou secondaires : médicamenteuse, vaccinale, infectieuse, néoplasique, etc...Cf. Encadré 2 Cockers, caniches... Femelles d'âge moyen	Inconstants : Anorexie, abattement, épistaxis, hémochésie, hémorragies muqueuses ; parfois troubles neurologiques ou oculaires secondaires aux saignements. Thrombopénie !	Sérologies ehrlichioses Hyperthermie et adénomégalie rares NB : Parfois liée à une ehrlichiose => Traitement des deux affections possible en attendant le diagnostic.
Lupus érythémateux systémique	Auto-immuns (Auto-Ac) Familial (Bergers Allemands...) lié au CMH de classe DLA-A7 Chiens adultes (6 ans)	Signes généraux (baisse de forme, hyperthermie, anorexie, amaigrissement, fonte musculaire) et multi-organiques (neuro- musculaires, locomoteurs, cutanés, rénaux, hématologiques, cardio-vasculaires...) Apparition intermittente, variable en intensité.	Epidémiologie Evolution clinique Dosage des AcAN Sérologies ehrlichioses
Myélome multiple	Néoplasie : Rare Chiens de races pures (Bergers allemands) Age moyen à âgé.	Symptômes liés à une lyse osseuse ou à une HSV : Abattement, anorexie, douleurs osseuses, boiteries, saignements, pâleur des muqueuses, amaurose, PUPD (protéinurie de Bence-Jones)...	EPS : gammopathie monoclonale (rare lors d'ehrlichiose) Radiologie (lésions focales) Cytologie (myelogramme) Sérologies ehrlichioses
Leucémie lymphoïde chronique (LLC) et Lymphomes	Néoplasies Lymphomes : diverses formes, fréquentes LLC : rares	Signes généraux +/- (apathie, anorexie, perte de poids, hyperthermie) Selon les formes : Polyadénomégalie, troubles digestifs, locomoteurs, neurologiques, ophtalmologiques ou respiratoires.	Histologie/Cytologie (MOH, NL, sang) Imagerie médicale Sérologies ehrlichiose
Brucellose	Due à <i>Brucella canis</i> (également : <i>B.melitensis, abortus</i> ou <i>suis</i>) Rares	Chiens mâles : œdème scrotal, adénopathies, uvéites, discospondylites	Sérologies Cause de l'œdème scrotal (culture) Histologie/Cytologie (NL)

Maladie	Etiologie / Epidémiologie	Dominantes Cliniques et Biologiques	Diagnostic Différentiel
Babésioses (Piroplasmose)	Dues à <i>Babesia canis</i> et <i>B. gibsoni</i> Vecteurs : Ixodidés (<i>R. sanguineus</i> , <i>Ixodes spp...</i>)	Principales : Abattement, hyperthermie, anorexie, muqueuses pâles , ictères, hémoglobinurie (anémie hémolytique) Autres : Thrombopénie, polyadénomégalie, splénomégalie	Cytologie (frottis sanguin) Sérologies NB : Co-infections possibles
Hépatozoonose	Due à <i>Hepatozoon canis</i> Vecteur : R.sanguineus Sud des USA / Bassin méditerranéen	Fièvre, anorexie, perte de poids , diarrhées sanglantes, atrophie musculaire, hépatosplénomégalie , troubles neuromusculaires.	Sérologies - Cytologie Biopsies musculaires Radiologie (réactions périostées) Absence de thrombopénie Co-infections possibles [177]
Maladie de Lyme	Due à <i>Borrelia burgdorferi</i> Vecteurs : Ixodes spp. Répartition Mondiale Animaux jeunes surtout	Polyarthrites récurrentes Inconstants : Anorexie, abattement, adénomégalie (poplités, cervicaux) Parfois : troubles cardiaques, neurologiques et rénaux	Sérologies Arthrocentèse
Fièvre pourprée des Montagnes rocheuses	Due à <i>Rickettsia rickettsii</i> Vecteurs : Dermacentor sp.- Amblyomma sp. Répartition : USA (Mississippi, Kansas, Texas, Oklahoma, Caroline Nord et Sud) Sévit de mars à octobre Jeunes chiens de race pure (Bergers Allemands)	Principales : Hyperthermie, abattement, anorexie, oedèmes cutanés, polyalgies. Thrombopénie, anémie centrale, hypoalbuminémie. Autres : polyadénomégalie, troubles hémorragiques (épistaxis, ecchymoses, pétéchiés), détresse respiratoire, troubles neurologiques et ophtalmologiques.	Epidémiologie Sérologies IFD (théorique) NB : Diagnostic sérologique tardif Co-infections possibles Traitement identique
Leishmaniose viscérale	Due à <i>Leishmania infantum</i> Liée au vecteur : le phlébotome (<i>sandfly</i>)	Anorexie, perte de poids, épistaxis, hyperthermie, splénomégalie , lésions cutanées (ulcérations...), polyadénomégalie. Thrombopénie, hyperglobulinémie, hypoalbuminémie, protéinurie. Autres : polyalgies, vomissements, méléna, signes d'IRC	Epidémiologie Sérologies Histologie/Cytologie

Hormis le cas particulier de l'infection par *N. helminthoeca*, il n'existe pas de standard pour le diagnostic des ehrlichioses, mais plutôt des degrés de certitude évalués sur des critères épidémiologiques, cliniques, hématologiques, sérologiques, et confirmés par des outils de biologie moléculaire.

Les principaux signes cliniques sont non spécifiques, avec une signification particulières des tendances hémorragiques ou des polyarthralgies, qui sont toutefois inconstantes. Les signes hématologiques (thrombopénie, anémie) et biochimiques (hyperglobulinémie) sont également précieux ; mais la confirmation se fera par l'observation d'une séroconversion, de préférence combinée au diagnostic direct, et notamment par une PCR de qualité, à partir de sang prélevé sur EDTA avant le début du traitement. On pourra pratiquer une recherche multi-espèces suivie d'une recherche spécifique orientée selon les circonstances épidémiologiques et cliniques.

L'amélioration clinique doit se faire en quelques jours après la mise en place d'un traitement à base de tétracyclines aux doses recommandées, et jusqu'à deux semaines pour les cas chroniques sévères. Passé ce délai, un échec thérapeutique doit évoquer une possible infection par d'autres agents pathogènes (*Babesia sp.*, *Bartonella sp...*), la persistance de mécanismes à médiation immune, une résistance à la molécule ou une infection chronique sévère.

Breitschwerdt et coll. insistaient déjà dans leur étude sur l'importance du diagnostic étiologique afin de mieux définir chaque maladie [91]. Le diagnostic précis des ehrlichioses devrait en effet permettre de mieux connaître chaque entité et d'affiner ainsi les critères thérapeutiques et pronostiques. Il permettra également de mieux connaître l'impact de ces maladies, notamment sur la santé humaine, et le rôle du chien dans leur épidémiologie.

V. CINQUIEME PARTIE : COMPARAISON DE TROIS KITS DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE RAPIDE DE L'EHRLICHIOSE MONOCYTAIRE CANINE

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la sérologie est une des pierres angulaires du diagnostic de l'ehrlichiose monocytaire canine. Les techniques immunologiques sont variées et plusieurs critères entrent en jeu dans le choix d'un test sérologique : valeurs intrinsèques (spécificité et sensibilité), délai de détection des anticorps après l'infection, coût de l'examen, difficulté technique, délai de réponse du laboratoire, ou encore disponibilité du test [278].

Les vétérinaires cliniciens ont à leur disposition plusieurs kits commerciaux, fondés sur différentes techniques, qui leur permettent de réaliser une sérologie rapide, au chevet du malade. Toutefois, il existe relativement peu d'études sur la fiabilité de ces tests, et tous n'ont pas été étudiés.

Notre étude expérimentale a donc pour but d'évaluer l'intérêt pour le clinicien de trois tests de diagnostic sérologique rapide de l'ehrlichiose monocytaire canine disponibles en France, afin de déterminer leur intérêt dans la démarche diagnostique de cette maladie.

V.1. Principe

Un test sérologique peut être évalué par ses valeurs intrinsèques que sont la sensibilité et la spécificité. Ces valeurs sont généralement mesurées par comparaison à un « standard diagnostic », reconnu pour sa fiabilité [278 , 279 , 280].

Depuis la mise en culture par Nyindo et Coll. [16] d'*Ehrlichia canis* dans des monocytes de chiens naturellement infectés, de nombreuses techniques de propagation ont été élaborées [21]. Elles ont permis l'étude de cet agent infectieux ainsi que l'utilisation de cultures cellulaires en tant que support d'antigène pour la détection et le titrage par immunofluorescence indirecte (IFI) d'anticorps anti-*Ehrlichia canis* [255]. Ce test sérologique est encore utilisé de nos jours et est toujours considéré comme la **méthode de référence** dans le diagnostic de l'EMC [69 , 83, 261].

Le but de notre étude est donc de comparer les résultats obtenus avec trois tests rapides, le **Speed®EHRLI** (Laboratoire BVT, France), le **SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli** (Laboratoire IDEXX) et le **WITNESS®Ehrlichia** (Laboratoire SYNBIOTICS, France), aux résultats obtenus par l'IFI. A l'issue de cette première étape, les sérums non-concordants sont testés par WB, test reconnu comme très spécifique et très sensible [261], afin de confirmer les résultats de l'IFI.

On peut ainsi déterminer un certain nombre de valeurs [280] :

- La **sensibilité** d'un test sérologique est définie comme la probabilité qu'un chien porteur d'anticorps spécifiques (« chien malade » ou séropositif) donne bien un résultat positif au test. Un test sensible donnera donc peu de résultats faussement négatifs (ou **faux négatifs, FN**).

$$\text{Sensibilité} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FN})$$

- La **spécificité** du test sérologique est la probabilité qu'un animal séronégatif donne bien un résultat négatif au test. Un test spécifique donnera donc peu de résultats faussement positifs (**faux positifs, FP**).

$$\text{Spécificité} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FP})$$

Sur le terrain, le clinicien portera également une attention particulière aux **valeurs extrinsèques** des tests sérologiques, ou **valeurs prédictives**, qui dépendent de la réalité épidémiologique de la maladie, et en particulier de sa **prévalence** [281].

- La **valeur prédictive positive (VPP)** est définie comme la probabilité qu'un test positif désigne effectivement un animal malade.

$$\text{VPP} = \text{VP} / (\text{VP} + \text{FP})$$

Le théorème de Bayes ci-dessous nous illustre que la VPP diminue avec la prévalence de la maladie ; en effet, dans ce cas, la probabilité de rencontrer un animal malade diminue [280]. Seul un test possédant une spécificité exceptionnelle de 100% aura une VPP constante de 100% quelle que soit la prévalence, puisqu'il ne donnera jamais de faux positifs.

$$\text{VPP} = (1-P) \times \text{Sensibilité} / (P \times \text{Sensibilité} + (1-P) \times (1-\text{Spécificité}))$$

P = Prévalence de la maladie dans la population

Un test pourtant extrêmement sensible (99%) et spécifique (99%) n'aurait donc qu'une VPP de 50% dans une population à faible prévalence (1%), et cette valeur tomberait déjà à 17% pour un test légèrement moins spécifique (95%). Par contre, ce même test aura une VPP de plus de 95% dès que la prévalence de la maladie atteindra 50% !

- La **valeur prédictive négative (VPN)** est, de la même manière, la probabilité qu'un test négatif désigne effectivement un animal sain.

$$\text{VPN} = \text{VN} / (\text{VN} + \text{FN})$$

Toujours selon le théorème de Bayes retranscrit ci-dessous par rapport à la VPN, on constate que lorsque la prévalence de la maladie diminue, la VPN augmente. Un test possédant une sensibilité de 100% a également une VPN constante de 100%.

$$\text{VPN} = (1-P) \times \text{Spécificité} / (P \times (1-\text{Sensibilité}) + (1-P) \times \text{Spécificité})$$

Notons qu'un test généralement très spécifique est peu sensible et inversement. C'est pourquoi on pourra également utiliser deux indices d'appréciation globale d'un test :

- On pourra définir la concordance globale d'un test, ou sa fiabilité, comme la probabilité que le test donne un résultat correct, qu'il soit positif ou négatif. Cette valeur prend donc en compte tous les résultats discordants, aussi bien les faux positifs que les faux négatifs.

$$\text{Fiabilité} = \frac{VP+VN}{VP+FP+VN+FN}$$

Elle dépend également de la prévalence de la maladie : Plus la prévalence est élevée, plus la fiabilité du test se rapprochera de sa sensibilité, et plus la prévalence est basse, plus elle s'approchera de sa spécificité.

$$\text{Fiabilité} = P \times \text{Sensibilité} + (1-P) \times \text{Spécificité}$$

- Le **rapport de vraisemblance (RV)** est une dernière valeur qui permet également de tenir compte de l'intérêt global d'un test, et des écarts entre sa sensibilité et sa spécificité, en s'affranchissant de l'intervention de la prévalence.

Le **rapport de vraisemblance positif (RVP)** est le rapport entre la sensibilité du test et le complément à 1 de sa spécificité :

$$\text{RVP} = \frac{\text{Sensibilité}}{(1-\text{Spécificité})}$$

Un RVP égal à 4 signifie par exemple que le test est 4 fois plus souvent positif chez les sujets malades que chez les sujets sains.

Le **RV négatif (RVN)** est défini comme le rapport du complément à 1 de la sensibilité sur la spécificité :

$$\text{RVN} = \frac{(1-\text{Sensibilité})}{\text{Spécificité}}$$

Ainsi, un RVN de 0,5 (1/2) signifie que l'examen est deux fois moins souvent négatif chez les sujets malades que chez les sujets sains.

V.2. Matériel et méthode

V.2.1. Echantillons de sérums

L'étude est réalisée en aveugle sur 97 sérums :

- 40 sérums provenant de chiens présumés négatifs, vivant en **zones non endémiques** (Bourgogne, Belgique, Allemagne et autres sérums de la sérothèque du laboratoire BVT).

- 57 sérums prélevés sur des **chiens provenant de zones endémiques** (Sud de la France, Djibouti et sérums positifs provenant du laboratoire d'immunopathologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon ou du laboratoire BVT).

Plusieurs aliquots (trois minimum) ont été réalisés, identifiés et conservés à -20°C . Ces aliquots ont été décongelés à température ambiante en fonction des besoins de l'étude.

V.2.2. Immunofluorescence indirecte

Les 97 sérums ont été testés par immunofluorescence indirecte, selon la méthode du laboratoire d'immunopathologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon.

V.2.2.1. Principe

Les sérums dilués sont mis en contact de cellules préalablement infectées par *Ehrlichia canis* inactivée par le formol (laboratoire SYNBIOTICS), immobilisées sur des lames 18 puits. Pour ce faire, la suspension cellulaire est diluée au demi en PBS et 10 μL de cette préparation sont déposés sur chaque puits. Les lames sont ensuite séchées une nuit à température ambiante puis fixées 15 minutes par immersion en acétone à -20°C . Ces lames peuvent être ensuite conservées pendant 6 mois à -20°C .

Le titrage des anticorps s'effectue alors par l'immunofluorescence indirecte, à l'aide d'un conjugué d'Ac de moutons dirigés contre les chaînes lourdes et légère d'IgG de chien, marqués à la fluorescéine : sheep anti-dog IgG (H+L) FITC (THE BINDING SITE, réf PF230).

V.2.2.2. Manipulations

Les lames préparées et préalablement stockées à -20°C sont décongelées à température ambiante.

Les sérums testés sont d'abord dilués au $1/10^{\text{ème}}$ en PBS dans des tubes à hémolyse : $40\ \mu\text{L}$ de sérum + $360\ \mu\text{L}$ de PBS. Un **témoin positif** est systématiquement ajouté aux sérums à tester, sur chaque lame (sérum hyper-immun du laboratoire).

Puis les **dilutions successives au demi** sont réalisées en plaques de 96 puits : $1/20$ - $1/40$ - $1/80$ - $1/160$ - $1/320$ - $1/640$.

$20\ \mu\text{L}$ de chaque dilution sont déposés sur chacun des puits ; les lames sont ensuite mises à incuber 30 minutes à 37°C en chambre humide puis lavées 10 minutes en bain de PBS.

Le conjugué est préparé en quantité suffisante dans un tube à hémolyse dans les proportions suivantes :

- $50\ \mu\text{L}$ d'anti-dog IgG FITC
- $950\ \mu\text{L}$ de PBS
- $10\ \mu\text{L}$ de Bleu Evans à 1%

$20\ \mu\text{L}$ de cette préparation sont déposés dans chaque puits et les lames sont à nouveau placées pour 30 minutes en chambre humide.

2 lavages de 5 minutes en PBS sont ensuite effectués avant de sécher les lames et de les monter au glycérol (à 75 % en PBS).

V.2.2.3. Lecture des résultats

La lecture se fait ensuite au microscope à fluorescence (objectif 40) : le titre du sérum est défini comme l'inverse de la dernière dilution présentant une **fluorescence significative**.

Le seuil de positivité du laboratoire est fixé pour un titre de 40. Tout sérum pour lequel une fluorescence spécifique est observée sur les micro-organismes intracytoplasmiques pour une dilution supérieure ou égale à 1/40 est donc considéré comme positif. Il sera noté, en fonction de son titre, « 40 », « 80 », « 160 », « 320 », « 640 », ce dernier résultat correspondant à un titre de 640 et plus.

Tout sérum ne présentant pas de fluorescence spécifique pour des dilution supérieures au 1/20 est noté « négatif ».

V.2.3. Tests Speed®EHRLI

97 tests Speed®EHRLI (lot n° 23050) ont été réalisés, suivant les instructions du laboratoire (Annexe 1). L'échantillon de 40 µL a toutefois été prélevé avec une micropipette et des embouts à usage uniques pour des soucis de commodité et de précision.

Les résultats ont été notés sous 4 formes : « négatif » pour les tests ne prenant aucune coloration, « faiblement positif » pour les **cas douteux** pour lesquels une très légère coloration apparaissait, et « positif 1 », « positif 2 » et « positif 3 », en fonction de l'intensité croissante de la bande de positivité. Ces quatre derniers résultats sont tous considérés comme positifs pour le test. Cette notation est laissée au seul jugement du manipulateur et a pu être comparée au début à un abaque fourni par le laboratoire BVT.

V.2.4. Tests WITNESS® Ehrlichia

97 sérums ont été testés selon les recommandations du fabricant (Annexe 2). Les résultats ont été notés « positifs » ou « négatifs » en fonction de l'apparition ou non de la bande de positivité clairement visible.

V.2.5. Tests SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli

Les 97 sérums ont également été testés avec le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli (lot n° 07919-225 CT) selon les recommandations du fabricant (Annexe 3).

Les résultats sont notés « positif » ou « négatif » ; l'intensité de la coloration n'a pas été retenue dans cette étude, hormis pour la validité du test (voir fiche Annexe 3).

V.2.6. Immuno-tranfert ou Western Blot

V.2.6.1. Principe

L'immuno-transfert a été réalisé au sein du laboratoire BVT (La Seyne-sur-Mer), selon le cahier des charges du laboratoire, dérivant de la technique de Laemmli [282], qui comprend plusieurs étapes : l'électrophorèse, le transfert, la réaction sérologique proprement-dite (immuno-blot) et la révélation.

L'antigène d'*Ehrlichia canis* est dénaturé et les différents polypeptides obtenus sont séparés par électrophorèse. On fait ensuite réagir le sérum sur ces polypeptides préalablement transférés sur une membrane de nitrocellulose. Après conjugaison avec des anticorps marqués à la peroxydase, la révélation se fait par une réaction chimique colorée.

Un marqueur de poids moléculaire pré-calibré permet d'évaluer le poids moléculaire des différentes bandes apparaissant.

Pour chaque membrane, un **témoin positif** (sérum d'un chien mâle avec des signes cliniques spécifiques et un titre IFI de 2560, provenant du Dr Lafrance - Djibouti) est ajouté de façon à déterminer le poids moléculaire des bandes obtenues. Un **témoin négatif** (sérum d'un chien atteint de leishmaniose et négatif pour l'ehrlichiose en IFI, provenant de la sérothèque du laboratoire BVT) permet de vérifier l'absence de réaction non-spécifique ou de contamination.

V.2.6.2. Electrophorèse

L'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) permet la séparation, au moyen d'un gel de polyacrylamide soumis à un courant électrique, des différents polypeptides de l'antigène d'*E. canis* préalablement dénaturé.

V.2.6.2.1. Préparation des gels

Les gels de 8,5cm x 5,5cm sont fabriqués dans un support Mini-PROTEAN II (Biorad). Le gel de séparation a d'abord été réalisé à 12,5 % d'acrylamide, mais un gel à 15% donnera une meilleure séparation des polypeptides légers qui nous intéressent dans cette étude.

Un premier gel de séparation à 15 % d'acrylamide est donc préparé dans un tube à essai selon les propositions suivantes :

2,35 mL d'eau distillée,
2,5 mL de TRIS 1,5M pH 8,8,
100µL de SDS 10 %,
5 mL d'acrylamide-bisacrylamide à 30 %,
50 µL d'ammonium peroxy-disulfate (APS) à 10 %,
5 µL de tri-éthyl-méthylène-diamide (TEMED)

Ce gel est ensuite coulé entre 2 plaques de verre. On le laisse polymériser pendant environ une heure à température ambiante (contrôle grâce à un tube témoin).

Ensuite, un gel de concentration à 4 % environ est préparé :

6,1 mL d'eau distillée,
2,5 mL de TRIS 1,5M pH 8,8,
100 µL de SDS 10 %,
1,35 mL d'acrylamide-bisacrylamide à 30 %,
50 µL d'APS 10 %,
10 µL de TEMED

Ce gel est coulé au-dessus du précédent ; on dispose un peigne qui va permettre de former les puits recevant les antigènes et le marqueur de poids moléculaire. On laisse polymériser à température ambiante.

V.2.6.2.2. Préparation de la cuve

Après environ une demi-heure à température ambiante (le contrôle de la réaction se fait grâce au reste de la préparation conservé dans un tube témoin), le peigne est retiré délicatement et le gel est installé dans la cuve d'électrophorèse (Biorad).

La cuve est remplie d'une solution tampon d'électrophorèse (eau distillée, TRIS, glycine, SDS et HCl pour stabiliser le pH autour de 8,3).

V.2.6.2.3. Préparation des échantillons à analyser

V.2.6.2.3.1. Marqueur de poids moléculaire

Le marqueur utilisé (Prestained SDS-PAGE. Standards, Broad Range, Catalog #161-0318 de Biorad) est un **marqueur pré-coloré** et utilisable directement, qui contient 8 protéines de poids moléculaire connu en solution : aprotinine (6,6 kDa), lysozyme (20,6 kDa), inhibiteur de la trypsine (29,8 kDa), anhydrase carbonique (36,4 kDa), ovalbumine (48,6 kDa), séralbumine bovine (94 kDa), β -galactosidase (130 kDa) et myosine (201 kDa). 5 μ L de cette préparation préalablement décongelée sont directement chargés dans le puits destiné au marqueur.

V.2.6.2.3.2. Antigène *Ehrlichia canis*

L'antigène utilisé est ***Ehrlichia canis*, souche Jake**, fournie par PanBio InDx (Baltimore, Maryland 21227, USA : Catalogue #630V, lot EC042100KRR).

Cet antigène est préparé à partir d'une suspension cellulaire (cellules 030) infectée par le micro-organisme. Il est ensuite **purifié par centrifugation en gradient de densité** et inactivé par une solution de formol à 0,1 %. La préparation est ensuite rincée et conservée dans du PBS à raison de 5,3 mg/mL de protéines. Cet antigène est stocké à -80°C en aliquots de 0,5 mL.

L'antigène (1,5 µg d'antigène par millimètre de largeur de puits environ) décongelé est ensuite mélangé dans un tube Eppendorf avec un tiers en volume de tampon de charge (eau distillée, TRIS-HCl 0,5 M, SDS, Glycérol, 2 bêta-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol 1 %). La suspension est complétée avec de l'eau stérile pour obtenir 2µl par mm de largeur de puits.

Cette préparation subit ensuite un **traitement thermique** : le tube est plongé dans l'eau bouillante pendant 3 minutes puis placé dans la glace pendant environ 5 minutes.

Le gel est ensuite chargé sur toute sa longueur avec cette préparation.

V.2.6.2.4. Electrophorèse

La cuve est reliée à un générateur électrique, en prenant soin de respecter la polarité. Le gel est d'abord soumis à un courant d'ampérage constant (30 mA) pendant un quart d'heure, puis, une fois l'électrophorèse lancée, l'ampérage est augmenté à 60 mA pendant environ une heure, **jusqu'à ce que le front de migration, repéré par l'indicateur de poids moléculaire coloré, arrive à un millimètre environ du bas du gel.**

Après la migration, le dispositif est démonté et le gel récupéré. Le gel de concentration est découpé et le gel de transfert est équilibré pendant environ 10 minutes dans la solution « tampon de transfert » (eau distillée, TRIS-HCl 1,5 M pH 8,8, Glycine, Méthanol).

V.2.6.3. Transfert

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une **feuille de nitrocellulose** qui sera le support de la réaction immunologique.

Une membrane de nitrocellulose (Sigma, ref. N-8017) - à manipuler avec des gants - ainsi que 6 feuilles de papier Wattman 3mm CHR sont découpées à la dimension du gel. La membrane est équilibrée dans du tampon de transfert pendant un quart d'heure.

Le montage est ensuite réalisé dans le dispositif de transfert (Biorad) : Le gel est accolé à la membrane et cet ensemble est « pris en sandwich » dans les feuilles de papier

Wattman préalablement imbibées de tampon de transfert. Les bulles d'air sont soigneusement chassées de façon à permettre un contact parfait entre le gel et la membrane.

Ce « sandwich » est ensuite placé dans la cuve de transfert remplie de solution tampon, en respectant la polarité. Le transfert s'effectue à 230 mA pendant 2 heures.

Le dispositif est alors démonté et l'on contrôle la qualité du transfert grâce au **passage sur la membrane du marqueur de poids moléculaire coloré**.

La membrane est ensuite rincée en bain de PBS pendant 5 minutes, puis saturée une heure sous agitation dans une solution lactée (PBS-0,1 % Tween 20, lait écrémé 5 %).

Elle subit ensuite deux rinçages de 5 minutes en bains de PBS puis est laissée à sécher à l'air libre pendant une heure.

V.2.6.4. Immuno-blot

Les limites de transfert sur la membrane sont repérées en se servant du peigne comme étalon.

Des bandelettes de deux millimètres de large environ, en nombre suffisant pour les sérums à tester, sont ensuite numérotées et découpées à l'aide d'un scalpel. Deux bandelettes supplémentaires sont également préparées pour tester les témoins, positif et négatif.

Les **sérums sont dilués au 1/100** dans une solution lactée (PBS-0,1 % Tween 20, lait écrémé 0,5 %) puis 600µL sont mis en contact d'une bandelette ; l'incubation se fait pendant environ 4 heures sous agitation permanente sur balancelle ; les bandelettes sont ensuite égouttées et rincées 2 fois 3 minutes au PBS-0,1% Tween 20.

Les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (anti-dog IgG Peroxydase Conjugate, Sigma, ref. A-9043) sont ensuite dilués au 1/2000 dans la solution lactée habituelle et 600 µL de cette préparation sont ajoutés dans chaque rigole. L'incubation se fait pendant 1h30 sous agitateur. Puis ces bandelettes sont à nouveau rincées 3 fois 3 minutes au PBS-0,1% Tween 20 puis 3 fois 3 minutes au PBS seul.

V.2.6.5. Révélation

La réaction colorée permettant la révélation est due à l'action de la peroxydase du conjugué sur le 4-chloro-1-naphtol qui donne une **coloration brune** en présence de peroxyde d'hydrogène.

600 μ L de solution de révélation (PBS 15 mL, 4-chloro-1-naphtol 1,5 mL et H₂O₂ 1,5 μ L) sont déposés sur chaque bandelette. Après 10 minutes sous agitation, les bandelettes sont rincées à l'eau distillée et sont laissées à sécher à l'air libre.

V.2.6.6. Lecture des résultats

La courbe-étalon est réalisée à partir du marqueur de poids moléculaire, avec en abscisse $x=\log d$ et en ordonnée $y=PM$ (d correspond à la distance de la bande par rapport au haut du gel en millimètre et PM le poids moléculaire en kilodaltons, kDa).

Les différentes bandes sont révélées pour chaque bandelette par mesure de d et leur poids moléculaire est recherché sur la courbe. L'intensité de la bande est évaluée à vue d'œil à luminosité constante.

V.2.7. Analyse statistique

Les différentes valeurs des tests décrites au chapitre V.1. Principe sont évalués par comparaison à l'IFI, et au WB en cas de résultats discordants. Le test du Chi² apparié de Mac-Nemar nous permet de comparer les valeurs intrinsèques des différents tests comme précédemment décrit [264, 281]. Un seuil de $p<0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. Le calcul du coefficient kappa permet d'évaluer la concordance entre les différents tests [280, 281].

V.3. Résultats

V.3.1. IFI

Les résultats obtenus pour l'IFI et les 3 tests rapides sont présentés dans l'Annexe 4. 43 sérums sont positifs en IFI et 54 sont négatifs, soit une prévalence de 44,33%.

Les titres des sérums positifs sont notés de 40 à 640 ; une majorité de ces sérums positifs ont toutefois un titre supérieur ou égal à 320 (84%).

Nous trouvons **27 sérums discordants** :

- 4 sont des faux positifs isolés, dont 3 FP pour le Speed®EHRLI et 1 FP pour le WITNESS® Ehrlichia.
- 23 sont des faux négatifs. Parmi eux, dont 15 sont négatifs pour au moins deux des trois tests évalués, dont 9 avec des titres supérieurs ou égaux à 320.

Comme nous l'avons vu, les résultats discordants de l'IFI seront confrontés à ceux du WB.

V.3.2. Western Blot

Sur les 27 sérums discordants, seuls 13 sérums étaient malheureusement disponibles en quantité suffisante pour réaliser le WB.

Le témoin négatif donne 2 bandes, une à 55 kDa et une à 68 kDa ; ces bandes sont également retrouvées sur la plupart des autres bandelettes. Elles seront donc considérées comme « bruit de fond », comme cela a déjà été décrit dans une étude précédente [135]. Ces bandes peuvent correspondre notamment à une contamination par *E. coli*, dont les HSP croisent avec *E. canis* [2, 5].

Le témoin positif donne plusieurs bandes, dont deux sont très dominantes (coloration intense) à **26** et **42 kDa**, et un groupe dominant à **31-34 kDa**. D'autres bandes sont trouvées à 21, 38, 75-80, 120 et 200 kDa (cf. Tableau 11).

Tableau 11 : Poids moléculaire (en kDa) des différentes bandes observées pour les sérums témoins.

Témoin négatif	(55), (68)
Témoin positif	21, 26 , 31-34 , 38, 42 , (55), (68), 75-80, 120, 200

(Les chiffres en gras correspondent aux bandes dominantes)

Les bandes de faible poids moléculaire (22 à 29 kDa) sont habituellement considérées comme **spécifiques d'*Ehrlichia canis*** [34]. Tout sérum ayant au moins une bande dans cet intervalle sera considéré positif. Les autres seront notés négatifs. Les résultats du Western-blot sont résumés dans l'Annexe 5.

6 sérums sont négatifs pour le WB mais positifs pour l'IFI, dont 5 ont des titres élevés supérieurs à 320 (en gras dans l'Annexe 5). Ces sérums sont également tous négatifs pour les trois tests rapides. Ils marquent généralement des peptides non spécifiques de masses moléculaires élevées, sauf le sérum E112, fortement positif en IFI, qui marque une bande dominante à 32 kDa et une bande à 42 kDa. Les bandes observées sont notées dans le Tableau 12 ci dessous.

Tableau 12 : Western Blot – Masse moléculaire des peptides observés sur les sérums discordants avec l'IFI

Numéro de sérum	IFI	Western-blot
E085	320	(55), (68), 200
E086	640	(55)
E099	40	-
E101	640	(55), (68), 200
E106	320	(55), 75
E112	640	32, 42

BILAN :

En **tenant compte en priorité des résultats du Western-Blot** lorsqu'ils sont disponibles, nous pouvons dresser le tableau de contingence suivant :

Tableau 13 : Résultats des différents tests après Western Blot

	WB (ou IFI)	Speed®EHRLI	WITNESS®Ehrlichia	SNAP®COMBO Diro/Ehrli
Sérums positifs	37	35	28	22
Sérums négatifs	60	62	69	75

Sur les 97 sérums testés, 37 sérums sont donc positifs et 60 sérums sont négatifs, soit une **prévalence de 38% environ**.

21 sérums sont finalement discordants ; nous obtenons donc une **concordance globale de 78,35% (76/97)** pour les quatre tests. Les **4 faux positifs** sont des résultats isolés pour un seul des trois tests rapides. Parmi les **17 faux négatifs**, 4 le sont pour les trois tests, 5 le sont pour deux des tests, et 8 le sont pour un seul test, le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli ou le WITNESS®Ehrlichia (cf. Tableau 14).

Tableau 14 : Sérums discordants après Western Blot

Numéro de sérum	IFI / WB	Speed®EHRLI	WITNESS®Ehrlichia	SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli
EO 71	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
X 14	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
X 11	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
X 13	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
EO 84	320	Négatif	Négatif	Négatif
EO 72	320	Négatif	Négatif	Négatif
E102	40	Négatif	Négatif	Négatif
E103	40	Négatif	Négatif	Négatif
EO 45	40	Faiblement positif	Négatif	Négatif
EO 17	320	Positif 1	Négatif	Négatif
EO 56	160	Faiblement positif	Négatif	Négatif
B7AH27	160	Faiblement positif	Négatif	Négatif
EO 54 BIS	640	Négatif	Positif	Négatif
EO 41	320	Faiblement positif	Négatif	Positif
EO 66	320	Faiblement positif	Négatif	Positif
EO 55	320	Faiblement positif	Positif	Négatif
E091	320	Faiblement positif	Positif	Négatif
E093	160	Positif 1	Positif	Négatif
E096	640	Faiblement positif	Positif	Négatif
EO 68	320	Positif 1	Positif	Négatif
EO 76	320	Positif 1	Positif	Négatif

En bleu : faux négatifs ; en rouge : faux positifs.

V.3.3. Speed®EHRLI

Les 97 tests donnent des résultats interprétables, notés selon le barème fixé par le laboratoire BVT, de « faiblement positif » à « positif2 ».

La **sensibilité** du Speed®EHRLI est de **86,5%**. Parmi les 5 faux négatifs, 2 ont un titre de 40, 2 ont un titre de 320 et 1 a un titre élevé de 640 ou plus (cf. Tableau 14 supra).

La **spécificité est de 95%** ; les trois faux positifs sont effectivement négatifs avec les trois autres tests ; ils ne donnent toutefois qu'une coloration notés « faiblement positif », c'est à dire un trait rose qui se devine plutôt qu'il ne se voit.

Le RVP est donc de 17, et le RVN de 1/7 environ.

On observe dans cette population une fiabilité de 91,75% (89/97), avec un coefficient kappa de 0,82. Les résultats ne sont pas statistiquement différents (Chi2=0,125 ; p=0,72).

La valeur prédictive positive (VPP) du test dans cette population est de 91,4% et la valeur prédictive négative (VPN) est de 91,9%. Le Tableau 15 ci-dessous résume ces données.

Tableau 15 : Speed®EHRLI : Comparaison à l'IFI et au Western blot

Speed®EHRLI	Positif	Négatif	Total	Valeurs intrinsèques
IFI/WB Positif	32	5	37	Sensibilité = 86,5%
IFI/WB Négatif	3	57	60	Spécificité = 95%
Total	35	62	97	
Valeurs extrinsèques	VPP = 91,4%	VPN = 91,9%		Fiabilité = 91,75%

Chi2 = 0,125 ; p= 0,72 ; Kappa = 0,82 ; RVP= 17 ; RVN=1/7

V.3.4. WITNESS® Ehrlichia

Les 97 tests réalisés donnent des résultats interprétables.

La **sensibilité** du WITNESS® Ehrlichia est de **73%** ; là encore, une bonne proportion de faux négatifs (5/10) le sont pour des sérums de titre élevé (320 ou plus).

La **spécificité de ce test est de 98,3%**, avec un seul faux positif, négatif pour les trois autres tests.

Le RVP est de 44 et le RVN est de 1/4 environ.

On observe une fiabilité de 88,7% (86/97) avec un coefficient Kappa de 0,75 ; les tests donnent des résultats statistiquement différents (p=0,016).

La valeur prédictive positive (VPP) du test est ici de 96,4% et sa valeur prédictive négative (VPN) de 85,5 %. Le Tableau 16 ci-dessous résume ces données.

Tableau 16 : WITNESS® Ehrlichia : Comparaison à l'IFI et au Western blot

WITNESS® Ehrlichia	Positif	Négatif	Total	Valeurs intrinsèques
IFI/WB Positif	27	10	37	Sensibilité = 73%
IFI/WB Négatif	1	59	60	Spécificité = 98,3%
Total	28	69	97	
Valeurs extrinsèques	VPP = 96,4%	VPN = 85,5%		Fiabilité = 88,7%

Chi2 = 5,82 ; p= 0,016 ; Kappa = 0,75 ; RVP= 44 ; RVN=1/4

V.3.5. SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli

Les 97 sérums testés donnent des résultats lisibles et interprétables.

La **sensibilité** du SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli est de **59,5%**. Sur les 15 faux négatifs, 9 ont un titre de 320 ou plus (cf. Tableau 14 ci-dessus).

En l'absence de faux positifs dans notre étude, **la spécificité de ce test est de 100%**.

Le RVN est de ½ environ. Le RVP ne se calcule pas (absence de faux positifs).

On observe une fiabilité de 84,5% (82/97) dans cette population, avec un coefficient de concordance moyen (Kappa=0,64). Le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli donne des résultats statistiquement différents de ceux de l'IFI (et du WB) au risque de 5% (p= 0,0003).

La valeur prédictive positive (VPP) du test est ici de 100% et sa valeur prédictive négative (VPN) est de 80%. Le Tableau 17 ci-dessous résume ces données.

Tableau 17 : SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli - Comparaison à l'IFI et au Western blot

SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli	Positif	Négatif	Total	Valeurs intrinsèques
IFI/WB Positif	22	15	37	<i>Sensibilité = 59,5 %</i>
IFI/WB Négatif	0	60	60	Spécificité = 100 %
Total	22	75	97	
Valeurs extrinsèques	VPP = 100 %	VPN = 80 %		Fiabilité = 84,5 %

Chi2 = 13,1 : p= 0,0003 ; Kappa = 0,64 ; RVN = 1/2

V.4. Discussion

Notre étude a permis de comparer les résultats de 3 tests sérologiques rapides, le **Speed®EHRLI**, le **WITNESS®Ehrlichia** et le **SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli**, pour la recherche d'Ac anti-*E.canis* sur 97 sérums testés **en aveugle**, et d'évaluer ces tests par rapport aux **méthodes sérologiques de référence**. Les sérums provenaient de chiens tout venant, en zone endémique ou non, ou de chiens réputés infectés ; les statuts clinique et épidémiologique des animaux n'ont pas été retenus. Certains sérums ayant été conservés depuis plusieurs années, les résultats de l'IFI, en cas de discordance, ont été doublés par ceux du Western Blot, examen reconnu très sensible et très spécifique [261]. La **séroprévalence était de 38%** dans notre échantillonnage.

Sur les 13 WB réalisés, nous avons noté une faible concordance avec l'IFI (7/13), et en particulier une faible spécificité de l'IFI par rapport au WB. Compte-tenu toutefois du nombre très limité de sérums testés simultanément par ces deux méthodes, il serait hasardeux de conclure à un manque de spécificité de l'IFI par rapport au WB.

On peut toutefois avancer plusieurs hypothèses pour expliquer ces quelques différences observées. L'antigène utilisé pour l'IFI est une culture cellulaire d'*E. canis* ; la lecture consiste à repérer une fluorescence sur les entités intra-cytoplasmiques (morulas). Cet examen est donc soumis à une certaine **subjectivité de lecture**, mais aussi à la possibilité de fixations plus ou moins spécifiques d'Ac du sérum ou de conjugué sur d'autres éléments cellulaires, ou encore sur des éléments de contamination, malgré les étapes de rinçage.

Le WB est par essence **plus spécifique** puisqu'il utilise un Ag identique mais **purifié** par gradient de centrifugation ; le risque de réactions non spécifiques est donc largement minimisé. De plus, la lecture est plus simple et objective.

L'hypothèse d'épitopes conformationnels qui ne seraient pas détectables au WB n'a pas été démontrée à notre connaissance dans l'ehrlichiose canine. Les polypeptides trouvés sur le témoin positif correspondent bien aux observations préalablement publiées, et les polypeptides de faible masse moléculaire, notamment entre 22-29 kDa, **constamment présents dans les infections par *E. canis***, ont été considérés comme spécifiques [5 , 34 , 135 , 141, 186 , 201 , 205 , 267].

Par ailleurs, notons qu'un des sérums noté négatif en WB et positif en IFI, le sérum E112, avait un titre élevé (noté 640) et présentait un profil compatible avec une infection par une *Ehrlichia* autre que *E. canis* [34]. Nous avons vu dans la quatrième partie de ce travail l'existence de réactions croisées, et notamment pour des peptides de 30-32 kDa qui peuvent correspondre notamment aux protéines MAP1 d'*E. (Cowdria) ruminantium* [201 , 263, 283]. Compte-tenu de ces explications, nous avons choisi de garder le résultat du WB comme résultat de référence lorsqu'il était disponible.

Nous avons observé une concordance globale de 78,35% (76/97) entre les trois tests sérologiques étudiés et les méthodes de référence, résultat proche de publications du même type [79]. Sur la population étudiée, la fiabilité des tests par rapport à l'IFI et au WB est de 91,75% (89/97), 88,66% (86/97) et 84,54% (82/97) respectivement pour le Speed®EHRLI, le WITNESS®Ehrlichia et le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli. Les deux derniers tests donnent des résultats significativement différents de l'IFI et du WB ($p < 0,05$). Il existe toutefois une **bonne concordance** entre les résultats de ces trois tests et les résultats donnés par le WB et l'IFI ($0,64 < \text{kappa} < 0,82$), ce qui indique que leur utilisation en routine par le clinicien devrait être intéressante sur le plan qualitatif. Ces résultats sont toutefois dépendants de la prévalence, comme nous l'avons vu dans la première partie (V.1. Principe), et doivent être interprétés en fonction.

Le Speed®EHRLI est le test le plus sensible et le moins spécifique, alors que le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli est le plus spécifique et le moins sensible. Le mode de fonctionnement du système SNAP®, avec un rinçage à contre-courant suivi de la réaction avec le conjugué, explique probablement l'absence de fixations non spécifiques, comparativement aux tests d'immuno-migration classiques que sont le

Speed®EHRLI et le WITNESS®Ehrlichia. **Les différences de spécificité entre les trois tests ne sont toutefois pas statistiquement significatives** (cf. Tableau 18 ci dessous).

Notons par ailleurs que les trois FP détectés avec le Speed®EHRLI donnent des résultats jugés « faiblement positifs », c’est à dire des bandes douteuses de coloration à peine visible, que le fabricant considère positif par prudence, mais conseille de ré-évaluer après 10 à 15 jours (voir Annexe 1). Pour le WITNESS®Ehrlichia, seule une bande de couleur rose “clairement visible” a été considérée comme positive, conformément aux recommandations du laboratoire (voir Annexe 2) ; nous ne saurons donc pas dire si le FP détecté était également douteux ou non.

Le SNAP®COMBO Diro/Ehrli est significativement moins sensible que le Speed®ERHLI ; la différence de sensibilité observée entre le WITNESS®Ehrlichia et le Speed®EHRLI, et entre le SNAP®COMBO Diro/Ehrli et le WITNESS®Ehrlichia, ne sont pas statistiquement significatives (cf. Tableau 18).

Tableau 18 : Comparaison de la fiabilité, de la sensibilité et de la spécificité des trois tests sérologiques, par rapport à l’IFI.

Test diagnostic	% fiabilité	% sensibilité (intervalle de confiance)	% spécificité (intervalle de confiance)
Speed®EHRLI	91,7	86,5 ^a (80 ; 93)	95 ^a (91 ; 99)
WITNESS®Ehrlichia	88,7	73 ^{a,b} (64 ; 82)	98,3 ^a (96 ; 100)
SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli	84,5	59,5 ^b (50 ; 69)	100 ^a (95 ; 100)

^{a,b}: Dans chaque colonne, les chiffres ayant une lettre différente en exposant diffèrent statistiquement (Chi²>3,84 ; p<0,05).

Une précédente étude avait déjà mis l’accent sur la bonne spécificité et le manque de sensibilité du SNAP®COMBO Diro/Ehrli, et avait donné des résultats très similaires aux nôtres [264]. Ce dernier a d’ailleurs récemment été remplacé par le SNAP®3DX, qui dépiste simultanément la dirofilariose (*D.immitis*), ainsi que les Ac dirigés contre *Borrelia burgdorferi* et *E. canis* (protéines recombinantes P30 et P30-1). Evalué par une étude de Bélanger et coll., ce test apparaît plus spécifique et plus sensible que son

prédécesseur, les résultats n'étant toutefois pas statistiquement significatifs sur l'échantillonnage testé [264].

A notre connaissance, une seule étude rapporte des valeurs intrinsèques pour le WITNESS®Ehrlichia [279]. Dans cette étude portant sur 207 sérums et plasma de chiens vivant en zones d'endémie, ce test a donné une sensibilité de 95% et une spécificité de 100%. Les différences observées avec notre étude, notamment concernant la sensibilité du test, peuvent être liées à plusieurs facteurs : population étudiée (sérums provenant uniquement de chiens en zones endémiques), technique de référence (IFI, souche, spécificité...), critères de lecture du test (prise en compte des résultats douteux ?).

Lors de **suspicion d'ehrlichiose monocyttaire**, le clinicien aura tout intérêt à utiliser le test le plus sensible possible, d'autant qu'il est préférable d'éviter de laisser passer cette ehrlichiose à la chronicité. Le choix s'orienterait donc vers le Speed®EHRLI ou le WITNESS®Ehrlichia. Lorsqu'il s'agit d'**enquête sérologique**, on utilisera plutôt un test le plus spécifique possible pour éviter de comptabiliser les FP ; le choix se porterait donc sur le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli, même si nous avons vu que les différences de spécificité ne sont pas statistiquement significatives [278].

Notre étude permet également d'extrapoler les résultats obtenus, grâce au théorème de Bayes présenté dans la première partie. La Figure 4 ci-dessous nous permet voir l'évolution de la VPP, de la VPN et de la fiabilité (concordance) des trois tests en fonction de la prévalence de la maladie. La faible sensibilité des tests, également mise en évidence par des rapports de vraisemblance négatifs élevés, et notamment pour le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli, entraîne une baisse de fiabilité en zone de forte prévalence. Le Speed®EHRLI a la fiabilité la plus constante quelle que soit la prévalence.

En France, l'EMC n'a pas fait à notre connaissance l'objet d'enquêtes séro-épidémiologiques, hormis dans les camps militaires [90], et **la prévalence est donc mal connue** dans les milieux civils. La Figure 4 ci-dessous illustre bien la prudence à interpréter un test sérologique positif lorsque la prévalence de la maladie est inconnue, en zone non endémique notamment. Si nos trois tests auraient en effet tendance à être très fiables en cas de faible prévalence, la VPP serait malgré tout très basse pour les tests dont la spécificité n'est pas absolue.

Une enquête menée aux Etats-Unis a rapporté une séroprévalence de 2,5% pour cette maladie parmi les chiens consultant dans les Universités vétérinaires de Caroline et de Virginie [201]. On peut remarquer sur l'ensemble de ces figures que le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli sera le test le plus fiable lorsque la prévalence de la maladie est supposée basse, avec pour une séroprévalence de 2,5% une VPP de 100%, une VPN de près de 99%, et une fiabilité de 99%.

Par contre, lorsque la prévalence est élevée, notamment en collectivité et lors d'épizootie, avec des séroprévalences de 30 à 50% ou davantage [90, 264], le Speed®EHRLI est le test le plus fiable, ainsi que le WITNESS®Ehrlichia dans une moindre mesure.

Les 3 tests étudiés présentent par ailleurs de nombreux avantages pour le clinicien :

- Ces tests sont **disponibles** en centrales d'achat vétérinaire. Les tests immunochromatographiques (WITNESS® et SPEED®) se conservent très bien, même à température ambiante, pendant plus d'une année (18 mois). Le SNAP®COMBO se conserve moins longtemps, et il est important de bien respecter la chaîne du froid, du fait de la présence d'un conjugué enzymatique thermosensible.

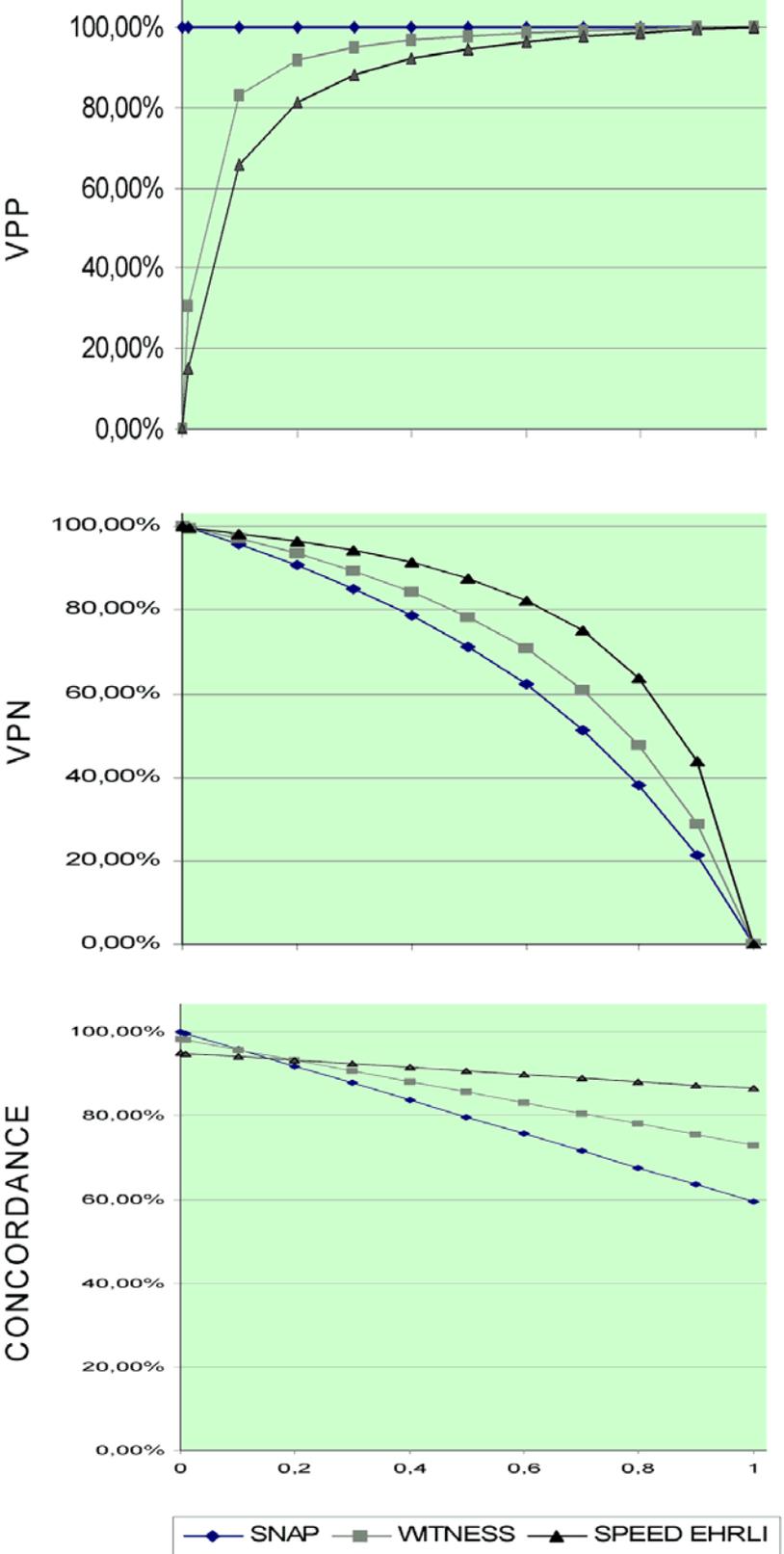
- Plusieurs types de prélèvements sont utilisables (sang total, sérum ou plasma) ; nous avons ici évalué l'utilisation de sérums, pour lesquels les résultats sont certainement les plus fiables. L'utilisation pratique des tests est **très simple** ; seul le SNAP®COMBO nécessite un peu plus de manipulations et de précautions, mais reste très facile d'utilisation dans l'absolu.

- La lecture rapide (10 à 20 minutes) est compatible avec l'exercice en cabinet, et elle est aisée même en l'absence d'expérience (présence de bandes ou de point colorés, témoin positif). On a donc un **résultat immédiat** qui permet de prendre une **décision thérapeutique adaptée sans délai**. Au total, nous n'avons pas noté de différence majeure entre les tests pour leur facilité d'utilisation : si le Speed®EHRLI nécessite 20 minutes d'attente pour la lecture du résultat, nous avons généralement constaté l'apparition de la bande avant ce délai pour les résultats positifs. Le WITNESS®Ehrlichia et le SNAP®COMBO donnent un résultat en 10 minutes, mais doivent être sorti du réfrigérateur environ 10 minutes avant l'utilisation.

- **Le coût de ces tests est modéré** (entre 10 et 15 euro HT environ en centrales d'achat) et ne nécessite **pas d'envoi à un laboratoire spécialisé** (identification et préparation de l'échantillon, coût de l'expédition...).

L'inconvénient majeur de ces tests est l'**absence de résultats quantitatifs**, qui ne permet pas de suivi sérologique, et donc l'observation d'une séroconversion chez un animal dont le tableau clinique est douteux, et pour lequel aucun diagnostic direct n'est disponible, notamment en phase chronique de la maladie. Comme le rappelle les laboratoires sur la notice, l'interprétation des résultats nécessite une confrontation avec le contexte clinique et épidémiologique de l'animal, au même titre que tout examen biologique (cf. IV.3.2.2.2. Interprétation des résultats sérologiques).

Figure 4 : Variations de la valeur prédictive positive (VPP), de la valeur prédictive négative (VPN) et de la concordance globale des trois tests sérologiques, calculées selon le théorème de Bayes, en fonction de la prévalence (D'après [264 , 280])



Notre étude présente l'avantage de tester en aveugle, sur la même série de 97 sérums, dans une population hétérogène, la capacité de trois tests de diagnostic rapide, le Speed®EHRLI, le WITNESS® Ehrlichia et le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli, à détecter des Ac dirigés contre *E.canis*.

Aucune différence n'a été notée pour la spécificité qui est très bonne pour les trois tests. La sensibilité du Speed®EHRLI est toutefois supérieure à celle du SNAP®COMBO. Si la fiabilité des tests est globalement très bonne par rapport aux méthode de référence, le clinicien devra tout de même prendre en compte cette différence dans valeurs intrinsèques, ainsi que les données épidémiologiques et cliniques qui influent sur leur valeur diagnostique.

La bonne disponibilité, le coût modéré et la facilité d'emploi de ces kits en font un outil très utile pour le vétérinaire au sein de sa clinique, qui lui permettra de prendre une décision thérapeutique immédiate lors de suspicion d'ehrlichiose.

La capacité de ces tests à détecter d'autres ehrlichioses canines, compte-tenu des réactions croisées et des similitudes cliniques déjà évoquées, n'a pas été évaluée ici. En France toutefois, l'incidence de ces maladies chez le chien semble encore très faible.

CONCLUSION

L'ehrlichiose monocyttaire à *Ehrlichia canis* est aujourd'hui l'ehrlichiose canine la mieux connue et la plus répandue notamment dans notre pays. Son diagnostic précoce est essentiel compte-tenu de la gravité potentielle des formes chroniques, et le vétérinaire praticien se doit de l'inclure, particulièrement en zone endémique, dans le diagnostic différentiel de nombreuses affections hématologiques et/ou inflammatoires.

Les résultats de notre étude expérimentale permettent de conclure à la bonne fiabilité globale de trois kits de diagnostic rapide, le Speed®EHRLI, le WITNESS® Ehrlichia et le SNAP®COMBO, par rapport aux méthodes sérologiques de référence. Si la spécificité est excellente, il existe toutefois des différences dans la sensibilité des tests, qui doivent amener le clinicien à une certaine prudence, en particulier dans les zones où la prévalence de la maladie est supposée élevée.

L'utilisation de ces tests « au chevet du malade » reste donc une bonne alternative à l'envoi de sérum pour l'IFI dans un laboratoire spécialisé, et permet de prendre une décision thérapeutique rapide, notamment face à un cas aigu en zone endémique. L'impossibilité d'obtenir un résultat quantitatif peut toutefois en limiter l'utilisation lors de certains cas douteux d'ehrlichioses chroniques en particulier.

Plusieurs espèces d'*Ehrlichieae* ont été identifiées comme pathogènes chez le chien depuis une quinzaine d'années à travers le Monde. Si seules *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys* sont aujourd'hui considérées comme ubiquitaires, la découverte ou l'émergence d'autres espèces dans des pays toujours plus nombreux soulève néanmoins le problème d'une possible installation endémique dans notre pays. Les techniques sérologiques ne permettant pas une distinction aisée entre ces différentes infections, les méthodes de diagnostic direct comme la PCR devraient ainsi prendre de l'importance dans le diagnostic différentiel de ces maladies, ou dans le diagnostic des infections multiples, en complément des méthodes diagnostiques actuelles.

Le Professeur responsable
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon

Luc CHABANNE
Docteur Vétérinaire

Vu : Le Directeur
de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Lyon

Professeur J-F CHARY

Le Président de la thèse

Professeur Jérôme ETIENNE

Vu et permis d'imprimer

Lyon, le 5 AVR. 2004

Pour le Président de l'Université,
Le Président du Comité de Coordination des Etudes Médicales,
Professeur F. MAUGUIERE



BIBLIOGRAPHIE

1. BROUQUI, P., *Ehrlichiosis in Europe*, in *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium*, P.Brouqui, Editor. 1999, Elsevier: Paris. p. 220-232.
2. RIKIHISA, Y., *Ehrlichiae of veterinary importance.*, in *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium.*, P.Brouqui, Editor. 1999, Elsevier: Paris. p. 393-405.
3. COHN, L.A., *Ehrlichiosis and related infections*. Vet.Clin.North.Am.Small.Anim.Pract., 2003. **33**: p. 863-884.
4. RISTIC, M., HUXSOLL, D., L., *Tribe II : Ehrlichiae*, in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, N. Krieg, R., & Holt, J., G., Editor. 1984, The William's and Wilkins Co.: Baltimore. p. 704-711.
5. RIKIHISA, Y., *The Tribe Ehrlichieae and Ehrlichial Diseases*. Clin.Microbiol.Rev., 1991. **4**(1): p. 286-308.
6. RAOULT, D., BROUQUI, P., *Ehrlichia. Ehrlichioses*, in *Les rickettsioses*, Elsevier, Editor. 1998, Encyclopédie Médico Chirurgicale: Paris, France. p. 117-140.
7. OHASHI, N., UNVER, A., ZHI, N., RIKIHISA, Y., *Cloning and characterization of multigenes encoding the immunodominant 30-kilodalton major outer membrane proteins of Ehrlichia canis and application of the recombinant protein for serodiagnosis*. J.Clin.Microbiol., 1998. **36**(9): p. 2671-2680.
8. DUMLER, J., S., BARBET, A., F., DASCH, G., A., PALMER, G., H., RAY, S., C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F., R., *Reorganization of generas in the family Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales : unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and "HGE agent" as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila*. Int.J.Syst.Evol.Microbiol., 2001. **51**(6): p. 2145-2165.
9. RIKIHISA, Y., *Phylogram of the family Anaplasmataceae*. 2001, Ohio State University.
10. PEREZ, M., RIKIHISA, Y., WEN, B., *Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela : antigenic and genetic characterization*. J.Clin.Microbiol., 1996. **34**(9): p. 2133-2139.
11. PREZIOSI, D., E., LEAH, A., C., *The increasingly complicated story of Ehrlichia*. Comp.Cont.Ed.Pract.Vet., 2002. **24**(4): p. 277-288.
12. YU, X., J., ZHANG, X., F., McBRIDE, J., W., ZHANG, Y., WALKER, D., H., *Phylogenetic relationships of Anaplasma marginale and Ehrlichia platys to other Ehrlichia species determined by GroEL amino acid sequences*. Int.J.Syst.Evol.Microbiol., 2001. **51**(3): p. 1143-1146.
13. SUMNER, J., W., STORCH, G., A., BULLER, R., S., LIDELL, A., M., STOCKHAM, S., L., RIKIHISA, Y., MESSENGER, S., PADDOCK, C., D., *PCR amplification and phylogenetic analysis of groESL operon sequences from Ehrlichia ewingii and Ehrlichia muris*. J.Clin.Microbiol., 2000. **38**: p. 2746-2749.
14. INOKUMA, H., BROUQUI, P., DRANCOURT, M., RAOULT, D., *Citrate synthetase gene sequence : a new tool for phylogenetic analysis and identification of Ehrlichia*. J.Clin.Micobiol., 2001. **39**(9): p. 3031-3039.
15. SUKSAWAT, J., XUEJIE, Y., HANCOCK, S., I., HEGARTY, B.,C., NILKUMHANG, P., BREITSCHWERDT, E., B., *Serologic and molecular evidence of coinfection with multiple vector-borne pathogens in dogs from Thailand*. J.Vet.Int.Med., 2001. **15**(5): p. 453-462.

16. NYINDO, M., B., A., RISTIC, M., HUXSOLL, D., L., SMITH, A., S., *Tropical Canine Pancytopenia : in vitro cultivation of the causative agent - Ehrlichia canis*. Am.J.Vet.Res., 1971. **32**(11): p. 1651-1657.
17. WELLS, M.Y., RIKIHISA, Y., *Lack of lysosomal fusion with phagosomes containing Ehrlichia risticii in P388D1 cells: abrogation of inhibition with oxytetracycline*. Infect.Immun., 1988. **56**: p. 3209-3215.
18. CHOI, K.S., DUMLER, J. S., *Early induction and late abrogation of respiratory burst in A. phagocytophilum-infected neutrophils*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **990**: p. 488-93.
19. WEBSTER, P., IJDO, J.W., CHICOINE, L. M., FIKRIG, E., *The agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis resides in an endosomal compartment*. J Clin Invest, 1998. **101**(9): p. 1932-41.
20. DAVOUST, B., PARZY, D., *Actualité des ehrlichioses*. Bull.Soc.Vet.Prat.France, 1995. **79**(4): p. 183-204.
21. HEMELT, I., E., LEWIS, G., E., HUXSOLL, D., L., STEPHENSON, E., H., *Serial propagation of Ehrlichia canis in primary canine peripheral blood monocyte culture*. Cornell Vet., 1980. **70**: p. 37-42.
22. HOLLAND, C., J., RISTIC, M. *Development of a cell line for continuous in vitro propagation of Ehrlichia canis*. in *Program and abstracts of the IVth international symposium on Rickettsiae and rickettsial diseases*. 1990. Piestany Spa, Czech and Slovak Federal Republics.
23. DAWSON, J., E., RIKIHISA, Y., EWING, S., A., FISHBEIN, D., B., *Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two Ehrlichia canis isolates*. J.Infect.Dis., 1990. **163**: p. 564-567.
24. KEYSARY, A., WANER, T., STRENGER, C., HARRUS, S., *Cultivation of Ehrlichia canis in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line*. J.Vet.Diag.Invest., 2001. **13**(6): p. 521-523.
25. BROWN, J., L., HUXSOLL, D., L., RISTIC, M., HILDEBRANDT, P., K., *In vitro cultivation of Neorickettsia helminthoeca, the causative agent of salmon poisoning disease*. Am.J.Vet.Res., 1972. **33**: p. 1695-1700.
26. RIKIHISA, Y., STILLS, H., ZIMMERMAN, G., *Isolation and continuous culture of Neorickettsia helminthoeca in a macrophage cell line*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(9): p. 1928-33.
27. HEIMER, R., TISDALE, D., DAWSON, J.E., *A single culture system for the propagation of the agents of the human ehrlichioses*. Am.J.Trop.Med.Hyg., 1998. **58**: p. 812-815.
28. FRANK, D.W., MCGUIRE, T.C., GORHAM, J.R., *Cultivation of two species of Neorickettsia in canine monocytes*. J.Inf.Dis., 1974. **129**: p. 163-171.
29. GOODMAN, J.L., NELSON, C., BLAISE, V., MADIGAN, J.E., DUMLER J.S., KURTTI, T.J., MUNDERLOH, U.G., *Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis*. N.Eng.J.Med., 1996. **334**: p. 209-215.
30. WORMSER, G.P., HOROWITZ, H.W., DUMLER, J.S., SCHWARTZLAND, J., AGUERO-ROSENFELD, M., *False-positive Lyme disease serology in human granulocytic ehrlichiosis (letter)*. Lancet, 1996. **347**: p. 981-982.
31. WORMSER, G.P., HOROWITZ, H.W., NOWAKOWSKI, J., MCKENNA, D., DUMLER, J.S., WARD, S., SCHWARTZ, I., CARBONARO, C., AGUERO-ROSENFELD, M., *Positive Lyme disease serology in patients with clinical and laboratory evidence of human granulocytic ehrlichiosis (see comments)*. Am.J.Clin.Pathol., 1997. **107**: p. 142-147.
32. McBRIDE, J., W., YU, X., J., WALKER, D., H., *Molecular cloning of the gene for a conserved major immunoreactive 28-kilodalton protein of Ehrlichia canis :a potential serodiagnostic antigen*. Clin.Diag.Lab.Immun., 1999. **6**(3): p. 392-399.

33. McBRIDE, J., W., YU, X., J., WALKER, D., H., *A conserved, transcriptionally active p28 multigene locus of Ehrlichia canis*. Gene, 2000. **254**(1-2): p. 245-252.
34. HEGARTY, B., C., LEVY, M., G., GAGER, R., F., *Immunoblot analysis of the immunoglobulin G response to Ehrlichia canis in dogs : An international survey*. J.Vet.Diag.Invest., 1997. **9**: p. 32-38.
35. CHAICHANASIRIWITHAYA, W., RIKIHISA, Y., YAMAMOTO, S., REED, S., CRAWFORD, T. B., PERRYMAN, L. E., PALMER, G. H., *Antigenic, morphologic, and molecular characterization of new Ehrlichia risticii isolates*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(12): p. 3026-33.
36. CHEN, S.M., YU, X. J., POPOV, V. L., WESTERMAN, E. L., HAMILTON, F. G., WALKER, D. H., *Genetic and antigenic diversity of Ehrlichia chaffeensis: comparative analysis of a novel human strain from Oklahoma and previously isolated strains*. J Infect Dis, 1997. **175**(4): p. 856-63.
37. ASANOVICH, K.M., BAKKEN, J. S., MADIGAN, J. E., AGUERO-ROSENFELD, M., WORMSER, G. P., DUMLER, J. S., *Antigenic diversity of granulocytic Ehrlichia isolates from humans in Wisconsin and New York and a horse in California*. J Infect Dis, 1997. **176**(4): p. 1029-34.
38. WEN, B., CAO, W., PAN, H., *Ehrlichiae and ehrlichial diseases in China*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **990**: p. 45-53.
39. JONCOUR, G. *Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses. in L'ehrlichiose bovine dans l'OUEST. Restitution des résultats*. 2003. Ploufragan (FRANCE): Union Régionale des Groupements Techniques Vétérinaires de Bretagne.
40. FERNANDEZ-SOTO, P., PEREZ-SANCHEZ, R., ENCINAS-GRANDES, A., *Molecular detection of Ehrlichia phagocytophilum genogroup organisms in larvae of Neotrombicula autumnalis (Acari : Trombiculidae) captured in Spain*. J Parasitol, 2001. **87**(6): p. 1482-3.
41. BAKKEN, J.S., DUMLER, J. S., CHEN, S. M., ECKMAN, M. R., VAN ETTA, L. L., WALKER, D. H., *Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States. A new species emerging ?* J Am Med Assoc, 1994. **272**: p. 212-218.
42. CHEN, S.M., DUMLER, J. S., BAKKEN, J. S., WALKER, D. h., *Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease*. J Clin Microbiol, 1994. **32**: p. 589-595.
43. OGDEN, N.H., BROWN, K., HORROCKS, B.K., WOLDEHIVET, Z., BENNETT, M., *Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in Woodlands and Uplands of the UK*. Med.Vet.Entomol., 1998. **12**: p. 423-429.
44. JONCOUR, G., *Ehrlichiose des ruminants à Anaplasma phagocytophilum*. 2003, <http://www.zoopole.com/ispaia/urgtv2003/eaph.pdf>.
45. HINRICHSSEN, V., L., WHITWORTH, U., G., BREITSCHWERDT, E., B., HEGARTY, B., C., MATHER, T., N., *Assessing the association between the geographic distribution of deer ticks and seropositivity rates to various tick-transmitted disease organism in dogs*. J.Am.Vet.Med.Assoc, 2001. **218**(7): p. 1092-1097.
46. FUKUDA, T., SASAHARA, T., KITAO, T., *Studies on the causative agent of Hyuganetsu disease. XI. Characteristics of rickettsia-like organism isolated from Stellantchasmus falcatus parasitic in grey mullet*. J.Jpn.Assoc.Infect.Dis., 1973. **47**: p. 474-482.
47. FARREL, R., K. *Transmission of two rickettsia-like disease agents of dogs by endoparasites in northwestern USA*. in *1st International Congress of Parasitology*. 1984. Rome, Italy.
48. PALMER, J.E., BENSON, C.E., *Oral transmission of Ehrlichia risticii resulting in Potomac fever*. Vet Rec, 1988. **112**: p. 635.
49. REUBEL, G., H., BARLOUGH, J., E., MADIGAN, J., E., *Production and characterization of Ehrlichia risticii, the agent of Potomac horse fever, from snails*

- (*Pleuroceridae* : *Juga spp.*) in aquarium culture and genetic comparison to equine strains. *J.Clin.Micobiol.*, 1998. **36**: p. 1501-1511.
50. KANTER, M., MOTT, J., OHASHI, N., FRIED, B., REED, S., M., LIN, Y., C., RIKIHISA, Y. *Detection of Ehrlichia risticii in virgulate trematodes of central Ohio and its serial passage in mice.* in *99th Meeting of American Society for Microbiology.* 1999. Chicago, Illinois.
 51. PUSTERLA, N., MADIGAN, J., JOHNSON, E., CHAE, J. S., PUSTERLA, J. B., DE ROCK, E., LAWLER, S. *Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses.* in *Preliminary report on the transmission of ehrlichia risticii, the agent of Potomac Horse Fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors.* 2003. Ploufragan, France: Union Régionale des Groupements Techniques Vétérinaires de Bretagne.
 52. ROUSSET, F., BOUCHON, D., PINTUREAU, B., JUCHAULT, P., SOLIGNAC, M., *Wolbachia endosymbionts responsible for various alteration of sexuality in arthropods.* *Proc.R.Soc.Lond.Biol.*, 1992. **250**: p. 91-98.
 53. WOODY, B., J., HOSKINS, J., D., *Ehrlichial diseases of dogs.* *Vet.Clin.North.Am.Small.Anim.Pract.*, 1991. **21**(1): p. 75-98.
 54. LEWIS, G., E., RISTIC, M., SMITH, R., D., *The brown dog tick Rhipicephalus sanguineus and the dog as experimental hosts of Ehrlichia canis.* *Am.J.Vet.Res.*, 1977. **38**: p. 1953-1955.
 55. HODZIC, E., FISH, D., MARETZKI, C., M., De SILVA, A., M., FENG, S., BARTHOLD, S., W., *Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by Ixodes scapularis ticks.* *J.Clin.Micobiol.*, 1998. **36**: p. 3574-3578.
 56. MADIGAN, J.E., PUSTERLA, N., *Ehrlichial diseases.* *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2000. **16**(3): p. 487-99, ix.
 57. MADIGAN, J.E., PUSTERLA, N., JOHNSON, E., CHAE, J. S., PUSTERLA, J. B., DEROCK, E., and S.P. LAWLER, *Transmission of Ehrlichia risticii, the agent of Potomac horse fever, using naturally infected aquatic insects and helminth vectors: preliminary report.* *Equine Vet J*, 2000. **32**(4): p. 275-9.
 58. LEWIS, G., E., HILL, S., L., RISTIC, M., *Effect of canine immune serum on the growth of Ehrlichia canis within non-immune canine macrophages.* *Am.J.Vet.Res.*, 1978. **39**: p. 71-76.
 59. PHILIP, C., B., HADLOW, W., J., HUGHES, L., E., *Studies on salmon poisoning disease of canines. I. The rickettsial relationships and pathogenicity of Neorickettsia helminthoeca.* *Exp.Parasitol.*, 1954. **3**: p. 336-350.
 60. PALMER, J.E., BENSON, C.E., WITHLOCK, R.H., *Equine ehrlichial colitis resistance to rechallenge in experimental horses and ponies.* *Am.J.Vet.Res.*, 1990. **51**: p. 762-765.
 61. RIKIHISA, Y., PRETZMAN, C.I., JOHNSON, G.C., REED, S.M., YAMAMOTO, S., ANDREWS, F., *Clinical and immunological responses of ponies to Ehrlichia sennetsu and subsequent Ehrlichia risticii challenge.* *Infect.Immun.*, 1988. **56**: p. 2960-2966.
 62. DUPLESSIS, J., L., *Immunity in heartwater. I. A preliminary note on the role of serum antibodies.* *Onderstepoort.J.Vet.Res.*, 1970. **37**: p. 147-150.
 63. NYINDO, M., B., A., RISTIC, M., LEWIS, Jr, G., E., HUXSOLL, D., L., STEPHENSON, E., H., *Immune responses of ponies to experimental infection with Ehrlichia equi.* *Am.J.Vet.Res.*, 1978. **39**: p. 15-18.
 64. MARTIN, M.E., CASPERSEN, K., DUMLER, J. S., *Immunopathology and ehrlichial propagation are regulated by interferon-gamma and interleukin-10 in a murine model of human granulocytic ehrlichiosis.* *Am J Pathol*, 2001. **158**(5): p. 1881-8.
 65. SUN, W., IJDO, J.W., TELFORD, S. R., 3rd, HODZIC, E., ZHANG, Y., BARTHOLD, S. W., FIKRIG, E., *Immunization against the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a murine model.* *J Clin Invest*, 1997. **100**(12): p. 3014-8.

66. RIKIHISA, Y., JOHNSON, G., J., BURGER, C., J., *Reduced immune responsiveness and lymphoid depletion in mice infected with Ehrlichia risticii*. Infect.Immun., 1987. **55**: p. 2215-2222.
67. PARK, J., CHOI, K. S., DUMLER, J. S., *Major surface protein 2 of Anaplasma phagocytophilum facilitates adherence to granulocytes*. Infect Immun, 2003. **71**(7): p. 4018-25.
68. BUNNELL, J.E., TRIGIANI, E. R., SRINIVAS, S. R., DUMLER, J. S., *Development and distribution of pathologic lesions are related to immune status and tissue deposition of human granulocytic ehrlichiosis agent-infected cells in a murine model system*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 546-50.
69. HARRUS, S., BARK, H., WANER, T., *Canine monocytic ehrlichiosis : An update*. Comp.Cont.Ed.Pract.Vet., 1997. **19**(4): p. 431-444.
70. BAKER, D., C., SIMPSON, H., GAUNT, S., D., CORSTVET, R., E., *Acute Ehrlichia platys infection in the dog*. Vet.Pathol., 1987. **24**: p. 449-453.
71. WALKER, D., H., TAYLOR, J., P., BULE, J., S., DEARDEN, C. *Fatal human ehrlichiosis*. in *89th Annual meeting of the American Society for Microbiology*. 1989. Washington, D., C.
72. WHIST, S.K., STORSET, A. K., JOHANSEN, G. M., LARSEN, H. J., *Modulation of leukocyte populations and immune responses in sheep experimentally infected with Anaplasma (formerly Ehrlichia) phagocytophilum*. Vet Immunol Immunopathol, 2003. **94**(3-4): p. 163-75.
73. DUMLER, J.S., *Is human granulocytic ehrlichiosis a new Lyme disease? Review and comparison of clinical, laboratory, epidemiological, and some biological features*. Clin Infect Dis, 1997. **25 Suppl 1**: p. S43-7.
74. DONATIEN, A., LESTOQUARD, F., *Existence en Algérie d'une Rickettsia du chien*. Bull.Soc.Pathol.Exo., 1935. **28**: p. 418-419.
75. EWING, S., A., BUCKNER, R., G., *Manifestations of babesiosis, ehrlichiosis, and combined infection in the dog*. Am.J.Vet.Res., 1965. **26**: p. 815-828.
76. HUXSOLL, D., L., HILDEBRANDT, P., K., NIMS, R., M., *Ehrlichia canis : the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs ?* Vet.Rec., 1969. **85**: p. 587.
77. HARRUS, S., KASS, P., H., KLEMENT, E., WANER, T., *Canine monocytic ehrlichiosis : A retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease*. Vet.Rec, 1997. **141**: p. 360-363.
78. UNVER, A., PEREZ, M., ORENALLA, N., HUANG, H., RIKIHISA, Y., *Molecular and antigenic comparison of Ehrlichia canis isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela*. J.Clin.Micobiol., 2001. **39**(8): p. 2788-2793.
79. HARRUS, S., ALLEMAN, A., R., BARK, H., MAHAN, S., M., WANER, T., *Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with Ehrlichia canis*. Vet Microbiol, 2002. **86**(4): p. 361-368.
80. UNVER, A., RIKIHISA, Y., KAWAHARA, M., YAMAMOTO, S., *Analysis of 16S rRNA gene sequences of Ehrlichia canis, Anaplasma platys, and Wolbachia species from canine blood in Japan*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **990**: p. 692-8.
81. RISTIC, M., HOLLAND, C., J., *Canine ehrlichiosis*, in *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*, W.Z.R. M, Editor. 1993, Pergamon Press: New-York. p. 169-186.
82. MASON, R., J., LEE, J., M., CURRAN, J., M., MOSS, A., VAN DER HEIDE, B., DANIELS, P., W., *Serological survey for Ehrlichia canis in urban dogs from the major population centres of northern Australia*. Aust.Vet.J., 2001. **79**(8): p. 559-562.
83. NEER, T.M., et al., *Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM*. American College of Veterinary Internal Medicine. J Vet Intern Med, 2002. **16**(3): p. 309-15.

84. BEAUFILS, J.-P., MARTIN-GRANEL, J., JUMELLE, P., *Infection du chat par une Ehrlichia sp. : à propos de trois cas*. Prat.Med.Chir.Anim.Comp., 1995. **30**.
85. BEAUFILS, J.-P., BREITSCHWERDT, E., B., HANCOCK, S., I., HEGARTY, B., C., MARTIN-GRANEL, J., JUMELLE, Ph., BARBAULT-JUMELLE, M., BLAVIER, A., *Ehrlichiose féline : identification génétique de l'agent chez deux chats*. Prat.Med.Chir.Anim.Comp., 2002. **37**: p. 235-238.
86. ALLSOPP, M., T., E., P., ALLSOPP, B., A., *Novel Ehrlichia genotype detected in dogs in South Africa*. J.Clin.Microbiol., 2001. **39**(11): p. 4204-4207.
87. KONTOS, V., I., PAPADOPOULOS, O., FRENCH, T., W., *Natural and experimental canine infection with a greek strain of Ehrlichia platys*. Vet.Clin.Path., 1991. **20**(4): p. 101-105.
88. KORDICK, S., K., BREITSCHWERDT, E., B., HEGARTY, B., C., SOUTHWICK, K., L., COLITZ, C., M., HANCOCK, S., I., BRADLEY, J., M., RUMBOUGH, R., McPHERSON, J., T., McCORMACK, J., N., *Coinfection with multiple Tick-borne pathogens in a Walker Hound kennel in North Carolina*. J.Clin.Microbiol., 1999. **37**(8): p. 2631-2638.
89. FRANK, J., R., BREITSCHWERDT, E., B., *A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia*. J.Vet.Int.Med., 1999. **13**: p. 194-201.
90. DAVOUST, B., PARZY, D., PUBERT, D., *Bilan de dix années de surveillance épidémiologique de l'ehrlichiose dans les chenils militaires corses*. Rec.Med.Vet., 1994. **170**(8/9): p. 531-537.
91. BREITSCHWERDT, E., B., HEGARTY, B., C., HANCOCK, S., I., *Sequential evaluation of dogs naturally infected with Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii and Bartonella vinsonii*. J.Clin.Microbiol., 1998. **36**(9): p. 2645-2651.
92. McDADE, J., E., *Ehrlichiosis-A disease of Animals and Humans*. J.Inf.Dis., 1990. **161**: p. 609-617.
93. HILDEBRANDT, P., K., HUXSOLL, D., L., WALKER, R., M., *Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia)*. Am.J.Vet.Res., 1973. **34**: p. 1309-1320.
94. NYINDO, M., HUXSOLL, D., L., RISTIC, M., *Cell-mediated and humoral responses of German shepherd dogs and Beagles to experimental infection with Ehrlichia canis*. Am.J.Vet.Res., 1980. **41**: p. 250.
95. DAVOUST, B., PARZY, D., PUBERT, D., MARTET, G., DEPARIS, X., OTT, D., *Signes hématologiques de l'ehrlichiose canine aiguë*. Rev.Méd.Vét., 1996. **147**(1): p. 69-74.
96. WANER, T., ROSNER, M., HARRUS, S., NAVEH, A., ZASS, R., KEYSARY, A., *Detection of ehrlichial antigen in plasma of Beagle dogs with experimental acute Ehrlichia canis infection*. Vet.Parasitol., 1996. **63**: p. 331-335.
97. HARRUS, S., WANER, T., AIZENBERG, I., FOLEY, J., E., POLAND, A., M., BARK, H., *Amplification of Ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with Ehrlichia canis*. J.Clin.Microbiol., 1998. **36**(1): p. 73-76.
98. RISTIC, M., MOREAU, Y., *Infections humaines et animales dues à des rickettsies du genre Ehrlichia*. Sci.Vét.Méd.Comp., 1987. **89**(4): p. 161-171.
99. JOHNSON, E.M., EWING, S. A., BARKER, R. W., FOX, J. C., CROW, D. W., KOCAN, K. M., *Experimental transmission of Ehrlichia canis (Rickettsiales: Ehrlichieae) by Dermacentor variabilis (Acari: Ixodidae)*. Vet Parasitol, 1998. **74**(2-4): p. 277-88.
100. SUTO, Y., SUTO, A., INOKUMA, H., OBAYASHI, H., HAYASHI, T., *First confirmed canine case of Ehrlichia canis infection in Japan*. Vet.Rec, 2001. **148**(26): p. 809-811.
101. HUA, P., YUHAI, M., SHIDE, T., YANG, S., BOHAI, W., XIANGRUI, C., *Canine ehrlichiosis caused simultaneously by Ehrlichia canis and Ehrlichia platys*. Microbiol.Immunol., 2000. **44**(9): p. 737-739.

102. BATMAZ, H., NEVO, E., WANER, T., SENTURK, S., YILMAZ, Z., HARRUS, S., *Seroprevalence of Ehrlichia canis antibodies among dogs in Turkey*. Vet.Rec, 2001. **148**(21): p. 665-666.
103. TROTZ-WILLIAMS, L.A., TREES, A. J., *Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe*. Vet Rec, 2003. **152**(4): p. 97-105.
104. GLASER, B., GOTHE, R., [*Imported arthropod-borne parasites and parasitic arthropods in dogs. Species spectrum and epidemiologic analysis of the cases diagnosed in 1995/96*]. Tierarztl Prax Ausg K Klientiere Heimtiere, 1998. **26**(1): p. 40-6.
105. PUSTERLA, N., DEPLAZES, P., BRAUN, U., LUTZ, H., *Serological evidence of infection with Ehrlichia spp. in red foxes (Vulpes vulpes) in Switzerland*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(4): p. 1168-9.
106. HARRUS, S., WANER, T., BARK, H., *Pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis-Recent advances*. 1998: Utrecht.
107. HARRUS, S., DAY, M., J., WANER, T., BARK, H., *Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia canis*. Vet Microbiol, 2001. **83**(4): p. 343-349.
108. MESSICK, J., B., RIKIHISA, Y., *Presence of parasite antigen on the surface of P388D1 cells infected with Ehrlichia risticii*. Infect.Immun., 1992. **60**: p. 3079-3086.
109. HARRUS, S., WANER, T., AIZENBERG, I., BARK, H., *Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis : Evaluation of a 6-week course*. J.Clin.Micobiol., 1998. **36**(7): p. 2140-2142.
110. HARRUS, S., WANER, T., KEYSARY, A., AROCH, I., VOET, H., BARK, H., *Investigation of splenic functions in canine monocytic ehrlichiosis*. Vet.Immun.and Immunopath., 1998. **62**: p. 15-27.
111. SMITH, R., D., HOOKS, J., E., HUXSOLL, D., L., RISTIC, M., *Canine ehrlichiosis (Tropical canine pancytopenia) : survival of phosphorus-32-labelled blood platelets in normal and infected dogs*. Am.J.Vet.Res., 1974. **35**: p. 269-273.
112. KAKOMA, I., CARSON., C., A., RISTIC, M., *Direct and indirect lymphocyte participation in the immunity and immunopathology of tropical canine pancytopenia- A review*. Comp.Immun.Microbiol.Infect.Dis, 1980. **3**: p. 291-298.
113. PIERCE, K., R., MARRS, G., E., HIGHTOWER, D., *Acute canine ehrlichiosis : Platelet survival and factor 3 assay*. Am.J.Vet.Res., 1977. **38**(1): p. 1821-1825.
114. WANER, T., HARRUS, S., WEISS, D., J., BARK, H., KEYSARY, A., *Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis*. Vet.Immun.and Immunopath., 1995. **48**: p. 177-182.
115. HARRUS, S., WANER, T., WEISS, D., J., *Kinetics of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis*. Vet.Immun.Immunopathol., 1996. **51**: p. 13-20.
116. WANER, T., LEYKIN, I., SHINITSKY, M., SHARABANI, E., BUCH, H., KEYSARY, A., BARK, H., HARRUS, S., *Detection of platelet-bound antibodies in Beagle dogs after artificial infection with Ehrlichia canis*. Vet.Immun.Immunopathol., 2000. **77**(1-2): p. 145-150.
117. LOVERING, S., L., PIERCE, K., R., ADAMS, L., G., *Serum complement and blood platelet adhesiveness in acute canine ehrlichiosis*. Am.J.Vet.Res., 1980. **41**(8): p. 1266-1271.
118. SMITH, R., D., RISTIC, M., HUXSOLL, D., L., *Platelet kinetics in canine ehrlichiosis : evidence for increased platelet destruction as the cause of thrombocytopenia*. Infect.Immun., 1975. **11**: p. 1216-1221.
119. HARRUS, S., WANER, T., ELDOR, A., ZWANG, E., BARK, H., *Platelet dysfunction associated with experimental acute canine ehrlichiosis*. Vet.Rec, 1996. **September 21**: p. 290-293.

120. DAVOUST, B., PARZY, D., VIDOR, E., HASSELOT, N., MARTET, G., *Ehrlichiose canine expérimentale. Etude clinique et thérapeutique*. Rec.Med.Vet., 1991. **Janvier**: p. 33-40.
121. BUHLES, W., C., HUXSOLL, D., L., HILDEBRANDT, P., K., *Tropical Canine Pancytopenia : Role of aplastic anaemia in the pathogenesis of severe disease*. J.Comp.Path., 1975. **85**: p. 511-521.
122. KNOSPE, W., H., CROSBY, W., H., *Aplastic anemia : a disorder of the bone-marrow sinousoïdal microcirculation rather than stem-cell failure*. Lancet, 1971. **2**: p. 20-22.
123. HARRUS, S., WANER, T., AVIDAR, Y., BOGIN, E., PEH, H., BARK, H., *Serum protein alterations in canine ehrlichiosis*. Vet.Parasitol., 1996. **66**: p. 241-249.
124. RIKIHISA, Y., YAMAMOTO, S., KWAK, I., *C-reactive protein and alpha-1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis*. J.Clin.Micobiol., 1994. **32**: p. 912-917.
125. SHIMADA, T., et al., *Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with Ehrlichia canis*. Vet Res Commun, 2002. **26**(3): p. 171-7.
126. REARDON, M., J., PIERCE, K., R., *Acute experimental canine ehrlichiosis : I. sequential reaction of the hemic and reticular system*. Vet.Pathol., 1981. **18**: p. 48-61.
127. WEISIGER, R., M., RISTIC, M., HUXSOLL, D., L., *Kinetics of antibody response to Ehrlichia canis assayed by the indirect fluorescent antibody method*. Am.J.Vet.Res., 1975. **36**(5): p. 689-694.
128. GHORBEL, A., CLERC, B., CADORE, J.L., DJAIEM, A., SAYN, M.J., *Ehrlichiose asymptomatique. Etude de l'électrophorèse des protéines sériques*. Rec.Med.Vet., 1993. **169**(7): p. 561-566.
129. BARR, S.C., *Ehrlichiosis*, in *The 5-Minutes Veterinary Consult - 2nd ED.*, F.W.K. Smith-Jr., Editor. 2000, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Pennsylvania. p. 644-645.
130. RIKIHISA, Y., EWING, S. A., FOX, J. C., SIREGAR, A. G., PASARIBU, F. H., MALOLE, M. B., *Analyses of Ehrlichia canis and a canine granulocytic Ehrlichia infection*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(1): p. 143-8.
131. IQBAL, Z., RIKIHISA, Y., *Reisolation of Ehrlichia canis from blood and tissues of dogs after doxycycline treatment*. J.Clin.Microbiol., 1994. **32**(7): p. 1644-1649.
132. HARRUS, S., BANETH, G., WANER, T., STRAUSS-AYALI, D., JONGEJAN, F., HECHT, G., BARK, H. *Predominant immunoglobulin-G2 subtype response in dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia canis*. in *ESVIM 2000, 10th congress*. 2000. Neuchâtel, Switzerland.
133. HARRUS, S., WANER, T., STRAUSS-AYALI, D., BARK, H., JONGEJAN, F., HECHT, G., BANETH, G., *Dynamics of IgG1 and IgG2 subclass response in dogs naturally and experimentally infected with Ehrlichia canis*. Vet. Parasitol., 2001. **99**(1): p. 63-71.
134. WANER, T., STRENGER, C., KEYSARY, A., *Comparison of a clinic-based ELISA test kit with the immunofluorescence test for the assay of Ehrlichia canis antibodies in dogs*. J.Vet.Diag.Invest., 2000. **12**(3): p. 240-244.
135. NYINDO, M., KAKOMA, I., HANSEN, R., *Antigenic analysis of four species of the genus Ehrlichia by use of protein immunoblot*. Am.J.Vet.Res., 1991. **52**(8): p. 1225-1230.
136. OHASHI, N., RIKIHISA, Y., UNVER, A., *Analysis of transcriptionally active gene clusters of major outer membrane protein multigene family in Ehrlichia canis and E. chaffeensis*. Infect.Immun., 2001. **69**(4): p. 2083-2091.
137. REDDY, G., R., STRECK, C., P., *Variability in the 28-kDa surface antigen protein multigene locus of isolates of the emerging disease agent Ehrlichia chaffeensis suggests that it plays a role in immune evasion*. Moll.Cell.Biol.Res.Commun., 1999. **1**(3): p. 167-175.

138. UNVER, A., OHASHI, N., TAJIMA, T., STICH, R., W., GROVER, D., RIKIHISA, Y., *Transcriptional analysis of p30 major outer membrane multigene family of Ehrlichia canis in dogs, ticks, and cell cultures at different temperatures.* Infect.Immun., 2001. **69**(10): p. 6172-6178.
139. BUHLES, W., C., HUXSOLL, D., L., RISTIC, M., *Tropical canine pancytopenia : Clinical, hematologic and serologic response of dogs to Ehrlichia canis infection, tetracycline therapy, and challenge inoculation.* J.Infect.Dis., 1974. **130**: p. 357-367.
140. HUXSOLL, D., L., AMYX, H., L., HEMELT, I., E., *Laboratory studies of tropical canine pancytopenia.* Exp.Parasitol., 1972. **31**: p. 53-59.
141. BROUQUI, P., DUMLER, J., S., RAOULT, D., WALKER, D., H., *Antigenic characterization of Ehrlichiae : protein immunoblotting of Ehrlichia canis, Ehrlichia sennetsu, and Ehrlichia risticii.* J.Clin.Micobiol., 1992. **30**(5): p. 1062-1066.
142. CODNER, E., C., FARRIS-SMITH, L., *Characterization of the subclinical phase of ehrlichiosis in dogs.* J.Am.Vet.Med.Assoc, 1986. **189**: p. 47-50.
143. TROY, G., C., VULGAMOTT, J., C., TURNWALD, G., H., *Canine ehrlichiosis : A retrospective study of 30 naturally occurring cases.* J.Am.Anim.Hosp.Assoc., 1980. **16**: p. 181-187.
144. CARLOTTI, D., N., BENSIGOR, E., *Manifestations dermatologiques de l'ehrlichiose canine.* Point.Vet.: p. 325-326.
145. KUEHN, N., F., GAUNT, S., D., *Clinical and hematologic findings in canine ehrlichiosis.* J.Am.Vet.Med.Assoc, 1985. **186**(4): p. 355-358.
146. BURHGEN, G., A., BEISEL, W., R., WALKER, J., S., NIMS, R., M., HUXSOLL, D., L., HILDEBRANDT, P., K., *Development of hypergammaglobulinemia in tropical canine pancytopenia.* Am.J.Vet.Res., 1971. **32**: p. 749-756.
147. HOSKINS, J., D., BARTA, O., ROTHSCHMITT, J., *Serum hyperviscosity syndrome associated with Ehrlichia canis infection in a dog.* J.Am.Vet.Med.Assoc., 1983. **183**(9): p. 1011-1012.
148. AMYX, H., L., HUXSOLL, D., *Therapeutic and prophylactic value of tetracycline in dogs infected with the agent of tropical canine pancytopenia.* J.Am.Vet.Med.Assoc, 1971. **159**(11): p. 1428-1432.
149. BROUQUI, P., RAOULT, D., *Susceptibilities of Ehrlichia canis to antibiotics, in Antimicrobial agents and intracellular pathogens, C. press, Editor. 1993, Boca Raton. p. 181-199.*
150. NEER, T., M., EDDLESTONE, S., M., GAUNT, S., D., CORSTVET, R., E., *Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced Ehrlichia canis infection.* J.Vet.Int.Med., 1999. **13**(5): p. 501-504.
151. HARVEY, J., W., SIMPSON, C., F., GASKIN, J. M., *Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs.* J.Infect.Dis., 1978. **137**(2): p. 182-188.
152. FRENCH, T., W., HARVEY, J., W., *Serological diagnosis of infectious cyclic thrombocytopenia in dogs using indirect fluorescent antibody test.* Am.J.Vet.Res., 1983. **44**(12): p. 2407-2411.
153. BEAUFILS, J.-P., *Un syndrome s'accompagnant d'inclusions plaquettaires chez le chien dans la région de Montpellier : description et comparaison aux affections engendrées par Ehrlichia canis et Ehrlichia platys.* 1985, Université Claude Bernard: Lyon.
154. HARRUS, S., AROCH, I., LAVY, E., BARK, H., *Clinical manifestations of infectious canine cyclic thrombocytopenia.* Vet Rec, 1997. **141**(10): p. 247-50.
155. CHAE, J.S., KIM, C. M., KIM, E. H., HUR, E. J., KLEIN, T. A., KANG, T. K., LEE, H. C., SONG, J. W., *Molecular epidemiological study for tick-borne disease (Ehrlichia and Anaplasma spp.) surveillance at selected U.S. military training sites/installations in Korea.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **990**: p. 118-25.
156. CHANG, A.C., CHANG, W. L., LIN, C. T., PAN, M. J., LEE, S. C., *Canine infectious cyclic thrombocytopenia found in Taiwan.* J Vet Med Sci, 1996. **58**(5): p. 473-6.

157. MOTOI, Y., SATOH, H., INOKUMA, H., KIYUUNA, T., MURAMATSU, Y., UENO, H., MORITA, C., *First detection of Ehrlichia platys in dogs and ticks in Okinawa, Japan.* Microbiol Immunol, 2001. **45**(1): p. 89-91.
158. INOKUMA, H., OHNO, K., ONISHI, T., RAOULT, D., BROUQUI, P., *Detection of ehrlichial infection by PCR in dogs from Yamagushi and Okinawa Prefectures, Japan.* J.Vet.Med.Sci, 2001. **63**(7): p. 815-817.
159. INOKUMA, H., FUJII, K., MATSUMOTO, K., OKUDA, M., NAKAGOME, K., KOSUGI, R., HIRAKAWA, M., ONISHI, T., *Demonstration of Anaplasma (Ehrlichia) platys inclusions in peripheral blood platelets of a dog in Japan.* Vet Parasitol, 2002. **110**(1-2): p. 145-52.
160. SAINZ, A., AMUSATEGUI, I., TESOURO, M. A., *Ehrlichia platys infection and disease in dogs in Spain.* J Vet Diagn Invest, 1999. **11**(4): p. 382-4.
161. BROWN, G. K., MARTIN, A., R., ROBERTS, T., K., AITKEN, R., J., *Detection of Ehrlichia platys in dogs in Australia.* Aust.Vet.J., 2001. **79**(8): p. 554-558.
162. ARRAGA-ALVARADO, C., MONTERO-OJEDA, M., BERNARDONI, A., ANDERSON, B. E., PARRA, O., *[Human ehrlichiosis: report of the 1st case in Venezuela].* Invest Clin, 1996. **37**(1): p. 35-49.
163. ARRAGA-ALVARADO, C., PALMAR, M., PARRA, O., SALAS, P., *Fine structural characterisation of a Rickettsia-like organism in human platelets from patients with symptoms of ehrlichiosis.* J Med Microbiol, 1999. **48**(11): p. 991-7.
164. ARRAGA-ALVARADO, C., PALMAR, M., PARRA, O., SALAS, P., *Ehrlichia platys (Anaplasma platys) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections.* Vet Pathol, 2003. **40**(2): p. 149-56.
165. INOKUMA, H., RAOULT, D., BROUQUI, P., *Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(11): p. 4219-21.
166. HOSKINS, J.D., BREITSCHWERDT, E.B., GAUNT, S.D., FRENCH, T.W., BURGDORFER, W., *Antobodies to Ehrlichia canis, Ehrlichia platys and spotted fever groupe rickettsiae in Louisiana dogs.* J.Vet.Int.Med., 1988. **2**: p. 55-59.
167. PAROLA, P., CORNET, J. P., SANONGO, Y. O., MILLER, R. S., THIEN, H. V., GONZALEZ, J., P., RAOULT, D., TELFORD, Iii Sr, WONGSRICHANALAI, C., *Detection of Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Rickettsia spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam.* J Clin Microbiol, 2003. **41**(4): p. 1600-8.
168. DU PLESSI, L., REYERS, F., STEVENS, K., *Morphological evidence for infection of impala, Aepyceros melampus, platelets by a rickettsia-like organism.* Onderstepoort J Vet Res, 1997. **64**(4): p. 317-8.
169. SIMPSON, R.M., GAUNT, S. D., *Immunocytochemical detection of Ehrlichia platys antigens in canine blood platelets.* J Vet Diagn Invest, 1991. **3**(3): p. 228-31.
170. GAUNT, S.D., BAKER, D. C., BABIN, S. S., *Platelet aggregation studies in dogs with acute Ehrlichia platys infection.* Am J Vet Res, 1990. **51**(2): p. 290-3.
171. BAKER, D., C., GAUNT, S., D., BABIN, S., S., *Anemia of inflammation in dogs infected with Ehrlichia platys.* Am.J.Vet.Res., 1988. **49**(7): p. 1014-1016.
172. CHANG, W.L., SU, W. L., PAN, M. J., *Two-step PCR in the evaluation of antibiotic treatment for Ehrlichia platys infection.* J Vet Med Sci, 1997. **59**(9): p. 849-51.
173. EWING, S., A., ROBERSON, W., R., BUCKNER, R., G., *A new strain of Ehrlichia canis.* J.Am.Vet.Med.Assoc., 1971. **159**: p. 1771-1774.
174. MADEWELL, B., R., GRIBBLE, D., H., *Infection in two dogs with an agent resembling Ehrlichia equi.* J.Am.Vet.Med.Assoc., 1982. **180**(5): p. 512-514.
175. MAGNARELLI, L., A., IJDO, J., W., ANDERSON, J., F., MADIGAN, J., E., DUMLER, J., S., FIKRIG, E., *Antibodies to Ehrlichia equi in dogs from the northeastern United States.* J.Am.Vet.Med.Assoc., 1997. **211**(9): p. 1134-1137.

176. MARETZKI, C., H., FISHER, D., J., GREENE, C., E., *Granulocytic ehrlichiosis and meningitis in a dog*. J.Am.Vet.Med.Assoc., 1994. **205**(11): p. 1554-1556.
177. BEAUFILS, J.-P., LEGROUX, J.-P., *Présence simultanée d'Ehrlichia sp. et d'Hepatozoon canis dans des granulocytes de chiens : A propos de 2 cas*. Prat.Med.Chir.Anim.Comp., 1992. **27**(1): p. 81-86.
178. CLARK, A., M., HOPKINS, G., F., McLEAN, I., A., *Tick-borne fever in dogs*. Vet.Rec., 1996. **14**: p. 268.
179. EGENVALL, A., E., HEDHAMMAR, A., A., BJÖERSDORFF, A., I., *Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden*. Vet.Rec., 1997. **140**: p. 222-226.
180. PUSTERLA, N., HUDER, J., WOLFENSBERGER, C., LITSCHI, B., PARVIS, A., LUTZ, H., *Granulocytic ehrlichiosis in two dogs in Switzerland*. J.Clin.Microbiol., 1997. **35**(9): p. 2307-2309.
181. BULLER, R., S., ARENS, M., HMIEL, S., P., PADDOCK, C., D., SUMNER, J., W., RIKIHISA, Y., UNVER, A., GAUDERAULT-KEENER, M., MANIAN, F., A., LIDDELL, A., M., SCHMULEWITZ, N., STORCH, G., A., *Ehrlichia ewingii, a newly recognized agent of human ehrlichiosis*. N.Eng.J.Med., 1999. **341**: p. 148-155.
182. STOCKHAM, S., L., SCHMIDT, D., A., CURTIS, K., S., SCHAUF, B., G., TYLER, J., W., SIMPSON, S., T., *Evaluation of granulocytic ehrlichiosis in dogs of Missouri, including serologic status to Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi*. Am.J.Vet.Res., 1992. **53**(1): p. 63-68.
183. GOLDMAN, E., E., BREITSCHWERDT, E., B., GRINDEM, C., B., HEGARTY, B., C., WALLS, J., J., DUMLER, J., S., *Granulocytic ehrlichiosis in dogs from North Carolina and Virginia*. J.Vet.Int.Med., 1998. **12**: p. 61-70.
184. GOODMAN, R.A., HAWKINS, E.C., OLBY, W.J., GRINDEM, C.B., HEGATY, B., BREITSCHWERDT, E.B., *Molecular identification of Ehrlichia ewingii infection in dogs: 15 cases (1997-2001)*. J.Am.Vet.Med.Assoc, 2003. **222**(8): p. 1102-1107.
185. ASIYA, G., A., BULLER, R., S., STORCH, G., A., HUYCKE, M., M., MACHADO, L., J., SLATER, L., N., STOCKHAM, S., L., MASSUNG, R., F., *Identification of a p28 gene in Ehrlichia ewingii : Evaluation of gene for use as a target for a species-specific PCR diagnostic assay*. J.Clin.Micobiol., 2001. **39**(11): p. 3871-3876.
186. RIKIHISA, Y., EWING, S. A., FOX, J. C., *Western immunoblot analysis of Ehrlichia chaffeensis, E. canis, or E. ewingii infections in dogs and humans*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(9): p. 2107-12.
187. BELLAH, J., R., SCHULL, R., M., SHULL SELCER, E., V., *Ehrlichia canis-related polyarthritits in a dog*. J.Am.Vet.Med.Assoc, 1986. **189**: p. 922-923.
188. ANDERSON, B., E., GREENE, C., E., JONES, D., C., *Ehrlichia ewingii sp.nov., the ætiologic agent of canine granulocytic ehrlichiosis*. Int.j.Syst.Bacteriol., 1992. **42**: p. 299-302.
189. LEWIS, G., E., HUXSOLL, D., L., RISTIC, M, JOHNSON, A., J., *Experimentally induced infection of dogs, cats and nonhuman primates with Ehrlichia equi, the etiologic agent of equine ehrlichiosis*. Am.J.Vet.Res., 1975. **36**(1): p. 85-88.
190. GREIG, B., ASANOVICH, K., M., ARMSTRONG, P., J., DUMLER, S., J., *Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs*. J.Clin.Microbiol., 1996. **34**(1): p. 44-48.
191. JOHANSSON, K., E., PETTERSSON, B., UHLEN, M., GUNNARSSON, A., MALMOVIST, M., OLSSON, E., *Identification of the causative agent of the granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16S-rRNA gene*. Res.Vet.Sci., 1995. **58**: p. 109-112.
192. NATASA, T., PETROVEC, M., AVSI, T. *Clinical features and hematological alterations in dogs serologically positive to Ehrlichia phagocytophila*. in *ESVIM, 10th congress*. 2000. Neuchâtel, Switzerland.

193. ARNEZ, M., PETROVEC, M., LOTRIC-FURLAN, S., ZUPANC, T., A., STRLE, F., *First european pediatric case of human granulocytic ehrlichiosis*. J.Clin.Microbiol., 2001. **39**(12): p. 4591-4592.
194. DUMLER, J.S., ASANOVICH, K. M., BAKKEN, J. S., *Analysis of genetic identity of North American Anaplasma phagocytophilum strains by pulsed-field gel electrophoresis*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3392-4.
195. SIDEL'NIKOV Iu, N., MEDIANNIKOV, OIu, IVANOV, L. I., ZDANOVSKAIA, N. I., *[The first case of granulocytic ehrlichiosis in the Far East of the Russian Federation]*. Klin Med (Mosk), 2003. **81**(2): p. 67-8.
196. BOWN, K.J., BEGON, M., BENETT, M., WOLDEHIWET, Z., OGDEN, N. H., *Seasonal dynamics of Anaplasma phagocytophila in a rodent-tick (Ixodes trianguliceps) system, United Kingdom*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(1): p. 63-70.
197. GOETHERT, H.K., TELFORD, S. R., 3rd, *Enzootic transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis among cottontail rabbits*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **68**(6): p. 633-7.
198. DAS, S., DEPONTE, K., MARCANTONIO, N. L., IJDO, J. W., HODZIC, E., KATAVOLOS, P., BATHOLD, S. W., TELFORD, S. R., 3rd, KANTOR, F. S., FIKRIG, E., *Granulocytic ehrlichiosis in tick-immune guinea pigs*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1803-5.
199. HODZIC, E., IJDO, J. W., FENG, S., KATAVOLOS, P., SUN, W., MARETZKI, C. H., FISH, D., FIKRIG, E., TELFORD, S. R., 3rd, BATHOLD, S. W., *Granulocytic ehrlichiosis in the laboratory mouse*. J Infect Dis, 1998. **177**(3): p. 737-45.
200. VOLDOIRE, E., GIRAUD, N., VASSALLO, N., ALOGNINOIWA, T., *Un cas d'ehrlichiose bovine en région Rhône-Alpes*. Point.Vet., 2002. **33**(228): p. 68-71.
201. SUKSAWAT, J., HEGARTY, B.,C., BREITSCHWERDT, E., B., *Seroprevalence of Ehrlichia canis, Ehrlichia equi and Ehrlichia risticii in sick dogs from North Carolina and Virginia*. J.Vet.Intern.Med., 2000. **14**: p. 50-55.
202. RODGERS, S., J., MORTON, R., J., BALDWIN, C., A., *A serological survey of Ehrlichia canis, Ehrlichia equi, Rickettsia rickettsii and Borrelia burgdorferi*. J.Vet.Diag.Invest., 1989. **1**: p. 154-159.
203. MAGNARELLI, L., A., IJDO, J., W., VAN ANDEL, A., E., WU, C., FIKRIG, E., *Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in dogs and horses*. Am.J.Vet.Res., 2001. **62**(1): p. 29-32.
204. WANER, T., STRENGER, C., KEYSARY, A., HARRUS, S., *Kinetics of serologic cross-reactions between Ehrlichia canis and the Ehrlichia phagocytophyla genogroups in experimental E. canis infection in dogs*. Vet.Immun.and Immunopath., 1998. **66**: p. 237-243.
205. DUMLER, J., S., ASANOVICH, K., M., BAKKEN, J., S., RICHTER, P., KIMSEY, R., MADIGAN, J., E., *Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila, and Human Granulocytic Ehrlichia*. J.Clin.Microbiol., 1995. **33**(5): p. 1098-1103.
206. IJDO, J.W., SUN, W., ZHANG, Y., MAGNARELLI, L. A., FIKRIG, E., *Cloning of the gene encoding the 44-kilodalton antigen of the agent of human granulocytic ehrlichiosis and characterization of the humoral response*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3264-9.
207. MAGNARELLI, L., A., IJDO, J., W., VAN ANDEL, A., E., WU, C., OLIVER Jr, J., H., FIKRIG, E., *Reactivity of serum samples of dogs and horses tested by use of class-specific recombinant-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of granulocytic ehrlichiosis*. Am.J.Vet.Res., 2001. **62**(9): p. 1365-1370.
208. IJDO, J.W., WU, C., TELFORD, S. R., 3rd, FIKRIG, E., *Differential expression of the p44 gene family in the agent of human granulocytic ehrlichiosis*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 5295-8.

209. BROWN, W.C., BRAYTON, K. A., STYER, C. M., PALMER, G. H., *The hypervariable region of Anaplasma marginale major surface protein 2 (MSP2) contains multiple immunodominant CD4+ T lymphocyte epitopes that elicit variant-specific proliferative and IFN-gamma responses in MSP2 vaccinates.* J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3790-8.
210. IJDO, J.W., ZHANG, Y., ANDERSON, M. L., GOLDBERG, D., FIKRIG, E., *Heat shock protein 70 of the agent of human granulocytic ehrlichiosis binds to Borrelia burgdorferi antibodies.* Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(1): p. 118-20.
211. SHAW, S., KENNY, M., DAY, M., BIRTLES, R., HOLDEN, D., GERMAN, A., CRAVEN, M., CHANDLER, M., GAROSI, L., *Canine granulocytic ehrlichiosis in the UK.* Vet Rec, 2001. **148**(23): p. 727-8.
212. BUITRAGO, M.I., IJDO, J. W., RINAUDO, P., SIMON, H., COPEL, J., GADBOW, J., HEIMER, R., FIKRIG, E., BIA, F. J., *Human granulocytic ehrlichiosis during pregnancy treated successfully with rifampin.* Clin Infect Dis, 1998. **27**(1): p. 213-5.
213. MAURIN, M., BAKKEN, J.S., DUMLER, J.S., *Antibiotic susceptibilities of Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum strains from various geographics aeras in the United States.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(1): p. 413-415.
214. RISTIC, M., DAWSON, J., HOLLAND, C., J., JENNY, A., *Susceptibility of dogs to infection with Ehrlichia risticii, causative agent of equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever).* Am.J.Vet.Res., 1988. **49**(9): p. 1497-1500.
215. KAKOMA, I., HANSEN, R., LIU, L., FEDRIGON, S., BELLAMY, K., *Serologically atypical canine ehrlichiosis associated with Ehrlichia risticii "infection".* J Am Vet Med Assoc, 1991. **199**(9): p. 1120.
216. KAKOMA, I., HANSEN, R., D., ANDERSON, B., E, HANLEY, T., A., SIMS, K., G., BELLAMY, C., LONG, M., T., BAEK, B., K., *Cultural, molecular and immunological characterization of the etiologic agent for atypical canine ehrlichiosis.* J.Clin.Microbiol., 1994. **32**(1): p. 170-175.
217. DAVOUST, B., PARZY, D. *A.phagocytophilum chez le chien et le chat en France et en Europe.* in *Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses.* 2003. Ploufragan - FRANCE: Union Régionale des Groupement Techniques Vétérinaires de Bretagne.
218. CORDY, D., R., GORHAM, J., R., *The pathology and ætiology of salmon disease in the dog and fox.* Am.J.Pathol., 1950. **26**: p. 617-637.
219. MAEDA, K., MARKOWITZ, N., HAWLEY, R., C., RISTIC, M., COX, D., McDADE, J., E., *Human infection with Ehrlichia canis, a leukocytic rickettsia.* N.Eng.J.Med., 1987. **316**: p. 853-856.
220. KALLICK, C., A., LEVIN, S., REDDI, K., T. *Association of rickettsia-like agent identified in human bone marrow failure with Ehrlichia canis and tropical canine pancytopenia.* in *13th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy.* 1973. Washington, D., C.
221. DAWSON, J., E., ANDERSON, B., E., FISHBEIN, D., B., SANCHEZ, J., L., GOLDSMITH, C., S., WILSON, K., H., DUNTLEY, C., W., *Isolation and characterization of an Ehrlichia sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis.* J.Clin.Micobiol., 1991. **29**(12): p. 2741-2745.
222. ANDERSON, B., E., DAWSON, J., E., JONES, D., C., *Ehrlichia chaffeensis, a new species associated with human ehrlichiosis.* J.Clin.Micobiol., 1991. **29**: p. 2838-2842.
223. DAWSON, J., E., EWING, S., A., *Susceptibility of dogs to infection to Ehrlichia chaffeensis, causative agent of human ehrlichiosis.* Am.J.Vet.Res., 1992. **53**(8): p. 1322-1327.
224. DAWSON, J., E., BIGGIE, K., L., WARNER, C., K., COOKSON, K., JENKINS, S., LEVINE, J., F., OLSON, J., G., *Polymerase chain reaction evidence of Ehrlichia chaffeensis, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia.* Am.J.Vet.Res., 1996. **57**(8): p. 1175-1179.

225. CAO, W.C., GAO, Y. M., ZHANG, P. H., ZHANG, X. T., DAI, Q. H., DUMLER, J. S., FANG, L. Q., YANG, H., *Identification of Ehrlichia chaffeensis by nested PCR in ticks from Southern China*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(7): p. 2778-80.
226. PRETORIUS, A.M., KELLY, P. J., *Serological survey for antibodies reactive with Ehrlichia canis and E. chaffeensis in dogs from the Bloemfontein area, South Africa*. J S Afr Vet Assoc, 1998. **69**(4): p. 126-8.
227. FUKUDA, T., YAMAMOTO, S., *Neorickettsia-like organism isolated from metacercaria of a fluke, Stellantchasmus falcatus*. Jpn.J.Med.Sci.Biol., 1981. **34**: p. 103-107.
228. MAGNARELLI, L.A., ANDERSON, J. F., *Serologic evidence of canine and equine ehrlichiosis in northeastern United States*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(11): p. 2857-60.
229. SUKSAWAT, J., PITULLE, C., ARRAGA-ALVARADO, C., MADRIGAL, K., HANCOCK, S. I., BREITSCHWERDT, E. B., *Coinfection with three Ehrlichia species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(1): p. 90-3.
230. WANER, T., BANETH, G., STRENGER, C., KEYSARY, A., KING, R., HARRUS, S., *Antibodies reactive with Ehrlichia canis, Ehrlichia phagocytophila genogroup antigens and the spotted fever group rickettsial antigens, in free-ranging jackals (Canis aureus syriacus) from Israel*. Vet Parasitol, 1999. **82**(2): p. 121-8.
231. BREITSCHWERDT, E., B., KORDICK, D. L., MALARKEY, D. E., KEENE, B., HADFIELD, T. L., WILSON K., *Endocarditis in a dog due to infections with a novel Bartonella subspecies*. J Clin Microbiol, 1995. **33**: p. 154-160.
232. UNVER, A., FELEK, S., PADDOCK, C. D., ZHI, N., HOROWITZ, H. W., WORMSER, G. P., CULLMAN, L. C., RIKIHISA, Y., *Western blot analysis of sera reactive to human monocytic ehrlichiosis and human granulocytic ehrlichiosis agents*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(11): p. 3982-6.
233. BJOERDSORFF, A. *A.phagocytophilum infections in Scandinavia*. in *Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bactérioses-zoonoses*. 2003. Ploufragan - FRANCE: Union Régionale des Groupements Techniques Vétérinaires de Bretagne.
234. WOODY, B.J., *Clinicopathological findings in 135 cases of naturally occurring canine ehrlichiosis*, P.a.t.W.o.D.C.b.L.R.o.M.a. Animals, Editor. 1985: Champaign-Urbana, IL, University of Illinois.
235. CODNER, E., ROBERTS, R., E., AINSWORTH, A., G., *Atypical findings in 16 cases of canine ehrlichiosis*. J.Am.Vet.Med.Assoc, 1985. **186**(2): p. 166-169.
236. WADDLE, J.R., LITTMAN, M.P., *A retrospective study of 27 cases of natural occurring canine ehrlichiosis*. J.Am.Anim.Hosp.Assoc., 1988. **24**: p. 615-620.
237. IQBAL, Z., CHAICHANASIRIWITHAYA, W., RIKIHISA, Y., *Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis*. J.Clin.Micobiol., 1994. **32**(7): p. 1658-1662.
238. MYLONAKIS, M.E., et al., *Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): a comparison between five methods*. Vet Microbiol, 2003. **91**(2-3): p. 197-204.
239. ELIAS, E., *Diagnosis of ehrlichiosis from the presence of inclusion bodies or morulae of Ehrlichia canis*. J.Small.Anim.Pract., 1992. **39**(11): p. 540-543.
240. STOCKHAM, S., L., TYLER, J., W., SCHMIDT, D., A., CURTIS, K., S., *Experimental transmission of granulocytic ehrlichial organisms in dogs*. Vet.Clin.Path., 1990. **19**(4): p. 99-104.
241. SAINZ, A., TESURO, M.A., AMOUSATEGUI, I., RODRIGUEZ, F., MAZZUCCELLI, F., RODRIGUEZ, M., *Prospective comparative study of three treatment protocols using doxycycline or imidocarb dipropionate in dogs with naturally occurring ehrlichiosis*. J Vet Intern Med, 2000. **14**: p. 134-139.

242. BEAUFILS, J.-P., MARTIN-GRANEL, J., JUMELLE, P., *Diagnostic cytologique des ehrlichioses canines*. Prat.Med.Chir.Anim.Comp., 1995. **30**: p. 189-195.
243. RASKIN, R.E., *Chapter 2 : General categories of cytologic interpretation*, in *Atlas of canine and feline cytology*, D.J. Meyer, Editor. 1996, W.B. SAUNDERS COMPANY: Philadelphia, Pennsylvania. p. 19-33.
244. RASKIN, R.E., *Chapter 4: Lymphoid system*, in *Atlas of canine and feline cytology*, D.J. Meyer, Editor. 1996, W.B. SAUNDERS COMPANY: Philadelphia, Pennsylvania. p. 93-134.
245. OKADA, H., USUDA, H., TAJIMA, T., KAWAHARA, M., YOSHINO, T., RIKIHISA, Y., *Distribution of Ehrlichiae in Tissues as Determined by In-situ Hybridization*. J Comp Pathol, 2003. **128**(2-3): p. 182-7.
246. GUSA, A., A., BULLER, R., S., STORCH, G., A., HUYCKE, M., M., MACHADO, L., J., SLATER, L., N., STOCKHAM, S., L., MASSUNG, R., F., *Identification of a p28 gene in Ehrlichia ewingii : Evaluation of gene for use as a target for a species-specific PCR diagnostic assay*. J.Clin.Micobiol., 2001. **39**(11): p. 3871-3876.
247. McBRIDE, J., W., CORSTVET, R., E., GAUNT, S., D., CHINSANGARAM, J., AKITA, G., Y., OSBURN, B., I., *PCR detection of acute Ehrlichia canis infection in dogs*. J.Vet.Diagn.Invest., 1996. **8**: p. 441-447.
248. WEN, B., RIKIHISA, Y., MOTT, J. M., GREENE, R., KIM, H. Y., ZHI, N., COUTO, G. C., UNVER, A., BARTSCH, R., *Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of Ehrlichia canis infection in dogs treated with doxycycline*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(7): p. 1852-5.
249. MATHEW, J., S., EWING, S., A., MALAYER, J., R., FOX, J., C., KOCAN, K., M., *Efficacy of a modified polymerase chain reaction assay for detection of Ehrlichia canis infection*. J.Vet.Diag.Invest., 2000. **12**(5): p. 456-459.
250. PUSTERLA, N., HUDER, J. B., LEUTENEGGER, C. M., BRAUN, U., MADIGAN, J. E., LUTZ, H., *Quantitative real-time PCR for detection of members of the Ehrlichia phagocytophila genogroup in host animals and Ixodes ricinus ticks*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(5): p. 1329-31.
251. LEUTENEGGER, C.M., PUSTERLA, N., WICKI, R., LUTZ, H., *New molecular tools in the diagnosis of tick-borne diseases*. European Journal of Companion Animal Practice, 2003. **13**(2): p. 189-91.
252. MASSUNG, R.F., SLATER, K. G., *Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, Anaplasma phagocytophilum*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(2): p. 717-22.
253. HANCOCK, S.I., BREITSCHWERDT, E. B., PITULLE, C., *Differentiation of Ehrlichia platys and E. equi infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(12): p. 4577-8.
254. INOKUMA, H., FUJII, K., OKUDA, M. ONISHI, T., BEAUFILS, J. P., RAOULT, D., BROUQUI, P., *Determination of the nucleotide sequences of heat shock operon groESL and the citrate synthase gene (gltA) of Anaplasma (Ehrlichia) platys for phylogenetic and diagnostic studies*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(5): p. 1132-6.
255. RISTIC, M., HUXSOLL, D., L., WEISIGER, R., M., HILDEBRANDT, P., K., NYINDO, M., B., A., *Serologic diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence*. Infect.Immun., 1972. **6**: p. 226-231.
256. NICHOLSON, W.L., COMER, J. A., SUMNER, J. W., GINGRICH-BAKER, C., COUGHLIN, R. T., MAGNARELLI, L. A., OLSON, J. G., CHILDS, J. E., *An indirect immunofluorescence assay using a cell culture-derived antigen for detection of antibodies to the agent of human granulocytic ehrlichiosis*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(6): p. 1510-6.

257. DU PLESSIS, J.L., BEZUIDENHOUT, J. D., BRETT, M. S., CAMUS, E., JONJEGAN, F., MAHAN, S. M., MATINEZ, D., *The sero-diagnosis of heartwater: a comparison of five tests*. Rev Elev Med Vet Pays Trop, 1993. **46**(1-2): p. 123-9.
258. BROUQUI, P., LECAM, C., OLSON, J., RAOULT, D., *Serologic diagnosis of human monocytic ehrlichiosis by immunoblot analysis*. Clin Diagn Lab Immunol, 1994. **1**(6): p. 645-9.
259. DAWSON, J., E., FISHBEIN, D., B., ENG, T., R., REDUS, M., A., GREENE, N., R., *Diagnosis of human ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody test : kinetics and specificity*. J.Infect.Dis., 1990. **162**: p. 91-95.
260. MULVILLE, P., *Equine monocytic ehrlichiosis (Potomac horse fever): a review*. Equine Vet J, 1991. **23**(6): p. 400-4.
261. WANER, T., HARRUS, S., JONGEGAN, F., BARK, H., KEYSARY, A., CORNELISSEN, A., W.C.A., *Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by Ehrlichia canis*. Vet. Parasitol., 2001. **95**: p. 1-15.
262. PRETZMAN, C., T., RIKIHISA, Y., RALPH, D., *Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay for detecting Potomac horse fever disease*. J.Clin.Microbiol., 1987. **25**: p. 31-36.
263. ALLEMAN, R., A., McSHERRY, L., J., BARBET, A., F., BREITSCHWERDT , E., B., SORENSON, H., L., BOWIE, M., V., BELANGER, M., *Recombinant Major Antigenic Protein 2 of Ehrlichia canis : a potential diagnostic tool*. J.Clin.Micobiol., 2001. **39**(7): p. 2494-2499.
264. BELANGER, M., SORENSON, H. L., FRANCE, M. K., BOWIE, M. V., BARBET, A. F., BREITSCHWERDT, E. B., ALLEMAN, A. R., *Comparison of serological detection methods for diagnosis of Ehrlichia canis infections in dogs*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(9): p. 3506-8.
265. CADMAN, H., F., KELLY, P., J., MATTHEWMAN, L., A., ZHOU, R., MASON, P., R., *Comparison of the dot-blot enzyme linked immunoassay with immunofluorescence for detecting antibodies to Ehrlichia canis*. Vet.Rec, 1994. **135**: p. 362.
266. McBRIDE, J., W., CORSTVET, R., E., BREITSCHWERDT, E., B., WALKER, D., H., *Immunodiagnosis of Ehrlichia canis infection with recombinant proteins*. J.Clin.Micobiol., 2001. **39**(1): p. 315-322.
267. KELLY, P., J., MATTHEWMAN, L., A., MAHAN, S., M., SEMU, S., PETER, T., MASON, P., R., BROUQUI, P., RAOULT, D., *Serological evidence for antigenic relationships between Ehrlichia canis and Cowdria ruminantium*. Res.Vet.Sci., 1994. **56**: p. 170-174.
268. MATTHEWMAN, L.A., KELLY, P. J., MAHAN, S. M., SEMU, S. M., MASON, P. R., BRUCE, D., BROUQUI, P., RAOULT, D., *Reactivity of sera collected from dogs in Mutare, Zimbabwe, to antigens of Ehrlichia canis and Cowdria ruminantium*. Vet Rec, 1994. **134**(19): p. 498-9.
269. LOGAN, L., L., HOLLAND, C., J., MEBUS, C., A., RISTIC, M., *Sérological relationship between Cowdria ruminantium and certain ehrlichia*. Vet.Rec., 1986. **November**(1): p. 458-459.
270. JONGEJAN, F., WASSINK, L.A., THIELEMANS, M.J.C., PERIE, N.M., UILENBERG, G., *Serotypes in Cowdria ruminantium and their relationships with Ehrlichia phagocytophila*. Vet Microbiol, 1989. **21**: p. 31-40.
271. RIKIHISA, Y., *Cross-reacting antigens between Neorickettsia helminthoeca and Ehrlichia species, shown by immunofluorescence and Western immunoblotting*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(9): p. 2024-9.
272. KAKOMA, I., SAINZ, A., TESOURO, M., AMUSATEGUI, I., KIM, C., H., BIGGERSTAFF, J., McPEAK, J., LEVY, M., G., *Standardization of the diagnosis criteria for canine ehrlichiosis. Towards a universal case definition*. Ann.N.Y.Acad.Sci., 2000. **916**: p. 396-403.

273. CODNER, E., C., WOODY, B., J. *Tick-borne rickettsial disease*. in *53rd Annual Meeting of the American Animal Hospital Association*. 1986.
274. BANETH, G., BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C., PAPPALARDO, B., RYAN, J., *A survey of tick-borne bacteria and protozoa in naturally exposed dogs from Israel*. *Vet Parasitol*, 1998. **74**(2-4): p. 133-42.
275. LAPPIN, M.R., *Rickettsial diseases*, in *Practical Small Animal Internal Medicine*, W.E. Monroe, Editor. 1997, W.B. Saunders Company: Philadelphia, Pennsylvania.
276. SCHAEER, M., *Clinical Medicine of the Dog & the Cat*. 2003, London, UK: Manson Publishing - The Veterinary Press.
277. CHABANNE, L., FERRAND, G., LEDIEU, D., TRUMEL, C., DIQUELOU, A., *Troubles de l'hémostase primaire*, in *Encyclopédie vétérinaire*. 2003, Elsevier SAS: Paris (tous droits réservés) - Biologie clinique, 0500, 2003,16p.
278. LA SCOLA, B., RAOULT, D., *Serological diagnosis of rickettsiosis.*, in *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium*, P.B. D.Raoult, Editor. 1999, Elsevier: Paris. p. 320-329.
279. DAVOUST, B., PARZY, D., BONI, M., *Essai d'un test d'immunomigration rapide en vue du dépistage de l'ehrlichiose canine*. *Bull.Vet.Bimens.Soc.Vet.Prat.Fr*, 2000. **84**(3): p. 189-97.
280. HUGUIER, M., FLAHAULT, A., *L'évaluation diagnostique*, in *Biostatistiques au quotidien*, A. FLAHAULT, Editor. 2000, Elsevier: Paris. Tous droits réservés. p. 97-116.
281. COURTNEY, C.H., CORNELL, J. A., *Evaluation of heartworm immunodiagnostic tests*. *J Am Vet Med Assoc*, 1990. **197**(6): p. 724-9.
282. LAEMMLI, U., K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1977. **227**: p. 680-685.
283. BARBET, A.F., SEMU, S. M., CHIGAGURE, N., KELLY, P. J., JONGEJAN, F., MAHAN, S. M., *Size variation of the major immunodominant protein of Cowdria ruminantium*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994. **1**(6): p. 744-6.

ANNEXES

Annexe 1 - FICHE PRODUIT : Speed®EHRLI - Laboratoire BVT

Principe

Le Speed®EHRLI est un test qualitatif basé sur le principe de l'immuno-chromatographie (ou immuno-migration sur membrane). L'échantillon (sang total, sérum ou plasma) est déposé dans un puits sur du papier absorbant contenant un conjugué, sous forme d'anticorps anti-Ig de chien fixés à des particules colorées. Après l'ajout d'un réactif, les complexes conjugués-anticorps migrent sur la membrane, et, en présence d'Ac spécifiques, produisent une bande rose au niveau de l'antigène d'*Ehrlichia canis*.

Le mélange continue à migrer sur le support et atteint alors une zone de contrôle à l'extrémité de la fenêtre, où les particules colorées forment une bande de contrôle rose, témoin positif qui confirme la validité et la bonne réalisation du test.

Mode d'emploi

Placer la cellule-test sur une surface plane et horizontale.

Déposer une goutte de l'échantillon prélevé avec la pipette dans le puits circulaire (ou deux gouttes de sang frais).

Ajouter ensuite 5 gouttes de réactif dans le puits, et la migration débute. Si celle-ci ne démarre pas, rajouter 2 gouttes de réactif supplémentaires.

Le temps de réaction est de 20 minutes.

Vérifier l'apparition de la bande de contrôle positif à l'extrémité droite de la plage de migration ; l'absence de cette bande rend le test invalide.

La bande sur la gauche est la bande de positivité (antigène spécifique d'*Ehrlichia canis*). Un test peut être considéré comme positif dès l'instant où la bande rose apparaît. Si l'intensité de la bande est très faible, le résultat doit être considéré comme douteux et la probabilité d'ehrlichiose ne peut être écartée. Le laboratoire préconise de tester à nouveau après 10 à 15 jours.

Comme tout résultat biologique, il doit, bien entendu, être corrélé au tableau clinique, au contexte épidémiologique et aux autres résultats d'analyse.

L'apparition d'un fond rosé sur la fenêtre de migration ne modifie en rien la validité du test. Par contre, l'utilisation de sérums hémolysés ou d'échantillon de sang total mal conservés peut conduire à une lecture plus délicate du test. Il est préférable dans ce cas de renouveler le prélèvement.

Présentation

Les cellules-test sont conditionnées sous emballage unitaire, en kits de six unités, et sont munies de pipettes à usage unique permettant l'adjonction de l'échantillon (40 µL), d'un flacon compte-goutte de réactif et d'une notice.

Recommandations

Les tests sont valables 18 mois à température ambiante à partir de la date de fabrication. Une date de péremption est indiquée sur chaque kit.

Les échantillons doivent être utilisés frais dans la journée ou doivent être conservés 7 jours au maximum au réfrigérateur pour sérum et plasma et 3 jours pour le sang total frais sur anticoagulant.

Le sérum et le plasma peuvent être également conservés à -20°C.

Déposer les kits sur une surface plane et utiliser une pipette neuve à chaque prélèvement.

Annexe 2 - FICHE PRODUIT : WITNESS® Ehrlichia – Laboratoire SYNBIOTICS

Principe

Ce test est basé sur une technique d'immunomigration rapide (R.I.M.®). Le conjugué est constitué de particules d'or colloïdal sensibilisées avec la protéine A de *Staphylococcus aureus* fixées sur une membrane de nitrocellulose au fond du puits. Après l'ajout de l'échantillon à tester puis du tampon, ces particules migrent par capillarité sur la bande de papier et peuvent former des complexes colorés au niveau des bandes réactives (bande de positivité et témoin positif).

Mode d'emploi

Déposer une goutte d'échantillon (sang total sur anticoagulant, plasma ou sérum) dans le puits, suivie de trois gouttes de solution tampon.

Le temps de migration est de 10 minutes environ.

La bande de droite correspond au témoin positif et la bande de gauche à la bande de positivité (antigène spécifique d'*E.canis*). Une bande de couleur rose clairement visible sera considérée comme positive.

Présentation

Les tests sont livrés en coffrets comprenant 5 plaquettes, 5 pipettes permettant de prélever les 40 µL d'échantillon et un flacon compte-gouttes de solution tampon (3mL).

Recommandations particulières

Les coffrets doivent être conservés entre +2°C et +25°C et utilisés rapidement après ouverture.

Le test doit être réalisé sur une surface plane.

Annexe 3 - FICHE PRODUIT : SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli – Laboratoire IDEXX

Principe

Il s'agit d'un test immuno-enzymatique de type Dot-ELISA, qui détecte à la fois les Ac anti-*E. canis* et des Ag de *Dirofilaria immitis*, sur le sérum, plasma ou sang total. Le mélange échantillon-Ac conjugué (marqué par une enzyme) est installé dans le puits et migre à travers la fenêtre de lecture. L'antigène spécifique (souche Jake de *E. canis*) [264] fixé à la matrice de la zone de lecture permet de « capturer » les complexes Ac-Ac préalablement formés ; l'activation du dispositif SNAP® permet de libérer dans un premier temps une solution de rinçage, avec un flux inverse, qui permet d'éliminer les complexes non spécifiques et non fixés, ainsi que les autres composants de l'échantillon sanguin, puis ensuite le substrat de la réaction enzymatique qui permet d'amplifier le signal visuel.

Mode d'emploi

Déposer 2 gouttes de l'échantillon dans le tube à l'aide de la pipette (80 µL).

Ajouter 5 gouttes de conjugué et mélanger.

Poser le kit sur une surface plane et verser le contenu du tube dans le puits ; la migration débute.

Dès que le cercle situé en face se colore, déclencher le système SNAP® ; les résultats sont lisibles après 8 minutes :

- le cercle inférieur est un témoin négatif, qui doit être invisible ou bien plus clair que les autres pour que le test soit valide,
- le cercle de droite est le témoin de positivité pour *D.immitis* ; l'intensité de la couleur dépend de la concentration en Ag dans l'échantillon testé,
- le cercle de gauche est le témoin de positivité pour *E.canis*, l'intensité de la couleur dépend du titre en Ac anti-*E. canis* dans l'échantillon testé,
- le cercle supérieur est le témoin positif, qui doit être le plus coloré.

Présentation

Le SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli est présenté en coffrets de 5, 15 ou 30 tests, avec un flacon de conjugué (4 mL), des pipettes et des tubes plastiques.

Recommandations particulières

Les tests doivent impérativement être conservés entre 2 et 7°C, pendant environ 6 à 12 mois.

La manipulation se fera sur une surface plane, à température ambiante.

Les échantillons et les réactifs doivent être remis à température ambiante avant la réalisation du test :

Sérum et plasma peuvent être utilisés frais, congelés à -20°C au moins ou conservés 7 jours au réfrigérateur entre 2 et 7°C ; les échantillons hémolysés ne doivent pas être utilisés.

Le sang frais peut être conservé 7 jours au réfrigérateur également.

Annexe 4 - Résultats des tests après l'IFI.

Numéro de sérum	IFI	Speed®EHRLI	WITNESS®Ehrlichia	SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli
MAJ3	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
FAH 36	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
C1AM59	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
B6AK57	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
FAM 1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
FAM 10	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
MAJ 5	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
A6AF1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
FAK 55	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
C11AK16	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
C4AH48	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
B7AH27	160	Faiblement positif	Négatif	Négatif
B2AC38	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
FAH 8	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
B2AE62	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
M2312X	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
FAM 92	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
B3AM47	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
L2312X	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
C8AK16	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X18	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X7	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X5	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X8	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X2	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X9	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 14	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
X19	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 6	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 15	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 11	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
X 17	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 20	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 12	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 13	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
X 3	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 16	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
X 10	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
EO 81	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
EO 76	320	Positif 1	Positif	Négatif
EO 54	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
EO 17	320	Positif 1	Négatif	Négatif
EO 51	320	Positif 1	Positif	Positif
EO 69	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
EO 83	320	Positif 2	Positif	Positif
EO 84	320	Négatif	Négatif	Négatif
EO 50	320	Positif 1	Positif	Positif
EO 78	320	Faiblement positif	Positif	Positif

EO 52	320	Positif 1	Positif	Positif
EO 72	320	Négatif	Négatif	Négatif
EO 68	320	Positif 1	Positif	Négatif
EO 45	40	Faiblement positif	Négatif	Négatif
EO 40	320	Positif 1	Positif	Positif
EO 80	320	Faiblement positif	Positif	Positif
EO 41	320	Faiblement positif	Négatif	Positif
EO 79	320	Positif 1	Positif	Positif
EO 66	320	Faiblement positif	Négatif	Positif
EO 54 BIS	640	Négatif	Positif	Négatif
EO 56	160	Faiblement positif	Négatif	Négatif
EO 82	640	Positif 1	Positif	Positif
EO 48	320	Positif 2	Positif	Positif
EO 53	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
EO 77	320	Positif 1	Positif	Positif
EO 47	320	Faiblement positif	Positif	Positif
EO 71	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
EO 46	320	Faiblement positif	Positif	Positif
EO 55	320	Faiblement positif	Positif	Négatif
E085	320	Négatif	Négatif	Négatif
E086	640	Négatif	Négatif	Négatif
E087	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E088	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E089	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E090	640	Positif 1	Positif	Positif
E091	320	Faiblement positif	Positif	Négatif
E092	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E093	160	Positif 1	Positif	Négatif
E094	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E095	640	Faiblement positif	Positif	Positif
E096	640	Faiblement positif	Positif	Négatif
E097	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E098	640	Faiblement positif	Positif	Positif
E099	40	Négatif	Négatif	Négatif
E100	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E101	640	Négatif	Négatif	Négatif
E102	40	Négatif	Négatif	Négatif
E103	40	Négatif	Négatif	Négatif
E104	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E105	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E106	320	Négatif	Négatif	Négatif
E107	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E108	640	Positif 1	Positif	Positif
E109	640	Positif 1	Positif	Positif
E110	640	Positif 1	Positif	Positif
E111	640	Positif 1	Positif	Positif
E112	640	Négatif	Négatif	Négatif

En bleu : faux négatifs ; en rouge : faux positifs.

Annexe 5 - Résultats du Western-Blot et masse moléculaire des peptides observés.

Numéro de sérum	IFI	Western-blot (masse moléculaire en kDa)	Speed®EHRLI	WITNESS® Ehrlichia	SNAP®COMBO Canine Diro/Ehrli
X 14	Négatif	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
X 11	Négatif	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
X 13	Négatif	Négatif	Faiblement positif	Négatif	Négatif
EO 84	320	Positif (21, 26)	Négatif	Négatif	Négatif
EO 72	320	Positif (21, 26)	Négatif	Négatif	Négatif
EO 54 BIS	640	Positif (21, 32)	Négatif	Positif	Négatif
E085	320	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E086	640	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E099	40	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E101	640	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E102	40	Positif (26)	Négatif	Négatif	Négatif
E106	320	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
E112	640	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

En bleu : faux négatifs ; en rouge : faux positifs. En gras : sérums discordants IFI/WB

MARTIN Cédric

**LES EHRlichIOSES DU CHIEN : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE,
DIAGNOSTIC ET COMPARAISON DE TROIS KITS DE
DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE RAPIDE DE L'EHRlichIOSE
MONOCYTAIRE**

Thèse Vétérinaire : Lyon , 27 avril 2004

RESUME :

Les ehrlichioses canines sont caractérisées par une diversité clinique liée à la pluralité des agents étiologiques et à la complexité de processus physiopathologiques encore mal connus. Le modèle est l'infection par *Ehrlichia canis*, caractérisée par des signes non spécifiques et multisystémiques, accompagnés de troubles hématologiques. Une atteinte articulaire semble davantage associée aux formes granulocytaires.

En l'absence de standard diagnostique, le clinicien vétérinaire doit prendre en compte un maximum d'éléments épidémiologiques, cliniques et biologiques. La sérologie reste la méthode de référence et notre travail met en évidence, au travers d'une étude comparative en aveugle, l'intérêt pour le clinicien de trois kits de diagnostic sérologique rapide de l'ehrlichiose monocyttaire canine disponibles en France.

MOTS CLES :

- **Ehrlichioses**
- **Chien**
- **Diagnostic**
- **Sérologie**

JURY :

Président :	Monsieur le Professeur J. ETIENNE
1er Assesseur :	Monsieur le Professeur L. CHABANNE
2ème Assesseur :	Monsieur le Professeur G. BOURDOISEAU

DATE DE SOUTENANCE : 27 avril 2004

ADRESSE DE L'AUTEUR :

6, rue Laurent Vibert
69006 LYON