

## COWDRIOSE

---

### RÉSUMÉ

*La cowdriose (ou « heartwater ») est une rickettsiose aiguë, mortelle, non-contagieuse des ruminants provoquée par Ehrlichia ruminantium (antérieurement Cowdria ruminantium) et transmise par les tiques du genre Amblyomma. Elle est répandue dans la presque totalité de l'Afrique subsaharienne, dans les îles avoisinantes du continent africain et dans certaines îles des Caraïbes d'où elle menace le continent américain. La maladie peut entraîner une mortalité élevée (jusqu'à 90 %) chez les ruminants domestiques sensibles. Les chèvres et les moutons sont plus sensibles que les bovins, et les races européennes sont, en général, plus sensibles que les races indigènes africaines.*

*Cliniquement, la maladie se présente le plus souvent sous une forme aiguë qui est caractérisée par une fièvre soudaine et élevée, de la dépression, des symptômes nerveux et un taux de mortalité élevé. Un hydropéricarde, un hydrothorax et un œdème pulmonaire sont des lésions souvent observées à l'autopsie. Des formes aiguë et suraiguë peuvent survenir ; dans le premier cas, le taux de mortalité est élevé sans beaucoup de signes cliniques visibles, tandis que dans le deuxième cas le taux de guérison est plus élevé.*

*Les animaux guéris deviennent porteurs de l'infection. Certains animaux sauvages peuvent jouer le rôle de réservoir. Les cerfs Rusa, les cerfs de Virginie et les springboks sont sensibles à l'infection et peuvent présenter une mortalité élevée.*

**Identification de l'agent pathogène :** *le diagnostic spécifique de cowdriose est basé sur l'observation de colonies d'E. ruminantium dans les cellules endothéliales des vaisseaux capillaires cérébraux. En absence d'instruments appropriés, une portion de cerveau peut être prélevée avec une curette introduite par le foramen magnum après avoir coupé la tête de l'animal. Un prélèvement de cortex cérébral peut aussi être obtenu par un orifice effectué dans le crâne avec un clou et un marteau. Les frottis de cerveau sont préparés par écrasement puis étalés en tranches fines d'une petite fraction de cortex cérébral ou cérébelleux entre deux lames de microscope qui sont ensuite glissées l'une sur l'autre en sens inverse afin d'obtenir un étalement des vaisseaux capillaires en une monocouche cellulaire. Les frottis sont séchés à l'air, fixés au méthanol et colorés au Giemsa. Avec les colorants rapides les frottis peuvent être fixés et colorés en moins d'une minute. Les colonies sont de couleur pourpre à bleu et très souvent accolées au noyau des cellules infectées. Elles peuvent être rares et difficiles à trouver, particulièrement dans les formes aiguës, mais elles sont toujours présentes dans le cerveau des ruminants qui meurent de cowdriose s'ils n'ont pas été traités auparavant. En revanche, il est vraisemblable que les colonies ne seront pas observables chez les animaux qui ont été traités avec des antibiotiques. Les colonies sont encore visibles 2 jours après la mort dans un cerveau qui a été conservé à température ambiante (de 20 °C à 25 °C) et jusqu'à 34 jours dans un cerveau conservé au réfrigérateur (4 °C).*

*Du sang frais prélevé chez les animaux suspects peut être inoculé par voie intraveineuse chez un mouton ou une chèvre sensible. L'observation de signes cliniques et d'E. ruminantium dans le cerveau des animaux inoculés durant la phase fébrile a une valeur diagnostique de cowdriose. Cette méthode doit cependant autant que possible être évitée pour des considérations de bien être animal.*

*E. ruminantium peut être isolée du sang d'un hôte infecté par culture sur des cellules endothéliales de ruminants. Quand l'effet cytopathogène consistant en plages de lyse apparaît, la présence de*

morulae caractéristiques est confirmée par coloration du tapis cellulaire à l'éosine bleu de méthylène, ou par immunofluorescence ou immunoperoxidase en utilisant un antisérum spécifique.

Les sondes ADN et les méthodes encore plus sensibles d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) sont disponibles pour révéler la présence d'*E. ruminantium* dans le sang d'animaux présentant des signes cliniques et chez la tique vectrice, et à un moindre degré dans le sang ou la moelle osseuse d'animaux porteurs. En plus du diagnostic, la PCR est largement utilisée pour les recherches sur le génome d'*E. ruminantium* et dans les études épidémiologiques.

**Épreuves sérologiques :** les épreuves sérologiques disponibles incluent l'immunofluorescence indirecte, les réactions immuno-enzymatiques (ELISA) et le Western blotting. Cependant quand les antigènes sont constitués d'*E. ruminantium* entières, des réactions croisées avec d'autres *Ehrlichia* spp existent quel que soit l'épreuve utilisée. Les applications de la sérologie au diagnostic sont limitées.

Un ELISA récemment mis au point, l'ELISA MAP1B, utilise un antigène recombiné exprimé sous forme d'un fragment partiel de la protéine antigénique recombiné majeure (MAP1 = Major Antigenic Protein). Ce test a montré une amélioration très importante de la spécificité par rapport aux anciennes épreuves. Bien que cette épreuve soit plus spécifique, elle continue à détecter des réactions croisées avec d'autres *Ehrlichia*. Le diagnostic définitif de cowdriose repose donc sur des arguments épidémiologiques et des études moléculaires complémentaires pour garantir la présence de la bactérie. Ce test ELISA a rendu l'interprétation des résultats sérologiques plus fiables dans les régions où d'autres infections à *Ehrlichia* existent. Il peut être utilisé pour le suivi des infections expérimentales et pour évaluer la réponse immunitaire d'animaux immunisés dont l'historique avant immunisation est connu. L'emploi de la sérologie pour le diagnostic est limité, puisque les animaux cliniquement malades ne présentent pas d'anticorps pendant la phase fébrile et ne développent ces anticorps qu'après guérison.

La sérologie n'est pas non plus efficace pour éprouver les animaux avant importation. Lors d'importation d'animaux en provenance d'une zone où la cowdriose est enzootique, il convient d'étudier les données épidémiologiques pour vérifier que les troupeaux et les tiques locales ne sont pas infectés. En outre, des épreuves de PCR répétées devraient être réalisées afin de démontrer l'absence de l'agent pathogène au sein du troupeau.

**Spécifications applicables aux vaccins et aux produits biologiques à usage diagnostique :** l'immunisation contre la cowdriose par la méthode « d'infection et traitement » qui utilise du sang infectieux est encore utilisée dans certains pays. Un vaccin de première génération constitué de corps élémentaires inactivés d'*E. ruminantium* émulsifiés dans l'adjuvant Montanide ISA 50 a donné des résultats prometteurs en conditions expérimentales contrôlées et a démontré un pouvoir protecteur significatif sur le terrain. Un autre isolat, Welgevonden, a été atténué ; il s'est révélé induire une bonne protection, et une protection non négligeable a aussi été obtenue par vaccination avec de l'ADN. Cependant, aucun de ces vaccins expérimentaux n'a été vraiment validé dans les conditions du terrain. Des études de terrain ont révélé une grande diversité antigénique, ce qui est important pour la formulation des vaccins, des recherches supplémentaires sont indispensables avant la mise en circulation d'un vaccin.

## A. INTRODUCTION

La cowdriose est une rickettsiose des ruminants due à *Ehrlichia ruminantium* (auparavant *Cowdria ruminantium*) et transmise par les tiques du genre *Amblyomma* (3, 8, 36). Elle est aussi dénommée malkopsiekte (Afrikaner), péricardite exsudative infectieuse (français), hidrocárditis infecciosa (Portugais), idropericardite dei ruminanti (Italien), et possède une variété d'autres noms dans divers langages africains (5). *E. ruminantium* est classée dans l'ordre des Rickettsiales et la famille des *Anaplasmataceae*, avec le genre *Anaplasma*. Bien que les ruminants soient la première cible de l'agent pathogène, une infection canine qui pourrait être due à *E. ruminantium* a été signalée en Afrique du Sud (1), et plus récemment, *E. ruminantium* a été soupçonné dans plusieurs cas d'encéphalite humaine à issue rapidement fatale (14). Cependant, dans tous les cas la preuve de l'infection à *E. ruminantium* était basée sur une détection avec des techniques moléculaires. L'isolement et la caractérisation de l'agent infectieux est nécessaire avant de considérer que *E. ruminantium* est un agent pathogène émergent chez des espèces autres que les ruminants, notamment les humains.

La cowdriose est répandue dans la presque totalité des pays d'Afrique sub-saharienne où les tiques du genre *Amblyomma* sont présentes, ainsi que dans les îles du pourtour africain : Madagascar, La Réunion, île Maurice,

Les Comores et Sao Tomé et Príncipe. La maladie est aussi rapportée dans les Caraïbes (Guadeloupe, Marie-Galante et Antigua) (34), d'où elle menace le continent américain. Tous les ruminants domestiques et sauvages peuvent être infectés, mais les premiers sont les plus sensibles. Les ruminants domestiques indigènes sont généralement plus résistants à la maladie. Les animaux sauvages peuvent jouer le rôle de réservoir, mais le cerf Rusa, le cerf de Virginie, le springbok, le chital qui sont utilisés comme animaux de rente semblent être les principales espèces de ruminant sauvage chez qui la cowdriose peut avoir un impact économique important (36).

L'incubation naturelle moyenne est de 2 à 3 semaines, mais elle peut varier de 10 jours à 1 mois. Dans la plupart des cas la cowdriose est une maladie fébrile aiguë, avec une augmentation subite de la température corporelle qui peut dépasser 41°C en 1 à 2 jours après le début de l'hyperthermie. Elle demeure élevée pendant 4 à 5 semaines, avec de petites fluctuations et chute peu avant la mort.

La fièvre est suivie d'inappétence, parfois d'apathie, de diarrhée particulièrement chez les bovins (4), et de dyspnée révélatrice d'un œdème pulmonaire. Les signes nerveux apparaissent progressivement. L'animal est apathique, marche en cercle, fait des mouvements de succion et a une station rigide avec des tremblements des muscles superficiels. Les bovins « poussent au mur » ou ont un comportement agressif ou anxieux. Finalement, les animaux tombent au sol avec des mouvements de pédalage et un opisthotonos, présentent un nystagmus et des mouvements de mastication. Les animaux meurent généralement pendant ou à la suite d'une telle crise.

Des formes sub-aiguës avec des signes moins prononcés, et des formes sur-aiguës avec mort soudaine peuvent aussi survenir selon la race de ruminant et la souche d'*E. ruminantium* impliquée.

Les lésions macroscopiques les plus communes sont l'hydropéricarde, l'hydrothorax, l'œdème pulmonaire, la congestion intestinale, l'œdème des nœuds médiastinaux et bronchiaux (4), des pétéchies sur le péricarde et l'endocarde, la congestion cérébrale et une splénomégalie modérée.

Le diagnostic de présomption de cowdriose est basé sur la présence des vecteurs *Amblyomma*, de signes nerveux et de transsudats dans les cavités péricardique et thoracique à l'examen *post mortem*. Lors du diagnostic clinique, les maladies suivantes doivent être prises en compte : la babésiose cérébrale bovine, la theilériose, l'anaplasmose, le botulisme, l'haemonchose chez les petits ruminants, la rage et les empoisonnements.

## B. TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC

### 1. Identification de l'agent pathogène

Au cours de la phase fébrile, *E. ruminantium* peut facilement être isolé en culture à partir du sang ou du plasma ; cependant, il est difficile de détecter ces bactéries dans des frottis de sang. Des colonies typiques d'*E. ruminantium* peuvent être observées dans les frottis de cerveau après la mort, ce qui autorise un diagnostic définitif de cowdriose.

Il n'est pas nécessaire d'ouvrir la boîte crânienne. Une alternative (42) est de couper la tête de l'animal en avant de la première vertèbre cervicale. Puis une curette est introduite au travers du *foramen magnum* entre la moelle et les méninges. La curette est retournée vers le cerveau et retirée avec une portion de cervelet. Une autre méthode consiste à faire un trou dans le crâne avec un marteau et un gros clou, puis à aspirer une fraction de cerveau avec une aiguille et une seringue. Ces méthodes diminuent aussi le danger pour l'opérateur au cas où les signes nerveux seraient dus à la rage.

Chez l'animal vivant, une biopsie de cerveau peut être obtenue stérilement et sans danger après anesthésie locale, bien qu'avec difficulté ; une contention appropriée est indispensable, notamment pour les gros animaux à cornes. Les colonies d'*Ehrlichia* sont observées pendant la période de fièvre. La méthode est utile pour les études expérimentales mais non souhaitable pour le diagnostic de routine.

Les colonies d'*E. ruminantium* sont encore présentes 48 h après la mort dans un cerveau conservé à température ambiante (20 - 25 °C) et jusqu'à 34 jours dans un cerveau conservé au réfrigérateur à 4 °C (5).

Un petit fragment de matière grise (de la taille d'une tête d'allumette) est placé sur une lame de microscope, écrasé pour donner une consistance pâteuse à l'aide d'une autre lame. Tout en maintenant la pression, les lames sont glissées l'une sur l'autre sur toute leur longueur pour obtenir une seule couche de cellules. Les lames sont séchées à l'air, fixées au méthanol, colorées au Giemsa dilué dans du tampon Sørensen (2,54 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 8,55 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ; q.s.p 5 litres d'eau distillée), pH 7,2, et rincées à l'eau courante. Les colorations de Giemsa rapide (DiffQuick, RAL555, CAM's Quick stain) donnent des résultats plus rapides, mais le contraste des couleurs est généralement de moins bonne qualité. Certains colorants rapides donnent un excellent contraste, par exemple le colorant Hema 3.

Les lames sont examinées au microscope à un faible grossissement (objectif  $\times 10$ ) afin de rechercher les capillaires cérébraux. Un objectif à immersion d'un grossissement d'au moins  $\times 50$  est utile pour l'identification des colonies de rickettsies. L'identification des colonies d'*E. ruminantium* requiert de l'expérience pour les différencier des hémoparasites (*Babesia bovis*), certaines cellules sanguines (thrombocytes, granulocytes), les structures subcellulaires normales (mitochondries, granules de mastocytes), ou des artefacts de coloration (précipités de colorants), etc. La spécificité de la lecture peut être améliorée par coloration par la méthode d'immunoperoxydase de coupes histologiques de cerveau fixées au formol.

Les colonies d'*E. ruminantium* sont formées d'agrégats de granules (0,2 à 0,5  $\mu\text{m}$ ) parfois organisés en anneaux ou en fer à cheval (1 à 3  $\mu\text{m}$ ) et qui sont positionnés près du noyau à l'intérieur de la cellule endothéliale. Les granules peuvent être rares, particulièrement dans les formes suraiguës, mais ils sont toujours présents dans le cerveau d'un animal qui est mort de cowdriose. Cependant, si l'animal a subi un traitement avec de la doxycycline ou de la tétracycline 48 h avant, les granules d'*Ehrlichia* tendent à se lyser, ce qui rend le diagnostic très difficile voire impossible.

Du sang frais prélevé chez les animaux suspects peut être inoculé par voie intraveineuse chez un mouton ou une chèvre sensible. L'observation de signes cliniques et d'*E. ruminantium* dans le cerveau des animaux inoculés a une valeur diagnostic de cowdriose.

La microscopie électronique à transmission a été utilisée pour démontrer que les *E. ruminantium* se développent à l'intérieur d'une structure vacuolaire entourée par la membrane cytoplasmique de la cellule endothéliale (39). Chaque organisme est entouré d'une double membrane. Dans les structures vacuolaires, on peut identifier des formes denses aux électrons (corps élémentaires), ainsi que des formes intermédiaires réticulées.

#### a) Isolement de *Ehrlichia ruminantium* en culture *in vitro*

L'isolement d'*E. ruminantium* en culture de cellules n'est pas l'épreuve de choix pour confirmer le diagnostic de cowdriose, car la procédure réclame beaucoup de travail et est très longue bien que diverses lignées cellulaires permettent sa culture. Pour un diagnostic rapide, l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) ou les techniques moléculaires sont préférables. L'isolement d'*E. ruminantium* est cependant nécessaire pour caractériser les souches présentes dans une région pour les programmes de vaccination. *E. ruminantium* peut être isolée du sang d'animaux en phase de réaction clinique par culture dans des cellules endothéliales de ruminants (45). Les cellules endothéliales de cordon ombilical, aorte, ou d'artère pulmonaire de différentes espèces de ruminants (bovins, moutons, chèvres) sont utilisées le plus souvent pour l'isolement, bien que d'autres types de cellules endothéliales (capillaires cérébraux, cellules endothéliales circulantes, etc.) ont été décrites pour la culture du micro-organisme. Des cellules endothéliales d'oryx, d'élan, de buffle, de koudou et de phacochères peuvent également être utilisées pour la culture d'*E. ruminantium*. Aucune lignée cellulaire de référence n'a été définie pour l'isolement.

##### • Protocole d'isolement

- i) Le sang d'un animal en phase clinique (le moment idéal pour la détection de la bactérie est le 2<sup>e</sup> ou le 3<sup>e</sup> jour de la fièvre) est prélevé sur anticoagulant (héparine ou citrate de sodium, mais pas sur de l'acide éthylène diamine tétra-acétique) et dilué au 1/2 dans du milieu essentiel minimum de Glasgow (Glasgow MEM) additionné de 10 % de sérum de veau fœtal inactivé, 2,95 mg/ml de bouillon tryptose phosphate, 200 mM de L-glutamine, et d'antibiotiques si nécessaire (100 unités internationales (UI)/ml de pénicilline, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de streptomycine).
- ii) Le milieu de culture est retiré de la monocouche de cellules endothéliales et du sang infectieux (environ 2 ml pour un flacon de 25  $\text{cm}^2$ ) est ajouté. Le flacon est placé à l'incubateur à 37 °C sur un agitateur oscillant pendant 2 h.
- iii) Après incubation, le sang est retiré et le tapis cellulaire est rincé 3 fois précautionneusement avec du milieu de culture préchauffé à 37 °C. Du milieu de culture neuf est ensuite ajouté et le flacon placé à l'incubateur à 37 °C. Le milieu de culture est changé 2 fois par semaine.

(L'utilisation de plasma à la place du sang est plus efficace quand il est prélevé sur un animal présentant une réaction fébrile  $> 41$  °C. Dans ce cas, les étapes ii) et iii) ci-dessus peuvent être remplacées comme suit :

- Ensemencer 4 ml de plasma (un inoculum plus petit peut être utilisé si la quantité de plasma est insuffisante) sur un tapis de cellules endothéliales sensibles et incubé 1 h à 7 °C sur un agitateur oscillant.
  - Enlever le plasma et rincer avec du milieu de culture puis ajouter 5 ml de milieu de culture (pour un flacon de 25  $\text{cm}^2$ ). Suivre le développement d'un effet cytopathogène.
- iv) Le tapis cellulaire est observé régulièrement pour détecter l'apparition des petites plages de lyse. Les premières plages apparaissent généralement après 2 semaines. Le passage sur un nouveau tapis cellulaire sain est effectué quand la lyse atteint environ 80 % du tapis infecté. Les cellules restantes

sont colorées à l'éosine bleu de méthylène, par la méthode de Giemsa ou DiffQuick et observées au microscope afin de rechercher la présence de morula d'*E. ruminantium*. Les cellules peuvent aussi être colorées par une épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI) ou d'immunoperoxidase utilisant un anticorps spécifique d'*E. ruminantium* : le test d'immunoperoxidase n'est pas utilisé en routine.

#### b) Isolement d'*Ehrlichia ruminantium* in vivo

Il est possible de déterminer la présence de cowdriose dans un troupeau, une région ou un pays, ou d'isoler une nouvelle souche d'*E. ruminantium*, par inoculation de sang ou un homogénat de tiques à un animal sensible. Cependant, en raison de considérations de bien être animal, cette méthode n'est pas recommandée. Le sang d'animaux individuels ou un pool de sang est injecté lentement à une dose de 10 à 100 ml par voie intra-veineuse à un mouton ou une chèvre sensible. Le sang qui sert d'inoculum (pour déterminer le statut infectieux du troupeau) n'est infectieux que si des animaux cliniquement infectés sont présent dans le troupeau ; cependant, cette méthode ne détectera que rarement les animaux guéris porteurs. Une autre méthode consiste à collecter et à broyer des tiques *Amblyomma* adultes, et après centrifugation de l'homogénat à inoculer le surnageant à un animal sensible. Cette dernière méthode est plus sensible que celle du sang d'animaux infectés (spécialement de sang d'animaux guéris), car la concentration d'*E. ruminantium* est plus élevée dans les tiques que dans le sang. Cependant, le taux d'infection des tiques sur le terrain est variable et parfois à peine de 1 % (6). Dans ce cas, pour détecter une infection, au moins 100 tiques sont nécessaires et davantage si possible. Dans les deux cas, l'inoculum additionné de 10 % (concentration finale) de diméthyl sulfoxyde peut être conservé en azote liquide pendant plusieurs années. Il faut noter que l'inoculation de tiques à un animal sensible peut provoquer une réaction d'anaphylaxie, qui peut être prévenue par l'administration simultanée d'adrénaline. Le développement de signes cliniques et la détection de rickettsies circulantes par des méthodes moléculaires et/ou la démonstration d'*E. ruminantium* dans le cerveau d'un ruminant inoculé, ou au 2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour de fièvre, permettent de poser le diagnostic de cowdriose. De plus, la confirmation peut être obtenue par isolement *in vitro* sur cellules endothéliales à partir du plasma des animaux inoculés.

## 2. Méthodes moléculaires

#### a) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par sonde ADN

Un fragment de génome spécifique d'*E. ruminantium*, pCS20, a été cloné et utilisé comme sonde nucléique (24, 50). Il reconnaît toutes les souches d'*E. ruminantium* testées jusqu'à présent. Cette sonde, nommée pCS20, détecte facilement l'infection chez les animaux cliniquement réagissant et chez les tiques *Amblyomma* expérimentalement infectées (18, 20, 24, 51). Cependant, elle n'est pas suffisamment sensible pour détecter la plupart des animaux porteurs ou les faibles taux d'infection des tiques (35, 36). La sonde pCS20 est plus sensible que les sondes 16S et MAP1 (*Major Antigenic Protein 1*) pour la détection d'*E. ruminantium* dans les tiques quand elle est hybridée sur un produit d'amplification homologue obtenu par PCR (2).

#### b) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par PCR et PCR nichée

Deux amorces – AB128 (5'-ACT-AGT-AGA-AAT-TGC-ACA-ATC-TAT-3') et AB129 (5'-TGA-TAA-CTT-GGT-GCG-GGA-AAT-CCT-T-3') – ont été dérivées à partir de la séquence nucléotidique de la sonde pCS20 (24) pour être utilisées dans une réaction de PCR. Ces sondes amplifient un fragment de 279 pb qui est spécifique d'*E. ruminantium*. L'hybridation de la sonde pCS20 marquée sur les produits d'amplification au cours d'une étape supplémentaire a permis d'augmenter la sensibilité : cette technique est 350 fois plus sensible que l'utilisation de la sonde ADN seule pour détecter *E. ruminantium* directement sur l'ADN extrait de tiques. Les faibles niveaux d'infection chez les animaux et les tiques nourries sur animaux porteurs peuvent être détectées par PCR, alors que l'hybridation avec la sonde pCS20 seule (sans PCR préalable) reste généralement négative (37). La limite de détection par PCR conventionnelle a été déterminée expérimentalement entre 10 et 100 organismes alors qu'elle est de 1 à 10 organismes par PCR-hybridation. La PCR-hybridation a permis de détecter 37 souches de toutes les zones d'enzootie testées avec une spécificité de 98 %. La sensibilité de la PCR est variable, comprise entre 88 % et 97 % avec des échantillons de tiques contenant  $10^7$  à  $10^4$  organismes, et chutant à 61 % et 28 % avec des échantillons contenant respectivement  $10^3$  et  $10^2$  organismes (35). En conséquence, le taux de 86 % de tiques positives gorgées sur un animal en réaction clinique, chute à 21 % quand elles sont gorgées sur des animaux porteurs car la rickettsiémie est inférieure chez ces animaux. La PCR-hybridation a été largement utilisée pour étudier l'épidémiologie de la cowdriose en Afrique australe.

Deux épreuves de PCR nichées ont été mises au point pour améliorer la détection des faibles rickettsémies et pour supprimer l'étape d'hybridation (30, 43). Ces deux épreuves ciblent la séquence pCS20. L'épreuve de Semu *et al.* utilise deux amorces externes U24 (5'-TTT-CCC-TAT-GAT-ACA-GAA-GGT-AAC-3') et L24 (5'-AAA-GCA-AGG-ATT-GTG-ATC-TGG-ACC-3'), puis les amorces AB 128 et AB 129 pour la réaction nichée. La sensibilité de cette épreuve est de 1 copie du gène du fragment pCS20 ou d'1 organisme. L'autre PCR nichée utilise une paire d'amorces externes qui comprend l'amorce AB128 et l'amorce anti-sens

AB130. Elles amplifient un fragment de 413 pb utilisé comme matrice dans un second cycle de PCR réalisé avec les amorces internes AB128 et AB129. L'utilisation des amorces AB128 et AB129 évite la nécessité de réévaluer totalement la spécificité de l'épreuve. La PCR nichée montre une amélioration de sensibilité de 100 fois en comparaison avec la PCR simple, et une limite de détection d'environ 6 organismes. La conséquence directe est l'augmentation de 1,7 % à 36 % du taux de tiques sauvages trouvées positives dans une enquête épidémiologique réalisée dans les Caraïbes. La limite de détection est comparable à celle de la méthode de PCR/hybridation qui est beaucoup plus complexe et longue à mettre en œuvre. La PCR nichée pCS20 permet une détection fiable d'*E. ruminantium* à partir des tiques, du sang, du cerveau et des poumons d'animaux infectés, que les prélèvements soient traités frais, après congélation ou conservation dans l'éthanol à 70 %. Une des contraintes de la PCR nichée est le très grand soin qu'il convient d'apporter pour éviter les contaminations dues à l'ouverture répétée des tubes contenant la première réaction de PCR lors de la réalisation de l'étape PCR nichée.

Une PCR nichée ciblant le gène polymorphe complet *map1* a été développée en parallèle afin de typer les souches par polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) ou séquençage du produit d'amplification directement à partir des échantillons pathologiques détectés positifs par la PCR nichée pCS20 (30). Une autre PCR nichée qui cible le gène polymorphe *map1* peut être utilisée pour typer les souches de cowdriose qui circulent, en vue de la formulation des vaccins et de la gestion de la maladie. Les produits d'amplification de la PCR sont analysés par polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou par séquençage. La forte diversité génétique d'*E. ruminantium* observée sur le terrain peut influencer la formulation des vaccins et nécessite davantage d'investigations. La PCR nichée *map1* a une sensibilité légèrement inférieure à celle de la PCR nichée pCS20. La limite de détection est estimée à environ 60 organismes et seulement 91 % des échantillons positifs par PCR nichée pCS20 sont également révélés positifs par la PCR nichée *map1*, certains positifs de faible intensité avec la PCR nichée pCS20 restant négatifs avec la PCR nichée *map1*.

Les amorces 32F1 et 32R1 dérivées de la séquence du gène *map1* d'*E. ruminantium*, de même qu'une autre paire d'amorces ayant pour cibles les gènes *map1*, *map2*, *gltA* et *16SADNr* d'*E. ruminantium* ont été utilisées pour détecter l'agent pathogène chez les tiques, le sang et la moelle osseuse de moutons porteurs et d'ongulés sauvages africains, mais ces techniques n'ont pas été évaluées ou utilisées à grande échelle.

Bien que les méthodes de PCR se montrent très efficaces pour la détection de l'infection chez les tiques ou dans des échantillons d'animaux pendant la phase clinique de la maladie ou après la mort, les études restent limitées pour évaluer leur valeur chez les ruminants porteurs. La présence d'*E. ruminantium* peut aisément être démontrée dans le sang d'animaux infectés juste avant l'augmentation de la réaction fébrile et pendant quelques jours après guérison (24, 43). Après cette période, sa détection est sporadique et semble dépendre du niveau de rickettsémie. Dans une étude conduite au Zimbabwe, seulement 3,3 % et 26,7 % des bovins et 23,3 % des chèvres ont été trouvées positives alors que les données collectées à partir des tiques provenant de la même région suggèrent que, vu leur âge, tous les bovins et toutes les chèvres auraient dû être exposés ou infectés (19). Une étude comparative de l'ELISA MAP1 et de l'épreuve PCR/hybridation pCS20, en vue d'évaluer leur sensibilité respective sur une période de 8 semaines (tests réalisés tous les 15 jours), a été conduite sur 15 bovins localisés dans une ferme du Zimbabwe dans laquelle la cowdriose était enzootique, la lutte anti-tiques réduite au minimum et avec une pression d'infection élevée (44). Dans cette ferme, le taux d'infection des tiques par *E. ruminantium* était de 10 % à 12 %. Les données ont démontré que la PCR pCS20 était plus fiable pour détecter l'infection à partir du sang des bovins que la recherche des anticorps par l'ELISA MAP1 indirect. Les bovins n'ont pas été trouvés positifs en PCR ou en ELISA à chaque fois et certains bovins sont restés négatifs en PCR tout au long de l'étude. Ces résultats suggèrent que les niveaux de rickettsémie varient et que la PCR ne détecte l'infection que lorsque les niveaux sont élevés. La détection des animaux guéris/porteurs est moins fiable que la détection des animaux cliniquement infectés. Ceci souligne le fait que pour la détermination de l'infection chez les animaux avec une maladie sub-clinique, il est conseillé de répéter l'épreuve de PCR pCS20. On ne sait pas si l'absence de détection chez la plupart des animaux porteurs est due à une sensibilité insuffisante des méthodes de PCR pour détecter une rickettsémie très basse, ou à un relargage intermittent des organismes dans la circulation. Une technique pratique de confirmation du statut d'animal porteur dont le sang est négatif en PCR, est de gorger des lots de tiques vierges sur l'animal et de tester les tiques par une PCR semi-nichée pCS20. On ne sait pas si les tiques agissent simplement en concentrant les organismes circulants, en amplifiant leur nombre, ou même en induisant le relargage des micro-organismes dans la circulation pendant le repas.

### c) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par la technique de reverse line blot

La technique de reverse line blot (RLB) a été utilisée pour la détection simultanée d'*Anaplasma* et *Ehrlichia* spp. connues chez les ruminants sur la base des différences du gène codant la petite sous-unité de l'ARNr (3). Les amorces 16S8FE et B-GA1B-new ont été dérivées à partir des domaines conservés et utilisées pour amplifier un fragment de 492-498 pb du gène de l'ARNr 16S encadrant la région variable V1. Des sondes oligonucléotidiques spécifiques ont été dérivées dans la boucle V1 afin de permettre la détection spécifique d'*E. ruminantium*, *E. ovina*, *E. sp.* souche Omatjenne, *Anaplasma marginale*, *A. centrale*, *A. bovis*, *A. ovis* et *A. phagocytophilum*. Une sonde oligonucléotidique réagissant avec toutes

les espèces (catch-all probe) a aussi été dérivée pour servir de témoin dans le cas où un produit de PCR n'hybriderait avec aucune sonde spécifique d'espèce. Dans la méthode, les sondes spécifiques d'espèces sont liées de façon covalente à la membrane d'hybridation qui est hybridée avec un produit de PCR obtenu avec les amorces 16S8FE et B-GA1B-new. Les produits de PCR obtenus avec tous les micro-organismes mentionnés ci-dessus ont montré un accrochage seulement avec les sondes oligonucléotidiques spécifiques. Aucun produit de PCR n'a été détecté et aucune hybridation n'est intervenue quand la PCR-RLB a été appliquée à *Theileria annulata*, *Babesia bigemina* ou à l'ADN de mammifères. De façon similaire, les tiques servant de témoin négatif se sont toujours avérées négatives en RLB alors qu'il a été possible de détecter l'infection par *E. ruminantium* dans 15 à 70 % de tiques nourries sur des moutons infectés expérimentalement ou porteurs asymptomatiques. Au Mozambique, *E. ruminantium* a aussi pu être détecté dans le sang de 12 petits ruminants sentinelles placés sur le terrain avec les animaux infectés ; une infection mixte a été détectée chez 5 des animaux sentinelles infectés, démontrant ainsi l'utilité de la méthode pour détecter les infections multiples. Cependant, la sensibilité de la méthode n'a pas été déterminée et une validation par des enquêtes épidémiologiques à large échelle est nécessaire.

#### d) Détection d'*Ehrlichia ruminantium* par PCR en temps réel

Deux épreuves de PCR en temps réel (QPCR) ont été décrites pour la détection et la quantification d'*E. ruminantium*. Dans un premier test, un fragment de 182 pb dérivé du gène non-polymorphe *map1-1* a été amplifié et la détection a été réalisée en utilisant la méthode SYBR de Green (41). L'ADN de 6 isolats différents a été amplifié avec succès. La limite de détection rapportée est supérieure à 0,1 organisme/μl, mais ce résultat n'a pas fait l'objet d'une investigation approfondie. Le comptage d'*E. ruminantium* au microscope après coloration par la méthode de Giemsa ne donne pas des résultats précis. L'épreuve n'améliore pas de façon significative la sensibilité de détection de la PCR nichée, bien qu'elle permette la quantification d'*E. ruminantium*. Non seulement la QPCR n'a subi qu'une validation limitée, mais en outre elle n'a été utilisée qu'une seule fois au cours d'une étude visant à suivre la cinétique d'*E. ruminantium* dans le sang de moutons expérimentalement infectés. *E. ruminantium* a été détectée seulement pendant la période d'hyperthermie. Comparée aux PCR non-quantitative, la QPCR n'améliore donc pas la détection des porteurs asymptomatiques.

Une deuxième PCR en temps réel (basée sur la méthode SYBR de Green) a été décrite et largement validée pour la caractérisation de la cinétique de multiplication et de relargage d'*E. ruminantium* dans des cultures de cellules endothéliales et pour son utilisation éventuelle au cours de la production en masse d'*E. ruminantium* en bio-réacteurs (40). Le produit est un fragment de 873 pb du gène *map1*. Le référent externe pour la quantification d'*E. ruminantium* est un néo-plasmide qui contient une copie de la séquence cible de *map1*, ce qui donne une technique plus précise pour quantifier les organismes que la méthode précédemment décrite dans laquelle le comptage d'*E. ruminantium* est fait au microscope. Le spectre quantitatif de la dynamique permet des mesures exactes dans des échantillons contenant entre  $10^2$  et  $10^8$  copies du gène. La méthode a été appliquée avec succès à 4 isolats différents mais n'a pas été validée sur des échantillons à des fins diagnostiques.

#### • Lecture des résultats

Comme *E. ruminantium* est une bactérie intracellulaire qui ne peut être cultivée en milieu acellulaire et que son isolement est difficile et prend plusieurs semaines, les techniques de détection moléculaires sont les plus appropriées pour le diagnostic de cowdriose. La PCR apparaît comme la plus simple à mettre en œuvre et plus sensible que les sondes ADN. Avec toutes les PCR cependant, il est nécessaire de s'assurer de l'absence de toute contamination croisée entre les échantillons. Des témoins positifs et négatifs doivent être inclus lors de chaque épreuve. Comme la sérologie de la cowdriose a de nombreuses limites (cf. Section B.3.), la PCR pourrait être utilisée pour confirmer si des animaux séronégatifs originaires de zones d'enzootie ne sont pas infectés avant leur déplacement vers une zone indemne qui pourrait devenir infectée en cas de présence de vecteurs potentiels. Cependant, malgré des résultats expérimentaux intéressants pour la détection de porteurs asymptomatiques, il n'y a pas suffisamment d'informations disponibles sur la fiabilité de la détection par PCR des porteurs, et des études de terrain complémentaires doivent être conduites avant de recommander le meilleur protocole pour la détection des animaux porteurs. Il est néanmoins évident au vu de l'étude menée au Zimbabwe que la détection des porteurs sera difficile et qu'il faudra de nombreux essais répétés pour évaluer le statut infectieux (44). Les résultats actuels obtenus par la PCR, la PCR nichée, l'épreuve RLB et plus récemment la QPCR, montrent que la détection d'*E. ruminantium* dans le sang est fiable seulement pendant et autour de la phase fébrile de la maladie. Les méthodes basées sur la PCR apparaissent comme les plus fiables pour détecter l'infection chez les tiques, et cela peut avoir une valeur épidémiologique pour la détermination de la distribution géographique d'*E. ruminantium*. De plus, si nécessaire dans les zones d'enzootie, le test de tiques (à l'origine non infectées) nourries sur animaux suspects augmenterait grandement la sensibilité de la détection des porteurs quand la sérologie ou la PCR sur le sang se sont avérées négatives. Le procédé n'est cependant pas pratique pour un diagnostic de routine car il nécessite l'entretien d'une colonie de tiques et une capacité d'expérimentation sur animaux.

### 3. Épreuves sérologiques

Plusieurs épreuves sérologiques ont été décrites pour le diagnostic de cowdriose : une épreuve d'IFI utilisant une culture d'*E. ruminantium* en cellules endothéliales comme antigène (CIFA test), un ELISA indirect, un ELISA de compétition (C-ELISA), et un Western blot. L'épreuve d'IFI utilisant les macrophages péritonéaux de souris infectées par *E. ruminantium* (MIFA test) n'est plus utilisée (10).

La principale faiblesse de toutes ces épreuves est la révélation de réactions faussement positives dues à des déterminants antigéniques communs présents sur la protéine MAP1 d'*E. ruminantium* (11) et des protéines homologues de plusieurs autres espèces d'*Ehrlichia* (23, 43). Ces épreuves ne sont quasiment plus utilisées en épidémiologie ou pour le diagnostic. L'épreuve CIFA est encore utilisée dans certains laboratoires, mais les résultats doivent être interprétés en tenant compte des réactions faussement positives.

Pour pallier le problème des réactions croisées avec *Ehrlichia*, deux ELISA basés sur un antigène recombiné MAP1 ont été mis au point. Le premier est un ELISA indirect basé sur la région immunogénique de la protéine MAP1 (appelé MAP1-B) qui donne beaucoup moins de réactions croisées avec des espèces d'*Ehrlichia* (MAP1-B ELISA) (49). Le second est un ELISA de compétition qui utilise le gène *map1* cloné dans le baculovirus et des anticorps monoclonaux (AcMs) produits contre la protéine MAP1 (MAP1 C-ELISA) (12). Les deux épreuves ont considérablement amélioré la spécificité de la détection, mais elles montrent encore une certaine réactivité avec des sérums à haut titre contre *E. canis*, *E. chaffeensis* et un agent microbien du cerf de Virginie non encore classé. Le MAP1-B ELISA détecte les anticorps dirigés contre *E. muris* (Mahan S.M., communication personnelle) une *Ehrlichia* qui est apparentée et très proche d'*E. ruminantium* ; cet agent pathogène est retrouvé chez le cerf de Virginie en Géorgie au États-Unis et est transmis par les tiques *Amblyomma americanum* (15). La sérologie comme outil de diagnostic chez un animal exposé à *E. ruminantium* n'est donc pas fiable. La sérologie ne doit être utilisée qu'au niveau du troupeau en prenant en compte le contexte épidémiologique et, si nécessaire, en la complétant par des techniques moléculaires.

Jusqu'à présent, l'ELISA MAP1-B est celui qui a été le plus largement utilisé.

#### a) Épreuve d'immunofluorescence indirecte utilisant les cultures de cellules endothéliales comme antigène (29)

Pour préparer l'antigène, une souche d'*E. ruminantium* est cultivée dans des cellules endothéliales de ruminant. Quand la plupart des cellules sont lysées, les cellules adhérentes restantes sont raclées et mélangées au surnageant. Les cellules sont centrifugées 3 fois dans une solution physiologique tamponnée au phosphate (PBS) à 200 g pendant 10 min. 10 µl de la suspension cellulaire lavée sont déposés dans les puits d'une lame pour immunofluorescence. Les lames d'antigène sont séchées, fixées à l'acétone et conservées à -20 °C.

- **Protocole**

- i) Les sérums à éprouver sont dilués au 1/20 ou à une dilution supérieure dans du PBS, déposés dans les puits d'antigène et mis à incuber pendant 30 min dans une chambre humide à 37 °C.
- ii) Les lames sont lavées dans du PBS pendant 15 min.
- iii) Le conjugué anti-espèce approprié, généralement dilué au 1/60, est ajouté pour recouvrir les puits. Les lames sont incubées de nouveau pendant 30 min à 37 °C.
- iv) Après un second lavage, les lames sont montées dans du tampon à la glycérine sous une lamelle et examinées avec un microscope à fluorescence.
- v) Des témoins positifs et négatifs sont inclus sur chaque lame.

#### b) L'épreuve immuno-enzymatique MAP1-B (43, 49)

Le fragment d'amplification par PCR MAP1-F2R2 cloné dans le vecteur pQE9 qui code les acides aminés 47 à 152 de la protéine MAP1 incluant la région immunogène MAP1-B est exprimé dans *Escherichia coli* M15[pREP4] en protéine de fusion contenant 6 résidus histidine. La protéine recombinée MAP1-B est purifiée sur agarose Ni<sup>2+</sup>-NTA (*Nitrilotriacetic Acid Agarose*) en conditions dénaturantes selon le protocole fourni par le fabricant. L'antigène est conservé à 4 °C et chaque lot est titré.

L'antigène est dilué à 0,5 µg/ml dans du tampon carbonate de sodium 0,05 M, pH 9,6, adsorbé sur plaque de polystyrène par incubation pendant 1 h à 37 °C, et conservé à 4 °C jusqu'à utilisation. Cependant, dans un essai préalable, la concentration de l'antigène à 2 µg/ml réduisait le bruit de fond et améliorait la spécificité (données non présentées, 43).

- **Protocole**

- Les plaques sont bloquées pendant 30 min par addition de 100 µl par puits de PBS 0,1 M, pH 7,2, additionné de 0,1 % de Tween 20 et de 3 % de lait écrémé en poudre (PBSTL).
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBS additionné de 0,1 % de Tween 20 (PBST) et 2 fois en eau distillée.
- 100 µl de sérum à tester dilué au 1/100 en PBSTL sont distribués en double dans les puits et incubés pendant 1 h à 37 °C.
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBST et 2 fois en eau distillée.
- Le conjugué peroxydase IgG anti-espèce dilué de façon optimale dans du PBSTL est distribué sous un volume de 100 µl par puits et les plaques sont incubées pendant 1 h à 37 °C.
- Après un lavage identique à celui de l'étape iv, chaque puits est rempli de 100 µl de tampon citrate 0,1 M, pH 5,5, contenant 0,5 mg/ml d'orthophénylène-diamine et 3 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 9 %.
- La réaction est stoppée après 30 min d'incubation à température ambiante (20 - 25 °C) par addition de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. L'absorbance est lue à 495 nm. Des témoins positifs et négatifs sont inclus dans chaque plaque.

c) **L'épreuve immuno-enzymatique MAP1 de compétition (32)**

*L'antigène recombiné MAP1 est préparé comme suit :* des larves de l'insecte *Trichoplusia ni* âgées de 8 jours sont infectées par du baculovirus exprimant le gène *map1* et les larves mourantes sont homogénéisées (10 % [P/v]) dans du PBS additionné de 0,001 % (v/v) de Triton X-100.

*L'anticorps monoclonal anti-MAP1 est préparé comme suit :* des cellules spléniques de souris BALB/C préalablement inoculées avec de l'homogénat de larves sont fusionnées avec des cellules SP2/0. Les surnageants de culture d'hybridomes sont criblés pour leur réactivité avec MAP1 par immunoblotting et immunoperoxydase. Une culture positive est sous-clonée, l'isotype de l'anticorps déterminé et utilisé ensuite pour la production d'ascite.

Après une dilution au 1/800 (v/v) dans du PBS, l'antigène est adsorbé sur des plaques de polystyrène (Nunc-Immuno Plates PolySorp) par incubation à 4 °C pendant une nuit et les plaques sont conservées à -70 °C.

- **Protocole**

- Avant usage, Les plaques sont bloquées pendant 30 min par addition de 100 µl par puits de 0,1 M de PBS, pH 7,2, additionné de 0,05 % de Tween 20 et de 5 % de lait écrémé en poudre.
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBS/Tween, 50 µl/puits de sérum à tester dilué au 1/50 dans du PBS additionné de 0,05 % Tween 20 et de 1 % de lait écrémé en poudre (PBSTL) sont distribués en double dans les puits et incubés pendant 30 min à 37 °C.
- Sans lavage supplémentaire, 75 µl/puits d'AcMs dilué au 1/4 000 (v/v) dans du PBSTL sont distribués et la plaque est mise à incuber pendant 30 min à 37 °C.
- Les plaques sont lavées 3 fois dans du PBS/Tween et le conjugué peroxydase IgG anti-souris dilué de façon optimale dans du PBSTL est distribué sous un volume de 50 µl par puits. La plaque est incubée pendant 1 h à 37 °C.
- Après 3 lavages identiques à ceux de l'étape précédente, chaque puits est rempli de 100 µl de tampon citrate 0,1 M, pH 5,5, contenant 0,5 mg/ml d'orthophénylène-diamine et 3 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 9 %. Après 30 min d'incubation à température ambiante à l'obscurité, la réaction est stoppée par addition de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N et l'absorbance est lue à 495 nm. Des témoins positifs et négatifs sont inclus dans chaque plaque.

- **Lecture des résultats**

Toutes les épreuves sérologiques basées sur des antigènes d'*E. ruminantium* non recombinés tels que le CIFA, les ELISA et les Western blot sont encore utilisées pour des études expérimentales, mais plus pour les études épidémiologiques. Les épreuves ont été comparées et évaluées avec des sérums positifs et négatifs vis-à-vis d'*E. ruminantium* (9). Aucun sérum négatif ne s'est révélé faussement positif avec aucune des épreuves. Il y a une bonne corrélation entre les épreuves mais la spécificité des 5 épreuves est réduite à cause de réactions croisées pouvant survenir avec certaines *Ehrlichia* spp.

L'interprétation des résultats des diverses épreuves utilisées pour des études de terrain est de ce fait difficile dans les zones où existent des infections de ruminants à *E. ruminantium*, ce qui est probablement le cas dans la plupart des régions d'enzootie en Afrique. Cette situation a aussi été démontrée dans des fermes sans *Amblyomma*, mais infectées par des espèces de tiques non reconnues comme vecteurs d'*E. ruminantium* (13, 49).

Aussi bien l'ELISA MAP1-B que le C-ELISA MAP1 ont montré une spécificité élevée après évaluation sur 3 000 sérums de ruminants (chèvres, moutons, bovins) prélevés dans 14 îles des petites Antilles infestées par *A. variegatum*, parmi lesquelles seulement 3 sont connues pour être également infectées par *E. ruminantium* (32). La spécificité globale calculée à partir des 11 îles indemnes de cowdriose est de 98,5 % et 99,4 % respectivement pour les C-ELISA MAP1 et l'ELISA MAP1. Bien que quelques sérums faussement positifs soient encore trouvés, ces épreuves semblent à même de résoudre la plupart des problèmes de spécificité rencontrés avec les épreuves plus anciennes. Cependant, une prévalence élevée a été trouvée avec le test dans des régions indemnes de vecteur du Zimbabwe et d'Afrique du Sud sans que cela puisse être expliqué (cela pourrait être dû à un agent présentant des réactions croisées, mais qui ne serait pas transmis par *Amblyomma*) ; il convient de garder cet exemple en mémoire lors de l'interprétation des résultats.

Évaluer la sensibilité des épreuves est plus problématique car elle requiert la connaissance du statut exact d'un grand nombre d'animaux échantillonnés sur le terrain. Comme indiqué précédemment il n'y a pas actuellement de technique simple disponible pour confirmer si un animal est infecté. Expérimentalement, la sensibilité du C-ELISA chez les chèvres a été évaluée à 91,6-95,4 % pour l'ELISA MAP1-B, et 96,3 à 96,9 % pour le C-ELISA (32). Cependant dans une autre étude, la sensibilité avoisinait 95 % pour des seuils fixés à 31 % et 26,6 % du sérum témoin positif respectivement pour les moutons et les chèvres (31). Les calculs sont basés sur un nombre limité d'animaux infectés expérimentalement et testés pendant une période proche de l'inoculation quand tous les animaux sont encore positifs. La sensibilité est inférieure chez les bovins et plusieurs études rapportent qu'après infection la plupart des animaux redeviennent séronégatifs en moins de 6 mois et que quelques animaux ne séroconvertissent jamais (21, 43). Cette observation est en accord avec les différences de séroprévalence observées entre les petits ruminants et les bovins dans les enquêtes épidémiologiques qui ne peuvent être expliquées par un risque plus faible d'infection chez ces derniers. Par exemple, dans des fermes du Zimbabwe situées dans les régions d'enzootie, plus de 90 % des chèvres présentaient des anticorps dans leur sérum comparé à 33 % seulement des bovins dans les mêmes conditions (21). Des observations semblables ont été faites dans les Caraïbes. En outre, dans certaines régions du Zimbabwe considérées comme indemnes de cowdriose, un grand nombre de chèvres ont été trouvées positives avec le MAP1-B ELISA : cette observation complique encore plus le diagnostic sérologique de la cowdriose (13).

Les épreuves sérologiques sont utiles pour l'évaluation de la réponse humorale vis-à-vis de la cowdriose chez les animaux vaccinés. Les épreuves ne devraient pas être utilisées pour cribler les animaux avant l'importation dans des régions indemnes de cowdriose. En effet, les anticorps se maintiennent à des niveaux détectables chez les animaux infectés naturellement seulement pendant quelques mois et que les anticorps circulants disparaissent plus rapidement chez les bovins que chez les petits ruminants. Il est ainsi possible que des animaux séronégatifs soient porteurs de l'infection. La sérologie doit donc être considérée seulement comme une méthode de diagnostic à appliquer au niveau du troupeau, mais pas au niveau individuel (38). Lors de l'interprétation des résultats de la sérologie, d'autres paramètres notamment épidémiologiques doivent être pris en compte.

Les méthodes moléculaires telles que la PCR, peuvent potentiellement aider à la détection des animaux porteurs, mais cette approche possède encore des inconvénients significatifs (cf. Section B.2, méthodes moléculaires).

## **C. SPÉCIFICATIONS APPLICABLES AUX VACCINS ET AUX PRODUITS BIOLOGIQUES À USAGE DIAGNOSTIQUE**

Aucun vaccin n'est commercialement disponible actuellement. La seule méthode d'immunisation contre la cowdriose reste « l'infection et le traitement » basée sur l'utilisation de sang infecté ou d'homogénat de nymphes de tiques suivie par le traitement aux tétracyclines des animaux réagissant (4). Cette méthode est encore utilisée dans plusieurs régions, mais il est probable qu'elle sera remplacée rapidement par une préparation à base d'organismes atténués ou inactivés qui ont donné des résultats prometteurs.

### **1. Préparation vaccinale à base d'organismes inactivés**

Suite à la démonstration que des chèvres sensibles peuvent être protégées par des *E. ruminantium* inactivées dans de l'adjuvant de Freund's (27), il a été démontré que la vaccination à base de corps élémentaires inactivés

d'*E. ruminantium* émulsifiés dans un adjuvant huileux était également possible. Ce vaccin protège également les moutons contre une épreuve virulente (16) par différentes souches d'*E. ruminantium* (17), et les bovins (47) par la même souche que celle utilisée chez les chèvres. Un vaccin de première génération constitué d'*Ehrlichia* inactivées dans de l'adjuvant Montanide ISA50 a démontré une efficacité identique chez la chèvre et le mouton à celle d'une préparation effectuée avec de l'adjuvant de Freund's (28).

Au cours d'essais préalables, les animaux ont été immunisés par deux injections sous-cutanées de 250 à 1 000 µg (selon l'essai) d'antigène émulsifié (50/50) dans de l'adjuvant Montanide ISA50 dans un volume de 2 ml. Récemment, il a été démontré expérimentalement que la dose d'antigène peut être réduite chez des chèvres à 35 µg sans altérer l'effet protecteur (48). Cela représente une division par 28 de la dose proposée dans les descriptions initiales, de 1 g à 35 µg d'*E. ruminantium* sans baisse de la protection. Parallèlement, le protocole de production de masse d'*E. ruminantium* a été mis au point (25). Les paramètres critiques de la production d'*E. ruminantium* sur cellules endothéliales dans des bio-réacteurs avec agitation ont été répertoriés et optimisés. Dans de tels bio-réacteurs et avec du milieu dépourvu de sérum, la production d'*E. ruminantium* est multipliée par 6,5, comparée à la production par des méthodes conventionnelles. En utilisant un bio-réacteur de 2 litres et une dose vaccinale de 30 µg, le coût estimé pour une dose de vaccin est de 0,11 €, ce qui rend le vaccin abordable dans les pays aux ressources limitées. Des contrôles d'activité ont été menés sur des préparations vaccinales entièrement produites selon les protocoles de production de masse et de purification décrits et conservées dans diverses solutions (solution saline ou PBS) et à diverses températures (–20 °C ou +4 °C) ; ces contrôles ont montré que l'activité du vaccin est conservée au cours des procédures de production de masse et de conservation (26).

L'évaluation d'un vaccin inactivé adjuvé avec de l'ISA50 a démontré sa capacité à protéger des moutons contre une épreuve naturelle sur le terrain au Zimbabwe (17). Des essais d'évaluation réalisés en grandeur nature sur le terrain menés en Afrique de l'Est et en Afrique du Sud, utilisant soit une souche prototype isolée au Zimbabwe (souche Mbizi) soit une souche locale isolée des sites d'expérience, ont mis en évidence une réduction significative de la mortalité chez les bovins, les chèvres et les moutons (22). Cependant, dans 3 sites sur 4, le vaccin préparé avec la souche locale s'est révélé moins efficace que le vaccin préparé avec la souche Mbizi, ce qui suggère une mauvaise adéquation vis-à-vis du répertoire antigénique des isolats présents dans chaque site. L'absence de protection croisée entre les isolats d'*E. ruminantium*, du fait de la diversité de la composition antigénique, est bien connue, mais la complexité des populations d'*E. ruminantium* rencontrées sur le terrain a été sous-estimée. Il a été également démontré au cours d'essais en grandeur nature dans divers systèmes d'élevage en Afrique de l'Ouest, dans des zones géographiques limitées, que plus de 10 géotypes étaient présents avec des réactions de protection croisées différentes ; ce qui n'est pas sans conséquence pour la protection obtenue avec des préparations vaccinales inactivées (résultat non publiés).

Le vaccin avec la souche Mbizi inactivée est en cours de mise au point en vue de sa commercialisation à l'Onderstepoort Biological Products en Afrique du Sud (Mahan S.M., communication personnelle). Ces vaccins inactivés n'empêchent pas l'infection mais réduisent la mortalité chez les animaux vaccinés lorsqu'ils sont exposés à une épreuve virulente. Néanmoins, un avantage réside dans le fait que plusieurs souches de terrain peuvent être incorporées dans la préparation vaccinale afin d'augmenter la protection croisée.

Le défi majeur reste la caractérisation de l'étendue de la diversité des souches dans une région qui doit être couverte par une formulation vaccinale adéquate. Cette connaissance sera également essentielle pour toute nouvelle génération de vaccins développés dans le futur.

## 2. Préparation vaccinale à base d'organismes atténués

L'infection des ruminants par des souches vivantes d'*E. ruminantium* induit une solide immunité de longue durée contre les souches homologues. Cette constatation est la base de la méthode « infection-traitement » avec des isolats virulents. L'utilisation d'isolats de virulence atténuée ne nécessitant pas de traitement serait l'idéal, mais peu d'isolats de ce genre sont actuellement disponibles. Un isolat Sénégal atténué a pu être obtenu ; il a conféré une protection de 100 % vis-à-vis d'une épreuve virulente mortelle avec une souche homologue, mais une faible protection vis-à-vis d'une épreuve virulente hétérologue. L'isolat Gardel qui présente un niveau de protection croisée élevé (mais pas total) vis-à-vis d'autres isolats a aussi été atténué. Récemment, un 3<sup>e</sup> isolat d'Afrique du Sud, Welgevonden, a été atténué et offre, dans des conditions expérimentales, une protection complète vis-à-vis de 4 isolats hétérologues (46). L'inconvénient majeur des vaccins atténués réside dans leur très grande fragilité qui entraîne l'obligation de leur conservation dans l'azote liquide et leur distribution sous congélation. En outre, il faut les administrer par voie intraveineuse.

## 3. Préparations avec des vaccins recombinés

Une protection partielle des souris par une vaccination utilisant l'ADN du gène *map1* a été signalée à plusieurs reprises, et une amélioration de la protection a été obtenue grâce à un protocole associant une première injection (plasmide) suivie d'un rappel (MAP1 recombiné) (33). Cependant, aucune protection chez les ruminants n'a été

mise en évidence avec cette stratégie. En revanche, une protection significative chez le mouton a été signalée contre des épreuves virulentes homologues et hétérologues après vaccination avec des plasmides utilisant un cocktail de 4 cadres de lecture (ORF = *open reading frames*) du locus 1H12 du génome d'*E. ruminantium* (7). Aucun résultat supplémentaire n'a été publié depuis. Il est probable que les vaccins recombinés ne seront pas disponibles dans un avenir proche.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ALLSOPP M.T.E.P. & ALLSOPP B.A. (2001). Novel *Ehrlichia* genotype detected in dogs in South Africa. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 4204–4207.
2. ALLSOPP M.T.E.P., HATTINGH C.M., VOGEL S.W. & ALLSOPP B.A. (1999). Evaluation of 16S, *map1* and pCS20 probes for detection of *Cowdria* and *Ehrlichia* species. *Epidemiol. Infect.*, **122**, 323–328.
3. BEKKER C.P., DE VOS S., TAOUFIK A., SPARAGANO O.A. & JONGEJAN F. (2002). Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. *Vet. Microbiol.*, **89**, 223–238.
4. BEZUIDENHOUT J.D., PROZESKY L., DU PLESSIS J.L. & VAN AMSTEL S.R. (1994). Chapter 35: Heartwater. In: Infectious Diseases of Livestock, with special reference to Southern Africa, Coetzer J.A.W., Thomson G.R., Tustin R.C. & Kriek N.P.J., eds. Oxford University Press, Oxford, UK, Vol. 1, 351–370.
5. CAMUS E. & BARRE N. (1988). Le diagnostic de la cowdriose à partir d'écrasement de cerveau. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **41**, 247–252.
6. CAMUS E., BARRE N., MARTINEZ D. & UILENBERG G. (1996). Heartwater (cowdriosis). A Review, Second Edition. Office International des Epizooties, Paris, France, pp. 177.
7. COLLINS E.N., PRETORIUS A., VAN KLEEF M., BRAYTON K.A., ZWEYGARTH E. & ALLSOPP B. (2003). Development of improved vaccines for heartwater. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **990**, 474–484.
8. DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of genera in the families 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.*, **51**, 2145–2165.
9. DU PLESSIS J.L., BEZUIDENHOUT J.D., BRETT M.S., CAMUS E., JONGEJAN F., MAHAN S.M. & MARTINEZ D. (1993). The serodiagnosis of heartwater: a comparison of five tests. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **46**, 123–129.
10. DU PLESSIS J.L. & MALAN L. (1987). The application of the indirect fluorescent antibody test in research on heartwater. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **54**, 319–325.
11. JONGEJAN F. & THIELEMANS J.C. (1989). Identification of an immunodominant antigenically conserved 32-kilodalton protein from *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.*, **57**, 3243–3246.
12. KATZ J.B., DEWALD R., DAWSON J.E., CAMUS E., MARTINEZ D. & MONDRY R. (1997). Development and evaluation of a recombinant antigen, monoclonal antibody-based competitive ELISA for heartwater serodiagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 130–135.
13. KOKONO O., HOVE T., GEYSEN D. & MAHAN S. (2003). Detection of antibodies to the *Ehrlichia ruminantium* MAP1-B antigen in goat sera from three communal land areas of Zimbabwe by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **70**, 231–235.
14. LOUW M., ALLSOPP M.T.E.P. & MEYER E.C. (2005). *Ehrlichia ruminantium*, an emerging human pathogen – a further report. *S. Afr. Med. J.*, **95**, 948–950.
15. LOFTIS A.D., REEVES W.K., TROUGHTON D.R., SPURLOCK J.P., MAHAN S.M., LEVIN M.L. & DASCH G. (2006). Transmission of an *Ehrlichia* sp. closely related to *Ehrlichia ruminantium*, the causative agent of heartwater by *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from Georgia, USA. *J. Vector Biol.*, **31**, 213–223.
16. MAHAN S.M., ANDREW H.R., N. TEBELE, BURRIDGE M.J. & BARBET A. (1995). Immunisation of sheep against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Res. Vet. Sci.*, **58**, 46–49.

17. MAHAN S.M., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A.F. (1998). The inactivated *Cowdria ruminantium* vaccine for heartwater protects against heterologous strains and against laboratory and field tick challenge. *Vaccine*, **16**, 1203–1211.
18. MAHAN S.M., PETER T.F., SEMU S.M., SIMBI B.H., NORVAL R.A. & BARBET A.F. (1995). Laboratory reared *Amblyomma hebraeum* and *Amblyomma variegatum* ticks differ in their susceptibility to infection with *Cowdria ruminantium*. *Epidemiol. Infect.*, **115**, 345–353.
19. MAHAN S.M., PETER T.F., SIMBI B.H. & BURRIDGE M.J. (1998). PCR detection of *Cowdria ruminantium* infection in ticks and animals from heartwater-endemic regions of zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 85–87.
20. MAHAN S.M., PETER T.F., SIMBI B.H., KOCAN K., CAMUS E., BARBET A.F. & BURRIDGE M.J. (2000). Comparison of efficacy of American and African *Amblyomma* ticks as vectors of heartwater (*Cowdria ruminantium*) infection by molecular analyses and transmission trials. *J. Parasitol.*, **86**, 44–49.
21. MAHAN S.M., SEMU S.M., PETER T.F. & JONGEJAN F. (1998). Evaluation of the MAP1-B ELISA for cowdriosis with field sera from livestock in Zimbabwe. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 259–261.
22. MAHAN S.M., SMITH G.E., KUMBULA D., BURRIDGE M.J. & BARBET A. (2001). Reduction in mortality from heartwater in cattle, sheep and goats exposed to field challenge using an inactivated vaccine. *Vet. Parasitol.*, **97**, 295–308.
23. MAHAN S.M., TEBELE N., MUKWEDEYA D., SEMU S., NYATHI C.B., WASSINK L.A., KELLY P.J., PETER T. & BARBET A.F. (1993). An immunoblotting diagnostic assay for heartwater based on the immunodominant 32-kilodalton protein of *Cowdria ruminantium* detects false positives in field sera. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2729–2737.
24. MAHAN S.M., WAGHELA S.D., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R., WASSINK L.A. & BARBET A.F. (1992). A cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and detects infected sheep. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 981–986.
25. MARCELINO I., SOUSA MARCOS F.Q., VERISSIMO C., CUNHA A.E, CARRONDO M.J.T. & ALVES P. (2006). Process development for the mass production of *Ehrlichia ruminantium*. *Vaccine*, **24**, 1716–1725.
26. MARCELINO I., VACHIÉRY N., AMARAL A.I., ROLDAO A., LEFRANÇOIS T., CARRONDO M.J., ALVES P.M. & MARTINEZ D. (2007). Effect of the purification process and the storage conditions on the efficacy of an inactivated vaccine against heartwater. *Vaccine*, **25**, 4903–4913.
27. MARTINEZ D., MAILLARD J.C., COISNE S., SHEIKBOUDOU C & BENSARD A. (1994). Protection of goats against heartwater acquired by immunisation with inactivated elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **41**, 153–163.
28. MARTINEZ D., PEREZ J.M., SHEIKBOUDOU C., DEBUS A. & BENSARD A. (1996). Comparative efficacy of Freund's and Montanide ISA50 adjuvants for the immunisation of goats against heartwater with inactivated *Cowdria ruminantium*. *Vet. Parasitol.*, **67**, 175–184.
29. MARTINEZ D., SWINKELS J., CAMUS E. & JONGEJAN F. (1990). Comparaison de trois antigènes pour le sérodiagnostic de la cowdriose par immunofluorescence indirecte. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **43**, 159–166.
30. MARTINEZ D., VACHIERY N., STACHURSKI F., KANDASSAMY Y., RALINIAINA M., APRELON R. & GUEYE A. (2004). Nested-PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*. Use in genetic diversity analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1026**, 106–113.
31. MBOLOI M.M., BEKKER C.P.J., KRUITWAGEN C., GREINER M. & JONGEJAN F. (1999). Validation of the indirect MAP1-B Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of experimental *Cowdria ruminantium* infection in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 66–72.
32. MONDRY R., MARTINEZ D., CAMUS E., LIEBISCH A., KATZ J.B., DEWALD R., VAN VLIET A.H.M. & JONGEJAN F. (1998). Validation and comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Cowdria ruminantium* infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **849**, 262–272.
33. NYIKA A., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). DNA vaccination with map1 gene followed by protein boost augments protection against challenge with *Cowdria ruminantium*, the agent of heartwater. *Vaccine*, **20**, 1215–1225.

34. PERREAU P., MOREL P.C., BARRE N. & DURAND P. (1980). Existence de la cowdriose (heartwater) à *Cowdria ruminantium* chez les ruminants des Antilles françaises (La Guadeloupe) et des Mascareignes (La Réunion et Ile Maurice). *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **33**, 21–22.
35. PETER T.F., BARBET A.F., ALLEMAN A.R., SIMBI B.H., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2000). Detection of the agent of heartwater, *Cowdria ruminantium*, in *Amblyomma* ticks by PCR: validation and application of the assay to field ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1539–1544.
36. PETER T.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2002). *Ehrlichia ruminantium* infection (heartwater) in wild animals. *Trends Parasitol.*, **18**, 214–218.
37. PETER T.F., DEEM S.L., BARBET A.F., NORVAL R.A.I., SIMBI B.H., KELLY P.J. & MAHAN S.M. (1995). Development and evaluation of PCR assay for detection of low levels of *Cowdria ruminantium* infection in *Amblyomma* ticks not detected by DNA probe. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 166–172.
38. PETER T.F., O'CALLAGHAN C.J., MEDLEY G.F., PERRY B.D., SEMU S.M. & MAHAN S.M. (2001). Population-based evaluation of the *Ehrlichia ruminantium* MAP 1B indirect ELISA. *Exp. Appl. Acarol.*, **25**, 881–897.
39. PIENAAR J.G. (1970). Electron microscopy of *Cowdria (Rickettsia) ruminantium* (Cowdry, 1926) in the endothelial cells of the vertebrate host. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **37**, 67–78.
40. PEIXOTO C.C., MARCELINO I., VACHIERY N., BENSARD A., MARTINEZ D., CARRONDO M.J.T. & ALVES P. (2005). Quantification of *Ehrlichia ruminantium* by real time PCR. *Vet. Microbiol.*, **107**, 273–278.
41. POSTIGO M., BELL-SAKYI L., PAXTON E. & SUMPTION K. (2002). Kinetics of experimental infection of sheep with *Ehrlichia ruminantium* cultivated in ticks and mammalian cell lines. *Exp. Appl. Acarol.*, **28**, 187–193.
42. SCHREUDER B.E.C. (1980). A simple technique for the collection of brain samples for the diagnosis of heartwater. *Trop. Anim. Health Prod.*, **12**, 25–29.
43. SEMU S.M., PETER T.F., MUKWEDEYA D., BARBET A.F., JONGEJAN F. & MAHAN S.M. (2001). Antibody responses to Map 1B and other *Cowdria ruminantium* antigens are down regulated in cattle challenged with tick-transmitted heartwater. *Clin. Diag. Immunol. Lab.*, **8**, 388–396.
44. SIMBI B.H., PETER T.F., BURRIDGE M.J. & MAHAN S.M. (2003). Comparing the detection of exposure to *Ehrlichia ruminantium* infection on a heartwater-endemic farm by the pCS20 polymerase chain reaction assay and an indirect MAP1B enzyme linked immunosorbant assay. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **70**, 231–235.
45. SMITH G.E., ANDERSON E.C., BURRIDGE M.J., PETER T.F. & MAHAN S.M. (1998). Growth of *Cowdria ruminantium* in tissue culture endothelial cell lines from wild African mammals. *J. Wildl. Dis.*, **34**, 297–304.
46. SWEYGARTH E., JOSEMAN A.I., VAN STRIJP M.F., LOPZE-ROBELLAR L., VAN KLEEF M. & ALLSOPP B.A. (2005). An attenuated *Ehrlichia ruminantium* (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine*, **23**, 1695–1702.
47. TOTTE P., MCKEEVER D., MARTINEZ D. & BENSARD D. (1997). Analysis of T-cell responses in cattle immunised against heartwater by vaccination with killed elementary bodies of *Cowdria ruminantium*. *Infect. Immun.*, **65**, 236–241.
48. VACHIERY N., LEFRANCOIS T., ESTEVES I., MOLIA S., SHEIKBOUDOU C., KANDASSAMY Y. & MARTINEZ D. (2006). Optimisation of the inactivated vaccine dose against heartwater and in vitro quantification of *Ehrlichia ruminantium* challenge material. *Vaccine*, **24**, 4747–4756.
49. VAN VLIET A.H.M., VAN DER ZEIJST B.A.M., CAMUS E., MAHAN S.M., MARTINEZ D. & JONGEJAN F. (1995). Use of a specific immunogenic region on the *Cowdria ruminantium* MAP1 protein in a serological assay. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 2405–2410.
50. WAGHELA S.D., RURANGIRWA F.R., MAHAN S.M., YUNKER C.E., CRAWFORD T.B., BARBET A.F., BURRIDGE M.J. & MCGUIRE T.C. (1991). A cloned DNA probe identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2571–2577.

51. YUNKER C.E., MAHAN S.M., WAGHELA S.D., MCGUIRE T.C., RURANGIRWA F.R., BARBET A.F. & WASSINK L.A. (1993). Detection of *Cowdria ruminantium* by means of a DNA probe, pCS20 in infected bont ticks, *Amblyomma hebraeum*, the major vector of heartwater in southern Africa. *Epidemiol. Infect.*, **110**, 95–104.

\*

\* \*

**NB** : Il existe un Laboratoire de référence de l'OIE pour la Cowdriose (se reporter à la liste de la partie 3 de ce *Manuel terrestre* ou consulter le site internet de l'OIE pour une liste actualisée : [www.oie.int](http://www.oie.int)).