



## Etude nationale sur les cas cliniques aigus d'ehrlichiose granulocytaire bovine SYNTHESE DES RESULTATS

### **INTRODUCTION**

L'étude nationale sur l'ehrlichiose granulocytaire bovine (EGB) lancée à l'automne 2004 s'est terminée à l'automne 2005. Cette étude, entreprise chez des vaches laitières en phase aiguë de la maladie, a permis d'acquérir des données sur l'immunodépression induite grâce à un suivi hématologique. Elle a aussi permis d'évaluer l'impact de l'EGB sur le fonctionnement hépatique en « monitorant » 4 paramètres biochimiques (ASAT, GDH,  $\gamma$ GT et bilirubine).

Cette étude a réuni près d'une centaine de vétérinaires de terrain découvreurs des cas d'EGB, la SNGTV qui a apporté son soutien logistique et financier, le Laboratoire Départemental d'Analyses des Côtes d'Armor (LDA 22, Ploufragan) pour le diagnostic PCR ainsi que pour le stockage des sérums et enfin le Laboratoire des Dosages Hormonaux (LDH) de l'ENVN pour les analyses biochimiques.

Toutes les informations relatives à l'étude (feuilles de commémoratifs, résultats PCR, résultats hématologiques, résultats biochimiques) ont été centralisées auprès du coordinateur de l'étude, le Docteur Guy JONCOUR. L'exploitation des données a fait l'objet d'une thèse de doctorat vétérinaire soutenue par le Docteur Damien ACHARD (Nantes, 2005) et dont nous retranscrivons ici les principaux résultats.

## **MATERIEL ET METHODES**

### A/ Les animaux, critères d'inclusion

#### **Population malade**

Toute vache laitière du territoire français suspectée d'EGB aiguë par un vétérinaire puis confirmée atteinte d'EGB par cyto-hématologie (protocole 1) ou par PCR (protocole 2) par le LDA 22.

#### **Population témoin**

Les témoins sont des vaches laitières apparemment saines du même élevage que les vaches malades qui doivent être le plus représentatives de l'historique de la vache atteinte (achetée ou née hors de l'élevage, tarie, pleine, génisse, niveau de production et stade de lactation comparable..).

### B/ Les protocoles biochimiques et hématologiques

Les paramètres biochimiques hépatiques des vaches infectées par *Anaplasma phagocytophilum* ont été mesurés au dépistage (J0), une semaine (J7) puis un mois après (J30) et seulement à une semaine puis un mois chez les animaux témoins. Ces analyses ont été réalisées au LDH de l'ENVN.

Seules les vaches infectées ont bénéficié d'un suivi hématologique au dépistage puis un mois plus tard. Ces analyses initialement réalisées par le LDA 22 ont été confiées aux vétérinaires de terrain. En effet les délais de transport rendaient difficile l'analyse hématologique des prélèvements sanguins par le LDA 22.

## RESULTATS

Au bout de 12 mois d'investigation et sur 123 dossiers ayant été envoyé par les vétérinaires de terrain, 37 vaches laitières ont pu être inclus dans l'étude (9 avec le protocole 1 et 28 suivant le protocole 2). Le suivi biochimique a été réalisé chez 31 d'entre elles, le suivi hématologique sur 21.

### A/ Volet biochimique

**Tableau I** : Résultats biochimiques de 14 vaches laitières infectées par *A. phagocytophilum* en début de phase clinique (J0)

Paramètre	Observation	Nombre de vaches	Moyenne malades	Moyenne témoins
<i>ASAT (U/L)</i>	Normal (30 – 170)	14	96	114
<i>GDH (U/L)</i>	Normal (<100)	14	20	31
$\gamma$ GT (U/L)	Normal (10 – 45)	11	29	29
	Augmentée (>45)	3		
<i>Bilirubine (mg/L)</i>	Normal (<7)	10	7	4
	Augmentée (>7)	4		

En début de phase d'état d'EGB on peut observer sur la moitié des animaux infectés une atteinte modérée du système hépatobiliaire, sans pouvoir en préciser la gravité. Cette atteinte se traduit principalement par des élévations des valeurs de bilirubine et de  $\gamma$ GT. Cependant il n'y a pas d'augmentation spécifique.

**Tableau II** : Résultats biochimiques de 17 vaches laitières infectées par *A. phagocytophilum* à J7

Paramètre	Observation	Nombre de vaches	Moyenne malades	Moyenne témoins
<i>ASAT (U/L)</i>	Normal (30 – 170)	16	110	114
	Augmentée (>170)	1		
<i>GDH (U/L)</i>	Normal (<100)	16	26	31
	Augmentée (>100)	1		
$\gamma$ GT (U/L)	Normal (10 – 45)	15	30	29
	Augmentée (>45)	2		
<i>Bilirubine (mg/L)</i>	Normal (<7)	16	5	4
	Augmentée (>7)	1		

Ainsi une semaine après la première intervention du vétérinaire, peu de vaches manifeste une atteinte hépatique. De plus pour la moitié des vaches qui semblent être affectées, l'augmentation du paramètre lié à la nécrose cellulaire (GDH) correspond mal à ce que l'on connaît de la pathogénie de l'ehrlichiose chez les bovins et n'a jamais été rapportée expérimentalement. Enfin pour les vaches qui présentaient une augmentation des valeurs de certains paramètres hépatiques à J0 les anomalies ont disparues.

**Tableau III:** Résultats biochimiques de 14 vaches laitières infectées par *A. phagocytophilum* à J30

Paramètre	Observation	Nombre de vaches	Moyenne malades	Moyenne témoins
ASAT (U/L)	Normal (30 – 170)	13	107	114
	Augmentée (>170)	1		
GDH (U/L)	Normal (<100)	14	19	31
$\gamma$ GT (U/L)	Normal (10 – 45)	10	32	29
	Augmentée (>45)	4		
Bilirubine (mg/L)	Normal (<7)	14	5	4

En fin de phase d'état d'EGB on peut observer sur moins de la moitié des animaux infectés une atteinte modérée du système hépatobiliaire, qui se traduit principalement par des élévations des valeurs de  $\gamma$ GT. Cela peut correspondre à un phénomène de cholestase évoluant de manière chronique.

## B/ Volet hématologique

### 1/ Erythrocytes

**Tableau IV:** Résultats hématologiques concernant la lignée érythrocytaire chez 19 vaches laitières infectées par *A. phagocytophilum*

Paramètre	Observation	Nombre de vaches en phase aiguë	Moyenne des malades en phase aiguë	Moyenne des malades à J30
Hématocrite	Normal (24 – 46%)	17	28.4	29.4
	Diminuée (< 24 %)	2		
Concentration en hémoglobine (g/L)	Normal (8 – 15g/L)	17	9.9	10
	Diminuée (< 8g/L)	2		

Pendant la première semaine qui suit la déclaration d'ehrlichiose granulocytaire, moins de 10 % des vaches laitières infectées démontrent une chute de leur hématocrite ou de leur concentration en hémoglobine. D'une façon générale, les moyennes des vaches atteintes concordent avec les valeurs usuelles que ce soit en début ou en fin de maladie. Ainsi d'après notre étude terrain, l'anémie semble peu fréquente chez les bovins atteints d'ehrlichiose.

## 2/ Thrombocytes

**Tableau V:** Résultats hématologiques concernant les plaquettes chez 15 vaches laitières infectées par *A. phagocytophilum*

Paramètre	Observation	Nombre de vaches en phase aiguë	Moyenne des malades en phase aiguë	Moyenne des malades à J30
<i>Thrombocytes</i> (cell. / mm <sup>3</sup> )	Normal (100 000 – 800 000)	10	157 000	381 000
	Thrombopénie (< 100 000)	5		

Une vache atteinte d'EGB sur trois montre une diminution significative de sa numération plaquettaire lors des 7 premiers jours de déclaration de la maladie, avec moins de 100 000 thrombocytes par mm<sup>3</sup> de sang. Cependant, il faut noter que le plus faible nombre de plaquettes est observé à J0. La moyenne des malades en début d'EGB est significativement différente de la moyenne des malades 30 jours plus tard. La thrombopénie semble donc être un évènement assez fréquent chez la vache atteinte d'EGB, surtout dans les tout premiers jours.

## 3/ Leucocytes

**Tableau VI:** Résultats hématologiques concernant les leucocytes chez 17 vaches laitières infectées par *A. phagocytophilum*

Paramètre	Observation	Nombre de vaches en phase aiguë	Moyenne des malades en phase aiguë	Moyenne des malades à J30
<i>Leucocytes</i> (cell. / mm <sup>3</sup> )	Normal (4 000 – 12 000)	14	6 551	8 807
	Leucopénie (< 4 000)	3		
<i>Lymphocytes</i> (cell. / mm <sup>3</sup> )	Normal (2 500 – 7 500)	5	2 058	2 896
	Lymphopénie (< 2 500)	11		
<i>Neutrophiles</i> (cell. / mm <sup>3</sup> )	Normal (600 – 4 000)	7	4 096	4 760
	Neutrophilie (> 4 000)	6		

3 vaches infectées par *Anaplasma phagocytophilum* sur 17 ont montré une leucopénie au début de la phase clinique d'EGB soit près d'une vache infectée sur 5. La moyenne des malades en phase aiguë, bien que significativement différente de celle des malades à J30, reste dans les valeurs usuelles : cela signifie que dans notre étude de terrain nous n'avons pas mis en évidence de franche leucopénie sur l'ensemble des vaches positives analysées. 11 vaches infectées sur 16 présentent une lymphopénie en début de phase clinique soit chez 7 vaches malades sur 10. La moyenne des malades en phase aiguë est également significativement différente de celle des « convalescentes » et en dessous des intervalles de référence. Il y a donc une forte tendance à la lymphopénie en début d'EGB.

En ce qui concerne la population des neutrophiles, on observe que près de la moitié des vaches infectées ont plus de 4 000 neutrophiles par mm<sup>3</sup> de sang. Cette tendance à la neutrophilie semble s'amplifier au fur et à mesure de la maladie si on en juge par une évolution à la hausse de cette numération chez les vaches infectées 30 jours après la déclaration des symptômes.

## **DISCUSSION**

Plusieurs points de cette étude appellent des commentaires : la qualité des prélèvements, le choix de J0, des témoins, les intervalles de référence, la comparaison des résultats avec l'étude expérimentale de PUSTERLA (1997), la mise en cause d' *A. phagocytophilum* dans les insuffisances hépatiques observées et enfin le bilan des cas négatifs et positifs de l'étude.

### A/ La qualité des prélèvements

Les prélèvements réalisés sur anticoagulant (EDTA) destinés au diagnostic d'ehrlichiose par cyto-hématologie et à la NFS ont mal supporté le transport. Beaucoup de cellules sanguines étaient lysées à la réception et cela rendait l'interprétation du frottis et la fiabilité du résultat de NFS hasardeux dans certains cas. La lecture des frottis était également chronophage et peu de personnes au sein du LDA 22 pouvaient la faire. Confronté à ces problèmes de qualité, de perte de temps et d'efficacité, il a été décidé de réaliser le diagnostic positif d'EGB par la PCR et de laisser les praticiens réaliser la NFS. C'est ce qui a conduit à élaborer une nouvelle version du protocole lors de la réunion de suivi du comité de pilotage (Ploufragan, 15 mars 2005).

La qualité des sérums a été globalement bonne. Parmi les sérums des vaches infectées, on compte 6 tubes hémolysés sur un total de 50 tubes analysés soit 12 % des prélèvements. Parmi les sérums des vaches témoins, on compte 11 tubes hémolysés sur un total de 124 tubes analysés soit environ 9 % des prélèvements. Aucun tube ne présentait de lipémie. L'hémolyse peut perturber certaines analyses en particulier majorer artificiellement jusqu'à 10 % de la concentration en bilirubine. Elle peut également fausser les valeurs enzymologiques en les augmentant (ASAT,  $\gamma$ GT). L'hémolyse observée peut provenir des conditions de prélèvements et de transport. Mais cette hémolyse peut aussi s'expliquer par le fait que les sérums proviennent d'animaux malades chez qui il existe une fragilité érythrocytaire. Arbitrairement, les valeurs des sérums hémolysés n'ont pas été prises en compte dans l'étude statistique. Mais pour certains d'entre eux il est possible que l'hémolyse était en partie due à l'ehrlichiose et donc ce choix a pu entretenir une perte d'informations.

## B/ J0

J0 est défini dans les protocoles SNGTV comme le premier jour de présentation du cas suspect au vétérinaire de l'élevage. La pratique se heurte ici au cadre expérimental. En effet, la bibliographie rapporte qu'après une phase d'incubation de 4 à 7 jours, la phase aiguë débute par une poussée de fièvre coïncidant généralement avec l'observation d'*Anaplasma phagocytophilum* dans les leucocytes.

Le J0 des protocoles SNGTV peut donc être le premier ou le deuxième jour de la phase aiguë voir même parfois plus tard. Par exemple, un J0 date du 2 juin, alors que la vache a présenté des signes cliniques le 27 avril.

Afin de bénéficier de données homogènes, J0 devait être considéré comme le premier jour d'observation chez l'animal de signes cliniques évocateurs d'une ehrlichiose (principalement hyperthermie et agalaxie).

Il n'est évidemment pas possible d'obtenir pour chaque cas un prélèvement au premier jour de déclaration des signes cliniques. Il paraissait en revanche primordial que le praticien essaie de préciser J0 en s'informant auprès de l'éleveur, ce qui n'est pas sans conséquence sur le protocole.

Deux cas se présentent alors :

- **L'animal est « malade » depuis 3 jours maximum.** Dans ce cas les prélèvements du vétérinaire sont considérés comme étant des J0 que ce soit chez les témoins ou les malades et le *protocole* a été *appliqué* jusqu'au bout *sans modification*.
- **L'animal est « malade » depuis 3 à 7 jours.** Dans ce cas on a considéré que *les prélèvements faits sont des J7 que ce soit chez les témoins ou les malades. Pour choisir J30, le clinicien devait se baser sur le premier jour probable d'expression de la maladie.*

Quand nous n'avions pas les commémoratifs nous avons supposé que J0 était le premier jour d'expression de signes cliniques. Exclure ces cas de l'étude aurait entraîné un effet trop important sur la taille de l'échantillon.

Ainsi les résultats à **J0** doivent s'entendre comme les résultats obtenus **sur les trois premiers jours de la phase aiguë** et les résultats à **J7** comme les résultats obtenus **entre le 4<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de la phase aiguë**.

**Enfin si le praticien devait intervenir plus de 7 jours après le début de la phase clinique**, le protocole n'était pas poursuivi. La phase aigue est en effet terminée à cette date. De plus, la technique PCR devient de moins en moins sensible.

Ces règles ont été appliquées afin d'obtenir les meilleurs données possible. De plus, elles ont évité le plus souvent la pratique d'analyses inutiles dans le cas où le praticien intervenait sur un animal malade depuis plus de 3 jours.

Malgré cette tentative de recentrage des données, il existe sur cette étude une part importante d'imprécisions concernant J0.

### C/ Les vaches témoins

Les vaches témoins (de 3 à 5 par exploitation) ont été définies précédemment comme des vaches apparemment saines appartenant au même troupeau que la vache malade et qui doivent être représentatives de son historique. Le vétérinaire devait s'aider des critères suivants pour faire son choix : date d'entrée dans l'exploitation, âge, stade de lactation, niveau de production, rang de lactation. Il est difficile de savoir dans quelle mesure ces consignes ont été respectées ce qui peut effectivement influencer les résultats des vaches témoins. Il est également arrivé que le vétérinaire ne prélève pas les mêmes vaches à J7 et à J30. Bien que nos variables témoin et malade ne soient pas strictement appariées, **nous considérons que leurs moyennes sont des données importantes pour établir une comparaison.**

Les moyennes « témoins » qui sont présentées dans les tableaux I, II et III ont été établies à partir des résultats sérologiques des vaches témoins **à J7 et à J30**. Nous avons décidé de regrouper ces résultats dans la mesure où nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les deux populations.

### D/ Quelles valeurs usuelles utiliser ?

Les valeurs usuelles des paramètres biologiques des vaches laitières ne sont pas aussi connues que l'on pourrait le croire et en particulier leurs variations en fonction de leur production et de leur passé pathologique. Nos critères de biologie clinique hépatique sont ceux qui ont été déterminés par l'étude expérimentale de D. ACHARD (2005) dans sa thèse de doctorat. Le tableau ci-dessous rappelle ces intervalles.

**Tableau VII :** Intervalles de référence en ASAT, GDH,  $\gamma$ GT et bilirubine déterminés à partir de 108 sérums de vaches laitières Holstein sur BIO PANELS 144

Paramètres	Limites des valeurs usuelles
ASAT (U/L)	<b>30 – 170</b>
GDH (U/L)	<b>&lt; 100</b>
$\gamma$ GT (U/L)	<b>10 – 45</b>
Bilirubine (mg/L)	<b>&lt; 7</b>

En ce qui concerne les valeurs usuelles en hématologie, nous nous sommes appuyés sur les données tirées de la littérature (Schalm's veterinary hematology. 4th Ed. Philadelphia, 1986)

**Tableau VIII :** Intervalles de référence en hématologie bovine, d'après Schalm's, 1986

Paramètres	Limites des valeurs usuelles
Leucocytes (cell. / mm <sup>3</sup> )	4 000 – 12 000
Lymphocytes (cell. / mm <sup>3</sup> )	2 500 – 7 500
Neutrophiles (cell. / mm <sup>3</sup> )	600 – 4 000
Thrombocytes (cell. / mm <sup>3</sup> )	100 000 – 800 000
Hématocrite	24 – 46%
Concentration en hémoglobine (g/L)	8 – 15g/L

#### E/ Comparaison avec l'étude expérimentale de PUSTERLA (1997)

##### **1/ Présentation de l'étude expérimentale de PUSTERLA**

Chez les bovins, une des rares études existantes à propos des modifications biochimiques et hématologiques lors d'ehrlichiose est celle, expérimentale, de PUSTERLA (1997).

Un des objectifs de son étude était d'évaluer toute variation biochimique et hématologique à l'aide des paramètres suivants : urée, créatinine, bilirubine totale, sodium, potassium, chlore, AST,  $\gamma$ GT, GDH, SDH, CK, hématocrite, numération en érythrocytes et plaquettes, concentration en hémoglobine, numération et formule leucocytaire. Pour obtenir ces résultats PUSTERLA et son équipe ont infectés expérimentalement 10 vaches cliniquement et sérologiquement saines à l'aide de 50 ml de sang total pris chez une vache atteinte d'ehrlichiose (460 leucocytes infectés par  $\mu$ l). 5 vaches étaient en lactation et 5 autres étaient gestantes dans le dernier tiers. L'âge moyen est de 6,1 ans. Pour connaître avec précision les étapes de l'infection, des frottis sanguins pour détection de morulae d'ehrlichia sont réalisées tous les jours sur toutes les vaches. La collecte de sang pour la biochimie s'est faite à la jugulaire sur tube sec tous les jours à partir du jour de l'infection expérimentale et ceci pendant 3 semaines. Pour connaître l'évolution des paramètres biochimiques, la moyenne de chacun des paramètres pour les 10 vaches infectées était quotidiennement établie. Cette moyenne a été ensuite comparée avec celle du premier jour de l'inoculation.

Seuls deux paramètres biochimiques ont leur moyenne qui a augmenté au cours de l'étude : la créatinine et la bilirubine. Ces augmentations ont concerné les 3 à 4 premiers jours de la phase aiguë. Chez 3 vaches les concentrations en bilirubine et créatinine ont dépassé les limites supérieures des valeurs usuelles en début de phase aiguë (tableau IX).

**Tableau IX :** Analyses biochimiques chez des vaches laitières en début de phase aiguë d'ehrlichiose après infection expérimentale, d'après Pusterla *et al* (1997)

Variable (unit)	Finding	No. of cows
Creatinine ( $\mu\text{mol/liter}$ )	Normal (65–175)	7
	Increased ( $>175$ )	3
Bilirubin ( $\mu\text{mol/liter}$ )	Normal (0.8–8.6)	7
	Increased ( $>8.6$ )	3
AST (U/liter)	Normal (40–80)	10
$\gamma$ -GT (U/liter)	Normal (0–30)	10
GLDH (U/liter)	Normal (4–26)	10
SDH (U/liter)	Normal (4–26)	10
CK (U/liter)	Normal ( $<200$ )	10
Sodium (mmol/liter)	Normal (135–155)	10
Potassium (mmol/liter)	Normal (3.5–5.5)	10
Chloride (mmol/liter)	Normal (96–110)	10

A partir du 10<sup>ième</sup> jour post-inoculation la bilirubine et la créatinine ont retrouvé des valeurs physiologiques. Les autres paramètres mesurés sont dans les intervalles de référence. Pour PUSTERLA, même si les valeurs de créatinine et de bilirubine ont significativement augmentées sur l'ensemble des vaches dans les premiers moments de l'infection, cela ne peut être lié qu'à une affection hépatique et/ou rénale mineure.

Concernant le suivi hématologique, PUSTERLA et son équipe ont conclu à une chute de l'hématocrite chez toutes les vaches, une baisse de la numération érythrocytaire dans un cas sur deux et enfin diminution de la concentration en hémoglobine chez 30 % des vaches atteintes en début de phase clinique. Enfin, et dans tous les cas, il y a également une baisse conséquente des plaquettes. Il y a donc bien, chez ces vaches infectées expérimentalement, une modification importante de la lignée rouge.

Il en va de même, avec plus d'ampleur, pour la lignée blanche puisqu'on retrouve une lymphopénie, une neutropénie et une éosinophilie chez les 10 animaux infectés en début d'EGB.

**Tableau X :** Analyses hématologiques chez des vaches laitières en début de phase aiguë d'ehrlichiose après infection expérimentale, d'après Pusterla *et al* (1997)

Variable (unit)	Finding	No. of cows
Hematocrit (%)	Decreased (<28)	10
Concn of:		
Erythrocytes ( $10^6/\mu\text{l}$ )	Normal (4.8–6.8)	5
	Decreased (<4.8)	5
Hemoglobin (g/dl)	Normal (8–11)	7
	Decreased (<8)	3
Leukocytes (no./ $\mu\text{l}$ )	Decreased (<4,000)	10
Neutrophils (no./ $\mu\text{l}$ )	Decreased (<1,000)	10
Eosinophils (no./ $\mu\text{l}$ )	Decreased (<100)	10
Lymphocytes (no./ $\mu\text{l}$ )	Decreased (<2,000)	10
Monocytes (no./ $\mu\text{l}$ )	Normal (0–330)	10
Thrombocytes ( $10^3/\mu\text{l}$ )	Decreased (<100)	10
Plasma protein (g/liter)	Normal (60–80)	10
Fibrinogen (g/liter)	Normal (5–7)	10
Urea nitrogen (mmol/liter)	Normal (<7.5)	10
Creatinine ( $\mu\text{mol/liter}$ )	Normal (65–175)	7
	Increased (>175)	3

## 2/ Volet biochimique

Dans l'étude expérimentale menée par PUSTERLA (1997), 30 % des vaches présentent une hyperbilirubinémie en début de phase aiguë d'EGB ce qui est tout à fait comparable à notre expérience de terrain (28,5 %). D'autre part la moyenne des témoins étant significativement différente de la moyenne des malades ( $p < 0,05$ ) à J0, on constate comme PUSTERLA dans notre étude que toutes les vaches ont une augmentation de leur bilirubinémie en début de phase aiguë. Cette augmentation de la bilirubinémie est difficilement utilisable par un praticien qui n'a pas connaissance de la bilirubinémie initiale de la vache qu'il consulte et chez qui il soupçonne l'EGB. De plus une hyperbilirubinémie n'est constatée que dans un cas sur trois. Les résultats concernant la  $\gamma\text{GT}$  sont légèrement différents de ceux obtenus par PUSTERLA. Notre étude montre que 21 % des vaches atteintes d'EGB ont des concentrations en  $\gamma\text{GT}$  qui dépassent la limite supérieure des valeurs usuelles lors des premiers temps de la phase aiguë contrairement à celle menée par PUSTERLA (pas d'augmentation en  $\gamma\text{GT}$ ). Cependant cette élévation doit être relativisée dans la mesure où la moyenne des malades à J0 n'est pas significativement différente de la moyenne des témoins. A J30, la même remarque peut être formulée : notre étude montre que certaines vaches ont de fortes concentrations en  $\gamma\text{GT}$  (28,5 %) sans que cela soit apparu dans l'étude de PUSTERLA. Pour les autres paramètres mesurés, les données concordent avec les conclusions de PUSTERLA : il n'y a pas d'impact de l'EGB sur l'activité sérique de l'ASAT et de la GDH.

**En conclusion nous observons, comme lors d'infections expérimentales, que les vaches laitières infectées naturellement par l'agent de l'EGB en début de phase aiguë présentent une augmentation de la concentration sanguine en bilirubine et que certaines vaches démontrent une hyperbilirubinémie (1 cas sur 3). A la différence de**

**l'étude expérimentale, une élévation en dehors des valeurs usuelles de l'activité  $\gamma$ GT en début (1 cas sur 5) et en fin (1 cas sur 3) d'évolution clinique d'ehrlichiose a été observée en conditions naturelles d'infection. Cependant ces données biochimiques sont trop ténues pour pouvoir aider le vétérinaire à préciser son diagnostic.**

### **3/ Volet hématologique**

Que ce soit en étude terrain ou en infection expérimentale, on observe clairement une lymphopénie associée à une chute du nombre des plaquettes chez les bovins en début de phase clinique. Cette double tendance apparaît cependant beaucoup plus marquée lors d'infection expérimentale surtout pour la thrombopénie : alors que dans l'étude menée par PUSTERLA toutes les vaches présentent moins de 100 000 plaquettes par mm<sup>3</sup> de sang, seules 30 % des vaches infectées naturellement sont thrombopéniques. Il faut cependant rappeler que les données de terrain rassemblent des vaches infectées à J0 et J7 et que J0 englobe les trois premiers jours de la maladie.

Dans l'étude de PUSTERLA, la leucopénie en tout début de phase clinique d'ehrlichiose est observée chez tous les bovins infectés. Ceci contraste avec notre étude de terrain dans laquelle nous n'avons pas mis en évidence de franche leucopénie sur l'ensemble des vaches positives analysées (tableau VI). La principale différence provient de la population de neutrophiles. En effet notre étude terrain a révélé qu'une majorité de vaches laitières atteintes d'EGB présentaient une neutrophilie au contraire des bovins infectés expérimentalement chez qui étaient notés une neutropénie. Ainsi la numération de leucocytes ne semble pas être un critère utile pour dépister un cas clinique d'EGB.

La mesure de l'hématocrite ne peut être comparée car la limite de thrombopénie est plus haute dans l'étude de PUSTERLA (28% contre 24% dans notre étude). En infection naturelle, son interprétation est similaire à celle de la mesure de la concentration en hémoglobine : moins de 10% des vaches ehrlichieuses sont anémiées contre 30% lors d'infection expérimentale. Malgré la facilité de l'analyse de l'hématocrite, on ne peut pas utiliser ce moyen pour renforcer une suspicion clinique d'EGB, d'après notre étude terrain.

**Les caractéristiques majeures de biologie médicale des vaches laitières en phase aiguë d'EGB sont la lymphopénie et/ou la thrombopénie que l'on peut observer dans près de 80 % des cas. Les autres analyses hématologiques restent pour la plupart dans les valeurs usuelles.**

F/ Difficultés de la mise en évidence des conséquences hépatiques de l'ehrlichiose à *Anaplasma phagocytophilum*

Un des objectifs de cette étude est d'essayer de déterminer si l'on peut mettre en évidence biologiquement les conséquences hépatiques de l'ehrlichiose à *A. phagocytophilum*. Il faut remarquer que :

◆ Nous n'avons pas les moyens de confirmer l'existence de lésions hépatiques lors d'EGB. Puisque la mortalité imputable à cette affection est très faible il n'est pas possible de réaliser d'examen nécropsique. D'autre part, il n'est pas possible de réaliser des biopsies hépatiques, autant pour des raisons éthiques que budgétaires.

◆ Les vaches laitières sont susceptibles d'être atteintes de diverses affections hépatiques, en particulier lipidose et fasciolose. En conséquence, une modification de ces paramètres biochimiques peut révéler une atteinte hépatique sans que la causalité d'*A. phagocytophilum* soit démontrée.

◆ L'ASAT n'est pas une enzyme uniquement distribuée dans les hépatocytes. Une augmentation de ce paramètre ne sera pas spécifique d'une atteinte hépatique.

◆ Une hyperbilirubinémie peut être secondaire à une affection hépatique mais aussi à une hémolyse, même si l'hémolyse n'est pas importante (pas d'anémie). De nombreuses inflammations chroniques sont susceptibles de provoquer des coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) modérées qui entraînent une augmentation de la bilirubine.

**Il n'est donc pas certain que les anomalies biochimiques que nous avons pu observer au long de cette étude soient uniquement liées à une atteinte du foie.**

G/ 37 cas positifs sur 123 envoyés, que faut-il en penser ?

Plus d'une centaine de cas ont été envoyés par les confrères praticiens en plus de 12 mois d'investigation : il y a donc eu une réelle motivation de la part des vétérinaires de terrain et une bonne répartition nationale montrant que l'EGB intéresse beaucoup de vétérinaires mixtes en France.

Si on ne peut que se féliciter de l'engouement des vétérinaires pour les études dites de terrain, il faut s'interroger sur l'importance des cas négatifs. Il est certain que les protocoles qui ont été successivement proposés manquaient de simplicité. Le praticien pouvait donc légitimement douter d'avoir correctement suivi un protocole parfois complexe : ceci peut expliquer les erreurs dans les prélèvements et le faible pourcentage de protocoles réalisés en entier.

Une partie des cas négatifs peuvent s'expliquer par les faux négatifs induits par la technique de cyto-hématologie avec laquelle l'étude a commencé. Cette technique est

d'une spécificité absolue mais sa sensibilité dépend pour beaucoup de l'expérience du lecteur du frottis. La sensibilité dépend aussi de la précocité de prélèvement : un frottis dans les 48 premières heures de la phase d'état d'EGB offre les meilleures chances de détection. Ce test est donc à réserver pour des prélèvements faits au pic d'hyperthermie. La technique de PCR quant à elle souffre moins de ces problèmes de sensibilité.

L'écueil majeur dans cette étude nous paraît être la difficulté clinique d'aborder la maladie : tout est ehrlichiose et rien n'est ehrlichiose. On peut en effet suspecter l'EGB devant tout syndrome fébrile chez une vache en perte brutale de production lactée. Ce faisant, rien d'étonnant à ce que nous ayons trouvé autant de cas négatifs. Cela prouve la nécessité de mieux connaître cette maladie et d'essayer de disposer d'outils diagnostiques efficaces.

## CONCLUSION

L'ehrlichiose est une maladie vectorielle présente sur tout le territoire national et dont cette étude confirme la saisonnalité printemps/automne.

Cette étude valide la PCR comme un outil diagnostique primordial pour confirmer toute suspicion d'ehrlichiose.

La biochimie n'apparaît pas utile dans le diagnostic de la maladie, contrairement à la médecine humaine : tout au plus on peut noter une hyperbilirubinémie transitoire dans 1 cas sur 3 lors de la phase aiguë.

L'hématologie apporte par contre quelques éléments intéressants :

- il y a une modification de l'hémogramme des vaches infectées naturellement confirmant les données bibliographiques, lymphopénie et thrombopénie en particulier
- Certaines différences sont cependant notables. Dans notre étude terrain la thrombopénie n'est pas aussi franche, il n'y pas de neutropénie mais neutrophilie et l'anémie est très peu marquée

L'ehrlichiose peut être évoquée devant tout symptôme fébrile chez des vaches laitières en perte brutale de production. Pour le vétérinaire rural possédant un analyseur, une lymphopénie (moins de 2 500 lymphocytes par mm<sup>3</sup> de sang) et/ou une thrombopénie (moins de 100 000 thrombocytes par mm<sup>3</sup> de sang) dans ce cas de figure doit faire fortement suspecter l'EGB. Cependant, la confirmation de la maladie ne peut être apportée que par l'examen du frottis ou par la PCR.