

PROTOCOLE d'enquête sur la prévalence nationale de l'ehrlichiose granulocytaire bovine (EGB) dans 23 départements français : par sérologie et/ou PCR sur prélèvements sanguins et rate de petits ruminants sauvages.

L'ehrlichiose granulocytaire bovine à *Anaplasma phagocytophilum* est une zoonose émergente, infectieuse, inoculable, non contagieuse évoluant sous forme aiguë ou inapparente et selon un tableau épidémiologique sporadique ou anadémique, en foyers. Les troupeaux affectés exploitent des biotopes favorables à *Ixodes ricinus*.

Largeement méconnue, sous-évaluée et sous-diagnostiquée en France, sa méconnaissance, en « humaine », est comparable à celle constatée chez les vétérinaires. Ce réseau sanitaire a pourtant bénéficié d'informations larges depuis 1999 (URGTVB-SNGTV).

La vache est une **espèce sentinelle** pour l'homme, en terme d'**EGB** : par visualisation biologique de la présence (effective ou récemment passée) d'une rickettsie, *Anaplasma phagocytophilum* dans les foyers identifiés, petite bactérie intracellulaire stricte, pathogène et très ubiquiste. Tout comme son vecteur biologique principal et réservoir, une **tique** du genre *Ixodes ricinus* est susceptible de parasiter un grand nombre d'espèces.

Les révélateurs sont l'examen clinique, la cyto-hématologie, la sérologie spécifique par IfI ou la PCR.

L'étude épidémiologique 1999-2003 réalisée par l'Union Régionale des Groupements Techniques Vétérinaires de Bretagne (**URGTV B**) a mis en évidence le rôle important joué par le **chevreuil** (*Capreolus capreolus*) dans cette entité pathologique. Sinon en termes de réservoir ou de vecteur biologique. Plutôt en tant qu'**espèce-hôte** permanent et **véhicule de dissémination** passive des tiques : elles, vecteurs actifs et réservoirs de l'agent pathogène étudié (seules les larves et nymphes gorgées, tout comme les femelles *I. ricinus* non gorgées sont des stases « infectantes » : il n'y a pas de transmission trans-ovarienne).

Le volet Faune Sauvage de cette étude a conclu à des séroprévalences positives de **70 à 75%**, spécifiques "*A. phagocytophilum*" par Immunofluorescence Indirecte (IfI) -et pour 400 animaux testés-, de 1999 à 2003. Ce pourcentage régional est confirmé au niveau national.

Le chevreuil espèce commensale des animaux de rente, en contact permanent avec ces ectoparasites, peut être une sentinelle pour la **vache**.

Cette espèce sauvage, de répartition géographique étendue sur tout le territoire national, en expansion et dont le petit territoire vital moyen peut être estimé à 1 km² constitue un cul de sac épidémiologique pour le « parasite » (tout comme en termes de borréliose de Lyme ≠ **Bibliographie**).

Il ne joue pas un rôle de vecteur de la maladie **mais peut «servir » de révélateur biologique d'utilisation aisée.**

L'étude **URGTV B**, initiée par les vétérinaires de terrain, dans l'Ouest, a permis de localiser (1999-2005), par extension, **74 départements** où une « trace » biologique de l'agent pathogène a pu être visualisée, et grâce aux Laboratoires de développement et d'analyses Départementaux (LDA22, surtout, LDA14, LDV54 et LDV79).

Elle se prolonge actuellement (2005) par une enquête nationale sur cas cliniques confirmés par le laboratoire de diagnostic de référence, le Laboratoire de Développement et d'Analyses des Côtes d'Armor (LDA22). Sous l'égide de la Société Nationale des GTV (**SNGTV**) :

ces investigations démontrent l'efficacité de ces réseaux conduits par un comité scientifique de pilotage pluridisciplinaire associant, en particulier, des vétérinaires et des médecins.

En effet, l'EGB est une **zoonose infectieuse**, mais non contagieuse, de mammifère à mammifère.

Principe :

Il nous paraît pertinent, opportun et intéressant d'utiliser, en priorité, cette espèce en tant qu'**indicateur biologique** de présence, dans le cadre du prolongement de l'enquête de prévalence qualitative nationale, dans les Départements français où la présence d' *A. phagocytophilum* n'a pas encore été prouvée. D'autres biotopes peuvent être aussi étudiés grâce à d'autres espèces plus spécifiques de ces milieux.

En effet,

- ? la séropositivité (IfI), associée à une PCR « POS » sur *buffy coat* et sur les tiques (*I. ricinus*) prélevés sur une chevrette accidentée (Plourin-les-Morlaix, 29N, août 2000) a permis d'identifier la présence en **FINISTERE (29)**, près de deux ans (**juin 2002**) avant la découverte de foyers sur bovins d'élevage. En décembre 2001, un Cerf élaphe (*Cervus elaphus*) sur 9, en *ranching* (Guerlesquin-29) s'est révélé « POS ».
- ? En **décembre 2001**, 20 sérums sur 20 chevreuils prélevés en 4 massifs distincts d' **ILLE-ET-VILAINE (35)** sont IfI « POS ». En février 2002, 6 cerfs en *ranching*, d'un lot de 10 étaient aussi « POS », en lisière de Forêt de Paimpont. Le premier diagnostic sur bovin date d' **avril 2002**.
- ? De même, les **DEUX-SEVRES (79)** ont été déclarés « infectés » grâce à des sérologies « POS » sur chevreuils de translocation (ONCFS-LERPAS, Forêt de C.) en **février 2002**, un an avant l'identification d'un foyer bovin à Chiché, en **2003**.
- ? En **MARNE (51)**, 30 sangs IfI « POS » d'un lot de 40 chevreuils de translocation (ONCFS, « Réserve de Trois Fontaines ») ont permis d'en prouver la présence (**février 2002**). **A février 2004, il n'a pas encore été possible d'identifier la rickettsie chez d'autres mammifères, dans ce département.**

Département	1 ^{ère} identif. FS	1 ^{ère} identif. Bovin ou ...
29	août 2000	juin 2002
35	décembre 2001	avril 2002
79 (ONCFS/LERPAS)	février 2002	mai 2003
51 (ONCFS)	février 2002	Aucune !

Les Cervidés en général, et en particulier le chevreuil, et, par extension, les Artiodactyles (Sanglier [*Sus scrofa*] excepté) sont donc de très bonnes sentinelles pour les autres espèces sensibles, domestiques. Et pour l'Homme.

Objectifs :

? **Sur la base de coordonnées topographiques précises du lieu de capture de l'animal (≠ Fiche N° 1 : feuille de commémoratifs), il peut être intéressant de prendre en compte les résultats positifs et négatifs à l'analyse dans des Départements jusqu'à présent indemnes, afin d'obtenir des cartes géographiques de haute définition à l'échelon national.**

? Mieux connaître la répartition géographique de cet agent pathogène **zoonotique** potentiel.

? Valider un type d'enquête visant à déterminer des **prévalences qualitatives** dans les départements « indemnes » à février 2005. Par des outils simples et une méthodologie mettant à contribution des éléments « indicateurs biologiques de présence » au sein de la faune sauvage.

? Compléter l'enquête épidémiologique URGTV Bretagne- SNGTV en cours depuis 1999. Ce sondage, essentiellement sérologique, et visant les Départements jusque là indemnes par manque de résultats de laboratoire positifs, permettra d'identifier sans aucun doute de nouveaux Départements « infectés ».

? En s'articulant sur le **réseau des praticiens**, parfois amenés à prendre en soin des petits Cervidés malades ou blessés, dans le cadre de leur exercice de soins à la faune sauvage (≠ Réseau Français des Vétérinaires Praticiens de Faune Sauvage [**RFVFPFS**] et autres, dont la section SNGTV-FS), les Vétérinaires chasseurs des départements retenus, en contact avec les Fédérations Départementales des Chasseurs, ceux investis dans le fonctionnement de la Fédération Nationale des Chasseurs (DMV Charlotte DUNOYER et Pierre MENEZ) et, pour les Cervidés malades relevant du Bureau Sanitaire de l'ONCFS, sur le **réseau SAGIR** / DMV Jean-Roch GAILLET et ses partenaires, dont le **GEEFSM** et l'AFSSA- LERPAS, l'enquête visera à mieux faire connaître ces « outils » et à **démontrer qu'un réseau d'investigation vétérinaire étendu, national -et pluridisciplinaire- peut mener à terme des investigations à connotation scientifique**, concernant une Maladie Vectorielle à Tiques (**MVT**) et, plus généralement, la **Santé Publique**.

? Contribuer à une évaluation de l'impact potentiel de l'agent *Anaplasma phagocytophilum* sur la **santé de cette faune sauvage** (effet immunodépresseur induit et pouvoir abortif avérés de l'infection à *A. phagocytophilum* dans d'autres espèces, surtout domestiques). En particulier concernant la « **MAC** » et les constats fréquents -au moins dans l'Ouest (G. Joncour. comm. pers.)- de **naissances d'automne tardives** chez le chevreuil : celles-ci peuvent laisser supposer des troubles de reproduction chez les chevrettes.

? Obtenir enfin une **banque de sérums** représentative et utilisable dans le cadre d'autres recherches (Pestiviroses / *Border Disease*.-BVD, Coxiellose/fièvre Q, Chlamydiafilose /*C. abortus*., Néosporose, ...). En outre une partie du **prélèvement splénique** sera dédiée aux recherches associées, par biologie moléculaire (PCR), d'hétoparasites du genre *Babesia* ou autres.

Moyens humains et techniques :

? Comité scientifique de pilotage : Pr Claude Chastel (Doyen honoraire UER Brest), Jean-Claude George (médecin généraliste en Meuse), Jeanne Brugère-Picoux (ENVA), François Moutou (AFSSA), Marie-Eve Terrier (AFSSA-LERPAS Nancy) sous réserves, Claude Guiraud (GEEFSM), Dominique Gauthier (GEEFSM), Eric Collin (Comm. épidémiologie SNGTV), Philippe Camuset (SNGTV), Guy Joncour (URGTVB et Section Faune Sauvage / Comm. Environnement SNGTV) coordinateur, Jean-François Labbé (URGTVB), Jacques Devos (SNGTV), Nathalie Vassallo / Rosine Danguy-des-Déserts / Pascale Lamanda (LDA22), François Lamarque (ONCFS), Jean-Roch Gaillet-Jean Hars / Sagir-ONCFS, Pr Marc Artois (ENVL, **sous réserves**), Pr H-J Boulouis (ENVA), Didier FATOSME (Janssen Santé Animale), Charlotte Dunoyer et Philippe Vuillaume (UNFDC. Réseau sanitaire).

? La Fédération Nationale des Chasseurs / pôle-relais maladies et intoxications de la faune sauvage, les Délégations Régionales et Départementales, les membres du réseau ONCFS-SAGIR, des Départements concernés,

? Les consœurs et confrères collaborateurs et chargés de prélèvements pour les Départements retenus, des GTV régionaux et départementaux (ou non), ainsi que les Laboratoires Départementaux Vétérinaires (LDA/LDV) volontaires, déjà impliqués dans « Sagir », souvent.

? La SNGTV, maître d'œuvre, le réseau RFVPFS, Le GEEFSM.

? Un étudiant d'ENV, **Alex Chimier**, centralisation-compilation et « pré-traitement » des données - Thèse de Doctorat Vétérinaire. Etude statistique. Au 1^{er} Trim. 2006.

? Laboratoires de référence destinataires :

Le **LDA22** recevra l'ensemble des prélèvements biologiques et les conditionnera accompagnés d'une feuille de commémoratifs (fdc) (**Fiche N°1**) N. Vassallo / R. Danguy-des-Déserts / Service d'Immunologie & sérologies spécifiques *A. phagocytophilum* par Ifl & centrifugation du tube « sec » et mise en banque, stockage des ectoparasites (*I. ricinus*) si prélevés, stockage et traitement du tissu splénique (rate / **PCR**).

Envoi de ceux-ci, éventuellement, vers d'autres laboratoires partenaires (ex. : **Pr Henri-Jean Boulouis / ENVA & sonde PCR multi-spécifique**).

De nombreuses séances de battues ont lieu le Dimanche. Les prélèvements seront réalisés, préférentiellement, par un vétérinaire, volontaire dépendant ou non de l'équipe de chasse-battue, le plus proche du site, à défaut d'un confrère référent pour le Département ou d'un Technicien habilité. Dans la mesure du possible, faire transiter l'animal à contrôler par le Cabinet du vétérinaire. A charge, pour les Fédérations (Nationale et Départementale) d'informer leurs adhérents.

Moyens financiers :

Un budget global incluant les frais pour une réunion au LDA22 de préparation, au **second semestre 2005**, de collecte et d'envoi des prélèvements, des frais de dossier et de coordination URGTV-SNGTV, une bourse de thèse (**6 500 eu**) et le coût des analyses (non comptés les conditionnements annexes et les envois demandés au LDA22 et PCRs éventuelles sur titres) (**4 500 eu**) : **Soit un budget global prévisionnel de 11 000 euro HT**.

Nota : le stockage-congélation des échantillons qui ne seraient pas analysés par insuffisance budgétaire aura de toute façon un coût. Nous sommes actuellement en contact étroit avec l'Union Nationale des Fédérations Départementales des Chasseurs (DMV Pierre MENEZ et Charlotte DUNOYER) et les Fédérations Régionales et Départementales : ces prélèvements concerneront surtout des animaux des plans de chasse (& pas le réseau SAGIR, dans un premier temps).

Protocole :

Durée de l'étude : la saison de chasse 2005-2006.

Prélèvements biologiques : dans l'ordre d'importance : (**Fiche N°2** : protocole de prélèvement sanguin sur cadavre frais par dissection de la zone jugulaire).

? **Tube n°1** et **n°2** : **Deux tubes** de sang total de 5 ml. à « bouchon rouge » (si possible). Bien pleins. Si on y associe d'autres investigations du type « BVD-MD », « Border D. », Coxiellose, Néosporose,...). Idéal, si possibilité locale : **centrifugation** et envoi des sérums au LDA22.

? **Tube n°3** : les tiques ectoparasites \approx dans alcool à 70° (\approx PCR) \approx identification. (**Fiche N°2** : oreilles, nuque rétro-auriculaire, fanon, cuisses-intérieur, scrotum, flancs)

Attention : des mélophages du genre *Lipoptena cervi*, sont souvent nombreux sur les Cervidés. Et confondus avec des tiques (*Ixodes*). Ils ressemblent aux mélophages du mouton, *Melophagus ovinus*.

? **Prélèvement n° 4 : la rate.** Découper **deux** lanières de rate de **1cm. x 0,5cm. x 4cm.** \approx Dans deux tubes de « 5 ml. à bouchon rouge », **n° 4** et **n° 5. Rajouter de l'alcool à 70°**, en vidant l'air « sous le bouchon » à l'aiguille et seringue montée, en aspirant.

Bien identifier tous les tubes. Les joindre à la **Fiche N°1**, avant envoi au Laboratoire / LDA22

Liste des départements où devront s'effectuer les prélèvements biologiques (= ceux où pas de « POS » \approx Bovins, Equidés, Chevreuil. Même Lama [*Lama glama*] ou Chiroptères) :

02, (2A,) 2B, 04, 05, 07, 10, 11, 16, 26, 30, 32, 34, 37, 40, 48, 66, 68, 70, 92 et 95 \approx 21 Départements + les deux où des cas humains ont été diagnostiqués, Meuse (55) et Bas-Rhin (67). Soit 23 à tester. (voir Carte).

Taille de l'échantillon attendue en vue d'analyses Ifl : **Quatre analyses par Ifl et par Département, \approx 100 tubes n°1 et n°2. Un maximum de n° 3, 4 et 5.**

On peut estimer la nécessité de tester 8 animaux par Département, soit environ **180** Cervidés, en fonction d'**hémolyses** fréquentes dans ces types de prélèvements *in Natura*, et de pollutions bactériennes et fongiques inhérentes à divers modes de prélèvements sanguins. Un petit échantillon de 4 animaux rend difficile une interprétation épidémiologique sur une population donnée : des contraintes budgétaires nous y contraignent et ce choix ne grève pas nos objectifs ci-dessus. **Tout complément financier permettrait un accroissement des tailles d'échantillon.**

Une répartition homogène sur tout le Département est un élément important à prendre en compte.

Discussion : Critères d'inclusion, d'exclusion.

Zone d'étude : **le territoire national** des **23 départements** signalés plus haut.

Les espèces à prélever : d'abord, en priorité,

? le **chevreuil** (*Capreolus capreolus*), des plans de chasse et inclus dans les animaux répertoriés par **fiches Sagir** (Réseau national, \approx fiches **2002 : 555** chevreuils et **82** « autres ruminants », \approx fiches **2003 : 488** chevreuils et **86** « autres ruminants »), puis le **cerf élaphe** (*Cervus elaphus*), de plans de chasse, capture « administrative »-translocations ou en ranching, le **daim** (*Dama dama*).

? l'**isard-chamois** (*Rupicapra rupicapra*), le **mouflon** (*Ovis sp.*) ou le **bouquetin** (*Capra ibex*), **Nota** : ces trois espèces vivent généralement à plus de 700 mètres d'altitude, limite supérieure de la répartition altitudinale d'*Ixodes ricinus*). Il serait donc intéressant de les tester, également.

? Sont inclus les Artiodactyles autres que le Sanglier (*Sus scrofa*), même exotiques, des collections privées ou publiques (parcs de vision, safari-parcs, parcs zoologiques, et autres zoos. **Nota** : Le Lama [*Lama glama*] est sensible à l'EGB).

? **Concernant la Corse (2A/2B)**, des informations issues des milieux cynégétiques indiquent une présence non anecdotique de tiques sur les **sangliers** chassés. Afin de réaliser les objectifs, des prélèvements du même type seront donc effectués sur 2 x 4 animaux de chasse et envoyés, selon le même protocole, au LDA22 (en indiquant « Sanglier », aux commémoratifs, à la case « Autre »).

? Sont exclus tous les prélèvements effectués dans les autres Départements non cités plus haut et les envois dont les commémoratifs ne seraient pas transmis à la Coordination (fax. **02 96 45 91 58**)

Nota : la congélation-conservation permettra des analyses complémentaires, dans l'attente de financements complémentaires.

Callac, le **10 mai 2005**, revu le **17 novembre 2005**

Guy JONCOUR Coordinateur de l'étude nationale SNGTV sur l'Ehrlichiose Granulocytaire Bovine (EGB). Callac.Veto@wanadoo.fr <http://www.zoopole.com/ispaia/urgtvbretagne2003.htm>

faxer, obligatoirement (pour validation) au **02 96 45 91 58** avant envoi LDA22.

Nota : répartir les lieux de prélèvements sur tout le Département, ...dans la mesure du possible. Merci.

COORDONNEES :

Responsable de battue ou « Inventeur ».....

Nom.....

Prénom..... Adresse.....

Tél..... Fax

Ville..... Code Postal.....

Vétérinaire « préleveur » (ou Tampon)

Nom.....

Adresse.....

**Facturation des prélèvements par un vétérinaire GTV
Dr J-F LABBE, Trésorier SNGTV, Groupe Vétérinaire de
Broons, BP 28. 2250 Broons.**

Votre envoi au LDA22 : colis résistant aux chocs (normes) et identifié avec la mention suivante : **ETUDE Ehrlichiose Faune sauvage - SNGTV. LDA des Côtes d'Armor. Zoopôle. 7 rue du Sabot. B.P. 54. 22440 PLOUFRAGAN.**

Tubes n° 1 et n°2 (Sang total)

☒ 1 tube sec n°1 (ou sérum)

☒ 1 tube sec n°2 (ou sérum)

Tube n° 3 (Tiques) avec alcool à 70°

☒ 1 tube n°3

Tubes n° 4 et n°5 (Rate : 1 x 0,5 x 4 cm) avec alcool à 70°

☒ 1 tube n° 4

☒ 1 tube n° 5

-les tubes n°1 et n°2 sont :

☒ centrifugés et décantés*

☒ juste décantés

* *A minima*, laisser coaguler à température ambiante avant envoi, si centrifugation impossible

ANIMAL PRELEVE

Espèce :

☒ Chevreuil, ☒ Cerf, ☒ Cerf sika, ☒ Daim, ☒ Autre

☒ Chamois, ☒ Isard, ☒ Mouflon, ☒ Bouquetin.

Sexe: ☒ Mâle, ☒ Femelle

Âge : ☒ Jeune (moins d'un an), ☒ Adulte (plus d'un an).

Poids, éventuellement :

Conditions de capture :

☒ Plan de chasse, ☒ Translocation, ☒ Police sanitaire (cerfs / ranching)

☒ Accident routier,

☒ Pathologie (si oui, laquelle ? et fiche Sagir -copie éventuelle).....

Date de la collecte :

Lieu de la collecte : (si possible [?] « latitude et longitude » ou coordonnées GPS / UTM. Ou les plus précises possibles...)

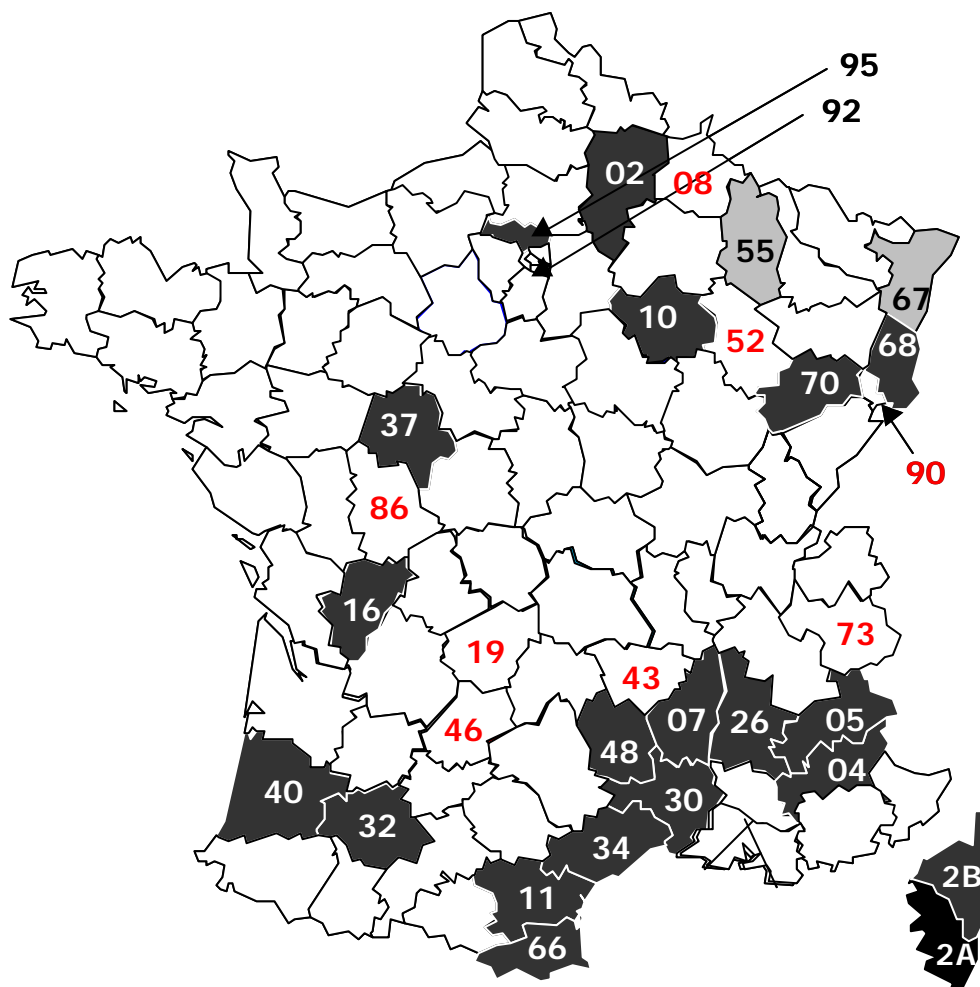
Lieu-dit le plus proche :

Bois :

Commune :

Département :

Code postal :.....



■ 21 Départements sans manifestation d'infection par *A. phagocytophilum*

■ 2 Départements (55-67), à cas humains confirmés par Laboratoire.

Des résultats d'analyse positifs sur bovins ont été fournis par le LDA22, depuis le 31/07/2005, dans 8 Départements (08, 19, 43, 46, 52, 73, 86 et 90) ~~exclus de l'étude.~~

Les 23 Départements de l'étude par bio-indicateurs de l'ehrlichiose bovine / EGB et autres espèces (01-11-2005) © URGTV-B
Sources : URGTV-B, LDA22 surtout et LDA 14 + réseau Sagir-ONCFS + JM J-C George + Pr P. Brouqui
JRRN La Timone/ Marseille

Alsace (2/2) : 67-Bas-Rhin, 68-Haut-Rhin
Aquitaine (1/5) : 40-Landes
Centre (1/6) : 37-Indre-et-Loire
Champagne (1/4) : 10-Aube
Corse (2/2) : 2B-Haute-Corse, 2A-Corse-du-Sud
Franche-Comté (1/4) : 70-Haute-Saône
Île de France (2/8) : 92-Hauts-de-Seine, 95-Val-d'Oise
Languedoc-Roussillon (5/5) : 11-Aude, 30-Gard, 34-Hérault, 48-Lozère, 66-Pyrénées Orientales
Lorraine (1/4) : 55-Meuse
Midi-Pyrénées (1/5) : 32-Gers
Picardie (1/3) : 02-Aisne
Poitou-Charentes (1/4) : 16-Charente
Provence-Côte d'Azur (2/6) : 04-Alpes de H-P., 05-Hautes-Alpes
Rhône-Alpes (2/8) : 07-Ardèche, 26-Drôme.