

République Algérienne Démocratique et
Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la
Recherche Scientifique

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث
العلمي

École Nationale Supérieure Vétérinaire

المدرسة الوطنية لعاليا للبيطرة



THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences
En Sciences Vétérinaires

Étude épidémiologique de l'exposition à *Borrelia burdorferi* & *Anaplasma phagocytophilum* chez les chevaux de la région d'Alger

Présentée par : **Mr LAAMARI ABDELOUAHAB**

Soutenue le 24 Février 2021

Les membres du jury :

Présidente :	HAFSI Fella	Professeure	ENSV
Rapporteuse :	GHALMI Farida	Professeure	ENSV
Examineur :	BOUZID Riad	Professeur	DSV EL TARF
Examineur :	LAFRI Ismail	Maître de conférences A	ISV Blida

Année universitaire : 2020 /2021

DEDICACES

A mon pays.

A ma famille.

A mes collègues et amis F. GHALMI, N. AZZAG, S. TENNAH, F. HAFSI, S.Y. DERDOUR, R.
BOUABDALLAH pour leur amitié profonde et sincère.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mon respect à :

- Madame le Professeur F. GHALMI pour avoir accepté d'encadrer cette thèse, pour sa rigueur, son aide, sa disponibilité et ses qualités humaines ô combien rares. Puisse-t-elle trouver toute notre gratitude.

- Madame le Professeur F. HAFSI pour avoir accepté de présider le jury. Qu'elle soit assurée de notre vive reconnaissance et gratitude.

- Monsieur le Professeur R. BOUZID pour avoir accepté de faire partie de notre jury. Qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.

- Au Docteur I. LAFRI, pour avoir accepté de faire partie de notre jury. Qu'il soit assuré de notre reconnaissance

- Madame le Professeur N. AZZAG qui s'est tant impliquée dans ce travail ; pour sa générosité, son aide, ses compétences, sa rectitude et sa minutie. Qu'elle soit éternellement remerciée.

Résumé

Les chevaux (*Equus caballus*) sont sensibles aux maladies transmises par les tiques. Deux d'entre elles, la borréliose de Lyme due à *Borrelia burgdorferi* et l'anaplasmose granulocytaire due à *Anaplasma phagocytophilum* ont été étudiées chez des chevaux algériens. Les maladies ont été moins étudiées chez les chevaux et les résultats concernant l'Algérie n'ont pas été publiés. Des échantillons de sang ont été prélevés sur 128 chevaux. Des anticorps IgG dirigés contre *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* ont été détectés par un test d'immunofluorescence indirecte (IFAT) et ELISA. Les effets potentiels de l'âge, du sexe, de la race et de l'état de santé sur la séropositivité ont également été évalués. En utilisant l'IFAT, 28 (21,8%) et 25 (19,5%) animaux étaient respectivement positifs pour *B. burgdorferi* et *A. phagocytophilum*. En utilisant ELISA, 19 (14,8%) et 33 (25,9%) animaux étaient respectivement positifs pour ces deux bactéries.

L'étude montre que les chevaux en Algérie sont exposés ou co-exposés à des espèces bactériennes zoonotiques transmises par les tiques.

Mots clés : chevaux, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, séroprévalence, co-infection.

Abstract

Horses (*Equus caballus*) are susceptible to tick-borne diseases. Two of them, Lyme borreliosis due to *Borrelia burgdorferi* and granulocytic anaplasmosis due to *Anaplasma phagocytophilum* were investigated in Algerian horses. The diseases have been less extensively studied in horses and results pertinent to Algeria have not been published. Blood samples were obtained from 128 horses. IgG antibodies directed against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* were detected by an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and ELISA. The potential effects of age, gender, breed, and health status on seropositivity were also evaluated. Using IFAT, 28 (21.8%) and 25 (19.5%) animals were positive for *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum*, respectively. Using ELISA, 19 (14.8%) and 33 (25.9%) animals were positive for these bacteria.

The study shows that horses in Algeria are exposed or co-exposed to tick-transmitted zoonotic bacterial species.

Keywords: horses, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, seroprevalence, co-infection.

ملخص

لدى الخيول (*Equus caballus*) حساسية للأمراض المتنقلة عن طريق حشرة القراد نوعين من هذه الأمراض *la borrelíose de Lyme* بسبب *borrelia burgdorferi* و *anaplasma phagocytophilum* بسبب *anaplasmosse granulocytaire* . لم تمت دراستها عند الخيول الجزائرية من قبل ولا توجد دراسات سابقة كثيرة عند الخيول والنتائج الخاصة بالجزائر لم تنشر .

تم أخذ عينات من الدم لي 128 خيل باستعمال *immunofluorescence indirect (IFAT)* و *Elisa* العثور على الأجسام المضادة *borrelia Burgdorferi* و *anaplasma* و *phagocytophilum* . كما تم تقييم الآثار المحتملة لنقص المناعة. الحالة (*seropositive*) السن ، الجنس ، الفصيلة و الصحية .

النتائج :

-أظهرت النتائج أن: 28 (21.8%) من الحيوانات كانت إيجابية بالنسبة ل *IFAT* باستعمال *Aphagocytophilum* و 25 (19.5%) ل *B.burgdorferi* .

- باستعمال *ELISA* 19 (14.8%) من الحيوانات كانت إيجابية لهذه البكتريا بالنسبة لـ *A.burgdorferi* و 33 (25.9%) بالنسبة ل *A.phagocytophilum*

-أظهرت الدراسة أن الخيول في الجزائر معرضة للأمراض الحيوانية المصدر المتنقلة عن طريق القراد

-الكلمات المفتاحية: الخيول ، بويليام بورجدورفيرى ، أناب لازما البلعمة ، الانتشار المصلي ، العدوى المشتركة .

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
ETUDE BIBLIORAPHIQUE.....	4
I. ETUDE BIBLIORAPHIQUE DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE	4
1. Etude du genre Anaplasma.....	4
1.1. Historique	4
1.2. Taxonomie.....	5
1.3. Morphologie et structure d'Anaplasma Phagocytophilum.....	6
1.4. Propriétés antigéniques et immunogènes et variation des souches.....	7
1.5. Pathogénie	8
1.6. Hôtes et réservoirs	9
2. Etude clinique chez le cheval	12
2.1. Symptômes	12
2.2. Éléments anatomopathologiques et histologie.....	12
2.3. Signes biologiques.....	13
2.4. Traitement.....	13
2.5. Pronostic et prophylaxie	14
3. DIAGNOSTIC DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE.....	15
3.2. Diagnostic différentiel	15
3.3. Diagnostic de laboratoire.....	16
II. ETUDE BIBLIORAPHIQUE DE LA BORRELIOSE DE LYME EQUINE	18
1. Historique	18
2. Taxonomie.....	19
3. Caractères morphologiques	21
4. Pouvoir antigénique et immunogène	22
4.1. Les protéines de membrane externe Osp.....	22
4.2. Les protéines DbpA et DbpB (decorin-binding-protein).....	23
4.3. La protéine BBK32.....	23
4.4. VlsE.....	23

4.5. Flagelline et protéine P39	24
5. Pathogénie et mécanismes immunitaires	24
6. Epidémiologie de la borreliose équine	25
6.1. Prévalence et facteurs de risque.....	25
6.2. Hôtes et réservoirs	27
7. Aspect clinique de la borreliose.....	29
7.1. Signes cliniques	29
7.2. Lésions.....	35
7.3. Pronostic	35
8. DIANOSTIC DE LA BORRELIOSE DE LYME CHEZ LE CHEVAL	36
8.1. Tests directs	36
8.2. Tests indirects	37
9. Traitements	40
9.1. Antibiothérapie	40
9.2. Traitements associés	42
MATERIELS ET METHODES	44
1. Introduction	44
2. Sélection de l'échantillon de chevaux	44
3. Analyses de laboratoire	45
3.1. Collecte des sérums, acheminement et stockage	45
3.2. Analyses sérologiques	46
4. Analyses statistiques.....	51
RESULTATS ET DISCUSSION	54
I. Description de l'échantillon de chevaux	54
1. Races.....	54
2. Age des chevaux.....	54
3. Sexe	54
2. Analyse sérologique des sérums par IFAT et ELISA.....	55
2.1. Séroprévalence par IFAT et ELISA	55
2.1.1.cas de coinfections.....	56

2.1.2 Association entre seropositivité et signes cliniques	58
2.1.3. Association entre séropositivité âge, sexe et race.....	59
2.1.4. Comparaison des deux méthodes sérologiques ‘ test de concordance’	62
DISCUSSION.....	63
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73
ARTICLE PUBLIÉ	97

LISTE DES ABBREVIATIONS

AnkA: Ankyrine-reapeat-rich protein A

Apta: Anaplasma phagocytophilum toxin A

ARNm : acide ribonucléique messenger

Borrelia spp : espèces borrelia

Dbpa: decorin-binding-protein

EGH: Ehrlichiose granulocytaire hymaine

KDa : kilo dalton

LCR : Liquide céphalorachidien

OSP: outer surface protein

PBS : phosphate buffered saline

PCR: Réation en chaine par polymerase

TBF: thick borne fever

TMB: Le **3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine** ou TMB est un substrat chromogène utilisé en immunohistochimie et comme révélateur de la peroxydase dans la technique ELISA

VI_sE: Vmp like sequence Expression

Werstern-blot : Tranfert des proteines

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques du groupe d'étude en tenant compte du sexe, de l'âge et de la race des chevaux échantillonnés.....	55
Tableau 2. Séroprévalence de <i>Borrelia burgdorferi</i> et <i>Anaplasma phagocytophilum</i> par ELISA et IFAT.....	57
Tableau 3. Signes cliniques observés chez les chevaux prélevés.....	59
Tableau 4. Séroprévalence de <i>Borrelia burgdorferi</i> et <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en ce qui concerne la race, le sexe, l'âge et l'état de santé.....	60
Tableau 5. Analyse de l'accord entre les tests IFAT et ELISA.....	62
Tableau 6. Séroprévalence d' <i>A. Phagocytophilum</i> dans le monde.....	64
Tableau 7. Séroprévalence de <i>Borrelia burgdorferi</i> dans le monde.....	66

Liste des figures

Figure 1 : Phylogénie des Anaplasmataceae basée sur l'ARNr 16S. (Figure adaptée de Inokuma et al. 2001).....	5
Figure 2 : Cycle de transmission d' <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	10
Figure 3 : Arbre phylogénétique de <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> (Mircean, 2012).....	20
Figure 4 : Structure et morphologie de <i>Borrelia Burgdorferi</i> (Rosa et al., 2005).....	21
Figure 5 : cycle de transmission de <i>Borrelia burgdorferi</i> (adaptée et modifiée de Little et al., 2010)	28
Figure 6 : Pododermatite probablement associée à une forme cutanée de maladie de Lyme (histologie, sérologie et réponse au traitement compatibles avec une infection borrélienne).....	30
Figure 7 : Distension du recessus proximal de la gaine digitale sur l'antérieur droit - Jument de huit ans	31
Figure 8 : Radiographie vue latéro-médiale du carpe droit, montrant les ostéophytes Ponette âgée de douze ans	32
Figure 9 : Jument présentant un blépharospasme bilatéral aigu, une photophobie et un épiphora.....	33
Figure 10: Tubes secs.....	45
Figure11 : Tubes eppendorfs remplis de sérums de chevaux identifiés par un numéro.....	45
Figure 12a: Phosphate Buffered Saline (PBS).....	46
Figure 12b : Micropipettes.....	47
Figure 13 : Plaques de 12 puits MegaScreen Fluoanaplasma ph. (MegaCor Diagnostik, Autriche)	48
Figure 14 : Vortexer les sérums après décongélation	48
Figure 15 : Étapes de la technique ELISA	51

INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

Les infections dont l'agent est transmis par un vecteur arthropode sont multiples et d'une très grande hétérogénéité. Elles concernent des parasites, des bactéries et des virus ; les cycles de transmission sont complexes et impliquent des hôtes qui peuvent être les humains, les animaux, ou les deux. La transmission vectorielle intègre non seulement des facteurs liés aux vecteurs, aux hôtes et aux agents pathogènes, mais également, des composantes environnementales, climatiques et socio-économiques. Les arthropodes hématophages impliqués dans la transmission ont des biologies et des interactions avec les hôtes et l'environnement qui varient donc d'un arthropode, d'une région et d'une année à l'autre.

Aujourd'hui, on craint que le changement climatique, notamment la prolongation des saisons, le réchauffement de la température et la modification de la configuration des précipitations, n'entraîne des conditions propices à l'établissement et à la prolifération de maladies à transmissions vectorielles. Un grand nombre de ces maladies sont aujourd'hui qualifiées d'émergentes ou ré-émergentes. En effet, leur apparition dans des zones jusque-là indemnes et leur impact sur les santés animale et humaine les placent au cœur de l'actualité médicale vétérinaire.

De nombreuses maladies potentiellement émergentes et de grande importance médicale sont observées chez les équidés. Les agents de ces maladies sont transmis par les arthropodes, en particulier les tiques et les puces. Ces arthropodes se sont révélés être impliqués dans la transmission de nombreux agents pathogènes. On citera principalement les bactéries des genres *Anaplasma*, *Borrelia*, *Ehrlichia* et *Rickettsia*. Le diagnostic des affections induites par ces bactéries n'est pas aisé car les tableaux cliniques ne sont pas spécifiques. Il repose sur la confrontation des éléments épidémiologiques avec les signes cliniques. L'établissement d'un diagnostic de certitude fait appel au laboratoire par la réalisation de méthodes de diagnostic direct et indirect.

La situation de ces infections vectorielles et la connaissance de leur potentiel épidémique en Algérie est peu connue. Toutefois certaines études ont montré le portage par certains vecteurs arthropodes, notamment les puces, d'agents bactériens (*Bartonella spp.* et *Rickettsia spp.*) potentiellement pathogènes pour les carnivores domestiques (Azzag *et al.*, 2012).

Enfin, dans ce contexte écologique et épidémiologique très évolutif, le clinicien et l'infectiologue, qui sont en premières lignes face à ces maladies, ont bien sûr un rôle majeur dans ladémarche diagnostique et de prise en charge, ce qui souligne l'intérêt

de l'actualisation rapide des situations épidémiologiques chez les hôtes réservoirs et accidentels. Ainsi, de multiples pistes de recherche dans ce domaine s'offrent donc à nous en Algérie.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés en particulier à l'estimation de la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* et *borrelia burgdorferi sensu lato* chez les chevaux. L'objectif de cette étude a été aussi complété par la comparaison de la spécificité et la sensibilité des tests ELISA et IFAT dans l'évaluation de la séroprévalence à *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi*.

REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE

ETUDE BIBLIORAPHIQUE

I. ETUDE BIBLIORAPHIQUE DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE

1. Etude du genre *Anaplasma*

1.1. Historique

En 1932, des chercheurs étudiant le Louping-ill des ovins, observent chez ces animaux des signes cliniques qui semblent être survenus suite à des morsures de tiques. Cette maladie fut dénommée alors « fièvre à tiques » ou « tick-born fever » ou TBF. En 1940, l'agent étiologique de la TBF est alors identifié puis baptisé *Rickettsia phagocytophila* en raison de son tropisme pour les granulocytes ou macrophages. Ce même agent est à nouveau associé à une TBF chez des bovins, dont le premier cas fut décrit en 1950. En raison de sa morphologie similaire à celle de *Cytoecetes microti*, l'organisme est renommé *Cytoecetes phagocytophila*.

En 1945, *Cytoecetes phagocytophila* est nommée *Ehrlichia phagocytophila* après établissement du genre *Ehrlichia*. En 1969, Gribble décrit une infection des équidés, observée en Californie due à *Ehrlichia equi*. Comme les morulas sont mises en évidence dans les granulocytes, la maladie est alors appelée « Ehrlichiose granulocytaire équine ». En 1982, le premier cas d'infection chez un chien par un agent semblable à *Ehrlichia equi* fut décrit aux Etats-Unis et à partir de cette date d'autres cas identiques ont été observés dans plusieurs autres pays. En 1994, les premiers cas d'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine furent observés au Minnesota et au Wisconsin. Les sérums des patients réagissent positivement avec *Ehrlichia phagocytophila* et/ou *Ehrlichia equi*. L'agent responsable étant inconnu, il est nommé alors agent de l'Ehrlichiose Granulocytaire Humaine ou HGE. L'analyse de la séquence de l'ARNr 16S révèle un pourcentage d'homologie de 99,9 % avec l'ARNr 16S de *Ehrlichia phagocytophila* et de 99,8 % avec l'ARNr 16S de *Ehrlichia equi*. Des tests de PCR, effectués sur 6 patients, permettent à Chen *et al.* (1994) d'identifier une nouvelle espèce du genre *Ehrlichia* responsable d'infections humaines.

1.2. Taxonomie

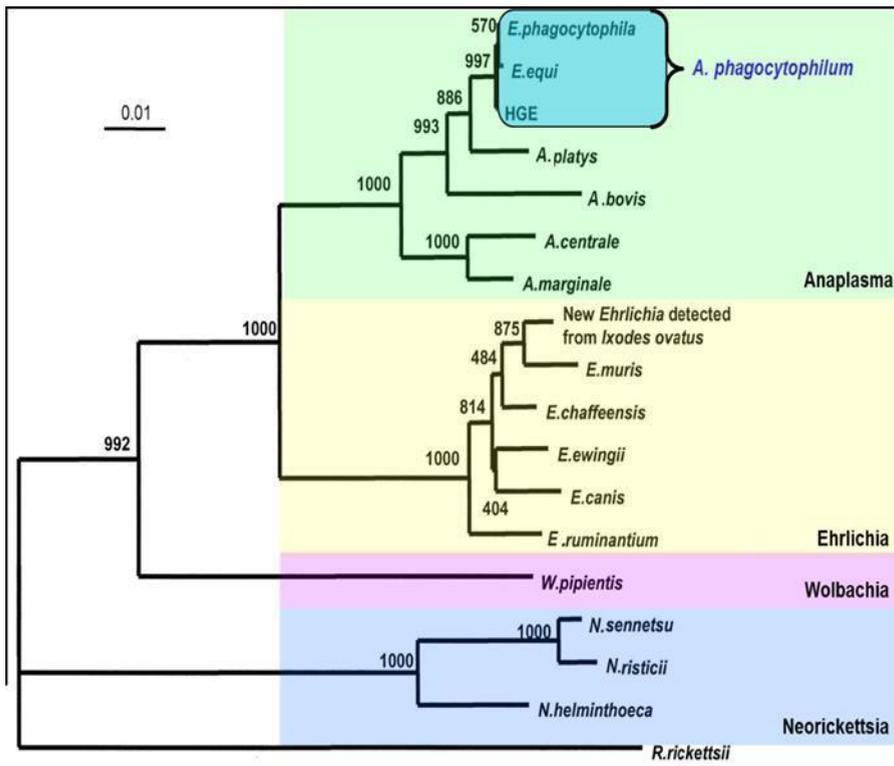


Figure 1 : Phylogénie des Anaplasmataceae basée sur l'ARNr 16S. (Figure adaptée de Inokuma et al., 2001)

La famille des *Anaplasmataceae*, incluse dans l'ordre des Rickettsiales, a été proposée par Philip en 1957. Par la suite, les genres *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Wolbachia* et *Neorickettsia* ont été inclus dans cette famille.

En 2001, Dumler *et al.* Procèdent à une réorganisation de l'ordre des *Rickettsiales* basée sur l'analyse des séquences des ARNr 16S, l'analyse des gènes des opérons *groESL* et l'analyse des gènes codant pour des protéines de surface. Aussi, ces auteurs rassemblent *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* et l'agent EGH

au sein d'une unique espèce qui, compte tenu des règles de priorité, est appelée *Anaplasma phagocytophilum*. Ces trois bactéries partagent également de nombreuses communautés antigéniques, infectent les cellules de la lignée myéloblastique et sont majoritairement transmises par des tiques du genre *Ixodes*. Néanmoins, il existe au sein de cette espèce de légères différences entre souches portant sur certaines séquences. Les souches d'*Anaplasma phagocytophilum* expriment peu de variation au niveau des séquences nucléotidiques des gènes ARNr16S et groESL (De La Fuente *et al.*, 2005 ; Morrissette *et al.*, 2009), mais aussi sur des caractères biologiques, notamment quant à leur spectre d'hôtes (Foley *et al.*, 2008), leur pouvoir pathogène et leur répartition géographique. C'est pourquoi on reconnaît des variants (ou biovars) au sein de cette espèce (variants équin, humain et bovin).

Le genre *Anaplasma* infecte les cellules matures ou immatures de la lignée hématopoïétique dans son ensemble : hématies, plaquettes, granulocytes ou monocytes et macrophages.

L'intérêt pour cette ehrlichiose ne se limite plus seulement à la médecine vétérinaire, mais aussi largement à la médecine humaine. Les ehrlichioses sont aujourd'hui considérées comme des maladies infectieuses émergentes (Walker et Dumler, 1997), l'anaplasmose étant la zoonose transmise par les tiques la plus répandue dans le monde (Dumler *et al.*, 2005).

1.3. Morphologie et structure d'*Anaplasma Phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum est une bactérie gram négative, non mobile, intra cellulaire obligatoire. Elle est entourée par deux membranes ce qui représente une caractéristique morphologique des espèces de la famille des *Anaplasmataceae*. Ces bactéries sont de petite taille de 0,3 à 1,3 μm , souvent de forme coccoïde ou ellipsoïde. Elles se situent dans des inclusions intra cytoplasmiques en forme de morulas (1,5 -2,5 μm de diamètre) retrouvées principalement au sein des granulocytes neutrophiles circulants. Leur présence dans ces inclusions est en partie facilitée par le fait qu'*Anaplasma phagocytophilum* est dépourvue de peptidoglycane et de lipopolysaccharide (Lin *et al.* 2003).

La microscopie électronique révèle la présence de deux formes morphologiques au sein des morulas : des corps élémentaires (0.5 μm de diamètre) et des corps réticulés (2 μm de diamètre). Ces bactéries peuvent être visualisées par la coloration May-Grünwald-Giemsa ou plus souvent avec la coloration rapide au Diff-Quik (Popov *et al.*, 1998). *Anaplasma phagocytophilum* se cultive *in vitro* dans les cellules IDE8 (cellules embryonnaires de *Ixodes scapularis*) ainsi que dans les cellules de la lignée HL-60 (lignée de promyélocytes leucémiques d'origine humaine) non différenciées ou différenciées en granulocytes neutrophiles.

La taille du génome d'*Anaplasma phagocytophilum* est de 1,47Mb et le contenu en Guanine + Cytosine % de son ADN varie entre 30 et 56%. Cette espèce ne peut synthétiser que quatre acides aminés : glycine, glutamine, glutamate et aspartate.

1.4. Propriétés antigéniques et immunogènes et variation des souches

Des réactions sérologiques croisées entre les souches d'*Anaplasma phagocytophilum* et entre *Anaplasma phagocytophilum* et d'autres espèces bactériennes telles que *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffensis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys* sont dues à des communautés antigéniques. En effet, ces bactéries ont en commun des protéines de surface spécifiques de genre ou de groupe dont le poids moléculaire varie entre 42 et 49 kDa (Dumler *et al.*, 1995 ; Kawahara *et al.*, 2006 ; Rikihisa, 2010). Ces protéines immunogènes sont codées par une famille multigénique. Parmi elles, la protéine de surface majeure (major surface protein) msp2 (p44), décrite chez *Anaplasma phagocytophilum*, est formée d'une région centrale hypervariable limitée par des séquences conservées.

Le gène codant pour la protéine de surface majeure décrite chez *Anaplasma phagocytophilum* est sujet à de fréquentes recombinaisons ce qui conduit donc à de nombreux ARNm msp2 et par conséquent à des variations antigéniques qui pourrait expliquer les infections persistantes des animaux. Ainsi, le génome d'*Anaplasma phagocytophilum* contiendrait plus d'une centaine de pseudo-gènes msp2 (P44) présents sur le chromosome (Dunning Hotopp *et al.*, 2006).

Des phénomènes de conversion combinatoire concernent les gènes P44, P44ESup1 (omp-1N), msp2 et ankA, certains d'entre eux codant des protéines de surface. Ceci entraîne une diversité phénotypique de la membrane qui pourrait expliquer en partie l'échappement de la bactérie à la réponse immunitaire de l'hôte et son adaptation à un nouvel environnement.

Par ailleurs, Ge et Rikihisa (2007) ont identifié de nouvelles protéines de surface Asp62 et Asp55, ces dernières sont susceptibles d'être utilisées comme cibles pour le sérodiagnostic des infections à *Anaplasma phagocytophilum*.

1.5. Pathogénie

La pathogénie de l'infection à *Anaplasma phagocytophilum* commence tout juste à être élucidée. La plupart des recherches concernant la pathogénie de l'infection ont été réalisées *in vitro* et principalement sur des cellules humaines ou de souris.

Différentes études ont montré qu'*Anaplasma phagocytophilum* avait un tropisme pour les granulocytes neutrophiles matures et plus rarement pour les fibroblastes et les phagocytes mononucléés (Lepidi *et al.*, 2000 ; Munderloh *et al.*, 2004). Les molécules d'adhésion d'*Anaplasma phagocytophilum* qui permettent la liaison aux récepteurs membranaires des neutrophiles sont en cours d'exploration et ne sont pas complètement identifiées. Par ailleurs, une étude de Park *et al.*, (2003) suggère que la protéine de surface msp2 (P44) faciliterait l'adhésion aux récepteurs PSGL-1 des granulocytes neutrophiles.

Pour survivre, *Anaplasma phagocytophilum* doit échapper à la réponse immunitaire et l'activité bactéricide des neutrophiles. Pour cela, elle inhibe la fusion phagosomes-lysosome et limite les attaques oxydatives (Gokce *et al.*, 1999 ; Choi *et al.*, 2003 ; Ohashi *et al.*, 2002). D'autre part, pour persister, la bactérie peut retarder la survenue de l'apoptose et par conséquent allonger la durée de vie des neutrophiles (Scaife *et al.*, 2003).

Les observations *in vitro* suggèrent que cette inhibition de l'apoptose est liée à l'attachement de la bactérie à des protéines membranaires des granulocytes et à la phase de pénétration (Yoshiie *et al.*, 2000). De plus, la pérennisation d'*Anaplasma phagocytophilum* est liée aux propriétés de sa protéine de virulence AptA (*A. phagocytophilum* toxin A) qui active la protéine kinase des mammifères Erk1/2. Cette activation agit sur la protéine de filament intermédiaire de type III, la vimentine, en provoquant sa réorganisation autour des inclusions bactériennes. Cette modification favorise la survie intracellulaire des bactéries (Sukumaran *et al.*, 2011).

Par ailleurs, *Anaplasma phagocytophilum* possède des gènes codant des systèmes de sécrétions de type IV qui permettent l'infection des cellules hôtes (Ohashi *et al.*, 2002). La protéine AnkA (ankyrin-repeat-rich protein A) semble être un effecteur sécrété dans le cytoplasme de la cellule cible, elle y activerait la voie de signalisation cellulaire AbI-1 et stimulerait l'activité de l'AbI-1kinase (Lin *et al.*, 2007).

D'autre part, le passage d'*Anaplasma phagocytophilum* du derme lieu d'inoculation par la tique au neutrophile est encore incompris. On suppose qu'au point d'inoculation, la bactérie se multiplierait

en premier dans les cellules endothéliales de la micro-vascularisation. Ces dernières assureraient, lors de la diapédèse, le transfert du pathogène vers les neutrophiles sans que ceux-ci quittent la lumière des capillaires. Ainsi, l'endothélium vasculaire jouerait le rôle de niche primaire qui permettrait l'intégration et la multiplication d'*Anaplasma phagocytophilum* ainsi que la persistance de l'infection.

L'affluence des granulocytes neutrophiles au site de morsure favorise leur contamination mais aussi la dissémination des bactéries à la faveur de leur migration. Pour se propager la bactérie stimule l'augmentation du taux d'interféron gamma (IFN- γ) et d'interleukines (Dumler *et al.*, 2000). Ainsi, la sécrétion d'interleukines telle que l'interleukine-8 va induire un appel massif de neutrophiles naïfs sur le site de l'infection ce qui par conséquent optimisera la voie de diffusion d'*Anaplasma phagocytophilum*.

Quant à l'IFN- γ il peut entraîner des effets néfastes sur les cellules hôtes qui se traduisent par des lésions tissulaires et une expression clinique plus importante lors d'anaplasmose (Fresno *et al.*, 1997 ; Walker et Dumler *et al.*, 1997 ; Dumler et Brouqui, 2004).

1.6. Hôtes et réservoirs

1.6.1. Espèces atteintes

Anaplasma phagocytophilum a de nombreux hôtes (Dumler *et al.*, 2005) dont :

- des hôtes sauvages : rongeurs, ruminants, ours et lamas,
- des hôtes domestiques : bovins, ovins, caprins, chevaux, chiens,
- ainsi que les hommes.

Les lapins, les oiseaux et les chats sauvages sont également impliqués dans l'épidémiologie de l'anaplasmose (Bjoersdorf *et al.* 1999, 2001 ; Daniels *et al.* 2002 ; Goethert et Telford 2003 ; Lappin *et al.* 2004). Les oiseaux, et plus particulièrement les oiseaux migrateurs, pourraient jouer un rôle de véhicule pour les tiques infectées (Alekseev *et al.*, 2001 ; Bjoersdorff *et al.*, 2001). Il convient de souligner que cette maladie est une zoonose classée « mineure » par l'InVS (Institut de Veille Sanitaire Français)

1.6.2. Réservoir et dissémination de la bactérie

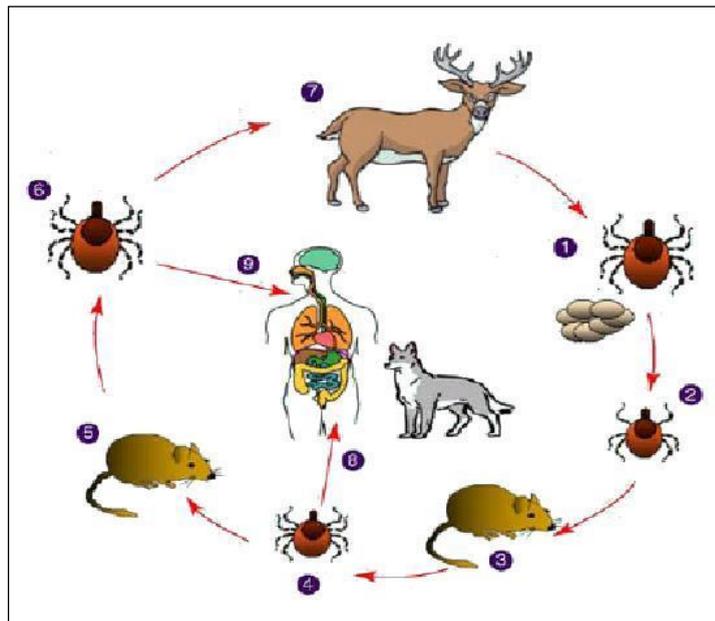


Figure 2 : Cycle de transmission d'*Anaplasma phagocytophilum*

(Nicholson *et al.*, 2010)

Il a été montré que plusieurs espèces dont le rat (Foley *et al.*, 2002), le mouton, le chevreuil, le bovin (Stuen *et al.* 2006), et le chien (Egenvall *et al.*, 2000), peuvent être infectées de façon chronique, et pourraient constituer des réservoirs pour la bactérie. Les moutons peuvent être porteurs jusqu'à 25 mois après la rémission des symptômes, et le sang reste infectieux (Rikihisa, 1991). Le cheval, qui peut également être infecté de manière persistante (Franzen *et al.*, 2005), et l'homme, seraient des « impasses » épidémiologiques. Par ailleurs, les petits mammifères sauvages sont des hôtes de prédilection pour les stades immatures de tiques (en particulier *Ixodes scapularis* aux Etats-Unis et *Ixodes ricinus* en Europe). Ils représentent donc des réservoirs naturels potentiels pour *Anaplasma phagocytophilum*. Ainsi, en Europe, le principal réservoir est le campagnol - *Clethrionomys glareolus* - (Brouqui 1999 ; Liz *et al.*, 2000), mais *Anaplasma phagocytophilum* a aussi été retrouvé chez d'autres petits rongeurs, *Apodemus flavicollis* et *Sorex araneus*, en Suisse (Liz *et al.*, 2000 ; Ogden *et al.*, 1998). Aux Etats-Unis, le principal réservoir sauvage est la souris à pattes blanches (*Peromyscus leucopus*) (Dumler et Bakken., 1998, Ogden *et al.*, 1998a). Les

ratons laveurs (*Procyon lotor*) et les écureuils gris sauvages (*Sciurus carolinensis*) (Telford *et al.* 1996, Levin *et al.* 2002) sont aussi porteurs de la bactérie. Aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis, les cervidés sont également des réservoirs sauvages de la bactérie (De La Fuente *et al.*, 2004; Liz *et al.*, 2002 ; Oporto *et al.*, 2003). Des PCR positives pour *Anaplasma phagocytophilum*, retrouvées par Magnarelli *et al.* (1999) sur des bovins, coïncident avec la détection d'ADN de la bactérie chez les cerfs (*Odocoileus virginianus*), en automne.

1.6.3. Transmission d'*Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum est transmise aux mammifères par des tiques dures du genre *Ixodes*, notamment *Ixodes scapularis* et *Ixodes pacificus* aux USA et *Ixodes ricinus* en Europe du nord (Bown *et al.*, 2006 ; Pusterla *et al.*, 1999). En Chine et en Europe du sud, de l'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* a été mis en évidence chez des tiques de l'espèce *Ixodes persulcatus*. La bactérie a aussi été retrouvée chez *Ixodes trianguliceps* au Royaume-Uni (Bown *et al.*, 2006).

Le nombre de bactéries présent chez ces arthropodes est lié à la durée d'attachement et celle du repas sanguin qui doit durer au minimum 24 heures. *Anaplasma phagocytophilum* se multiplie chez les tiques contaminées, notamment au moment de la mue larvaire et lors de l'engorgement de la tique au stade larvaire, nymphal et adulte. Si les tiques ne peuvent pas constituer un réservoir de germes - il n'existe pas de transmission trans - ovarienne mais seulement une transmission trans-stadiale (Ogden *et al.*, 2002 ; Telford *et al.*, 1996) - elles peuvent cependant jouer un rôle important d'amplification en permettant la multiplication des bactéries ingérées.

Chez les tiques infectées, *Anaplasma phagocytophilum* est localisé principalement dans les glandes salivaires si bien que la transmission de l'infection aux animaux vertébrés ne nécessite pas un attachement de longue durée et peut se réaliser en une trentaine d'heures.

Les espèces du genre *Ixodes* se nourrissent sur des hôtes différents selon leur stade de développement. La larve et la nymphe sont observées chez les rongeurs et les petits mammifères, alors que l'adulte est plus souvent retrouvé chez les grands mammifères. Cette biologie conditionne le cycle de transmission d'*Anaplasma phagocytophilum*.

2. Etude clinique chez le cheval

Chez le cheval, la maladie est hautement reproductible et caractérisée par une clinique, des variations biologiques et une pathologie similaire à ce qui est observé chez l'homme (Lepidi *et al.*, 2000).

2.1. Symptômes

L'étude de Franzén *et al.* (2005), menée sur 6 chevaux inoculés avec *Anaplasma phagocytophilum*, a montré des signes cliniques constants pour tous les chevaux : hyperthermie, abattement (objectivé par une diminution de l'attention et des réponses aux stimuli ainsi qu'un port de tête bas), une dysorexie voire anorexie, une tachycardie et une polypnée, de l'ataxie, et un œdème distal des membres. Ces symptômes ont débuté 6 à 9 jours après l'inoculation. La fièvre a duré 5 à 10 jours et certains autres signes ont persisté plus longtemps. D'autres études rapportent également un ictère et des pétéchies sur les muqueuses nasales et orales et sur la membrane nictitante (Pusterla *et al.*, 2002), ainsi qu'une possible orchite (Nolen- Walston *et al.*, 2004). Toutefois, l'infection peut également passer inaperçue ou se manifester de manière très peu spécifique. Une étude réalisée dans le sud de la France (Pradier, 2004 ; Leblond *et al.* 2005a) en témoigne, avec des chevaux ayant une sérologie positive sans avoir exprimé de symptômes. De même, aux Etats-Unis, Madigan et Gribble montrent, dès 1987, que 50 % de chevaux avec une clinique sans anomalie ont des anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum* dans certaines régions de Californie.

2.2. Éléments anatomopathologiques et histologie

Durant l'expérience de Franzén *et al.* (2005), un des chevaux est mort soudainement après 2 jours d'expression clinique semblable aux autres. Ils publient alors, en 2007, les résultats de l'autopsie qu'ils ont réalisée. Les lésions macroscopiques majeures identifiées étaient des hémorragies et des œdèmes des membres, de la paroi abdominale ventrale, du prépuce et des organes intra thoraciques et intra abdominaux, dont les reins.

Microscopiquement, des agrégations de cellules inflammatoires étaient présentes dans les travées hépatiques et certains hépatocytes étaient apoptotiques. Comme dans d'autres publications (Gribble, 1969 ; Lepidi *et al.*, 2000), des lésions de vascularite (angéite) ont été notées.

Par contre, ils ont retrouvé des lésions non encore décrites lors d'anaplasmose granulocytaire équine : une tuméfaction du glomérule et la présence de nombreux thrombi hyalins ou d'agrégats de globules rouges dans les artérioles et les capillaires rénaux. Ceci laisse à penser que le cheval a été victime d'une coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD) pouvant expliquer sa mort. Bien que cela ne soit pas communément observé, quelques publications rapportent des cas de coagulopathies ou de CIVD chez des hommes atteints d'anaplasmose (Bakken *et al.*, 1996 ; Behl *et al.*, 2000).

2.3. Signes biologiques

Les valeurs de la formule de numération sanguine ayant les variations les plus importantes sont le nombre de plaquettes et de lymphocytes, qui chutent. Durant la phase fébrile de la maladie, les chevaux développent une leucopénie et une neutropénie transitoires ainsi qu'une lymphopénie marquée (jusqu'à moins de 1 000 cellules/ μ L). Une thrombocytopénie importante, et de plus longue durée que la leucopénie, ainsi qu'une anémie modérée, sont également constatées (Franzén *et al.*, 2005 ; Nolen-Watson *et al.*, 2004). Une hyperbilirubinémie par élévation de la bilirubine non conjuguée ainsi qu'une augmentation de l'activité de la créatinine kinase sont parfois rapportées (Nolen-Watson *et al.*, 2004).

2.4. Traitement

Comme l'ont montré certaines études cliniques (Franzén *et al.*, 2005 ; Pusterla *et al.*, 2002), la guérison peut être spontanée. Cependant, il a été rapporté des possibilités de complications avec un risque de mort (Franzén *et al.*, 2005). Chez l'homme, il a été constaté que la sévérité des symptômes et la réussite du traitement sont fortement corrélées à la rapidité du diagnostic et à l'usage précoce des antibiotiques adaptés (Parol *et al.*, 1998), d'où l'intérêt de mettre rapidement en place le traitement adéquat. Chez l'homme, la doxycycline et la rifampicine sont les antibiotiques les plus actifs *in vitro* (Klein *et al.*, 1997 ; Maurin *et al.*, 2003). Dès 1987, Madigan et Gribble ont établi que le meilleur traitement pour le cheval est l'oxytétracycline à la dose de 7 mg/kg, une fois par jour, par voie intraveineuse stricte. Ce traitement doit être poursuivi pendant sept jours, soit avec des injections journalières, soit avec deux jours d'injections pour faire baisser

la fièvre puis des administrations par voie orale d'oxytétracycline à la dose de 20 mg/kg deux fois par jour. La guérison est en général rapide et la température est normalisée en 12-24h. Si tel n'est pas le cas, une erreur de diagnostic peut être envisagée. Il n'y a pas encore de résistance décrite pour cet antibiotique (Dumler et Brouqui, 2004).

Les tétracyclines sont des antibiotiques bactériostatiques à spectre large. Leur indice thérapeutique est généralement considéré comme supérieur à 20. Elles présentent donc une faible toxicité. Dans certaines conditions cependant, l'administration de tétracyclines peut provoquer des désordres digestifs chez le cheval. Par exemple, lorsque le traitement est associé à un stress, le cheval peut développer une entérocolite dysentérique mortelle (Baker et Leyland, 1973). Cette perturbation ferait suite à un déséquilibre de la flore caecale ou pourrait résulter d'une action irritante directe des tétracyclines lors d'administration orale ou parentérale, du fait de son élimination biliaire (White et Prior, 1982). Cette complication apparaît après au moins deux jours de traitement à une posologie trop élevée, mais aussi même à posologie normale. Alors qu'un risque existe, l'oxytétracycline est fréquemment utilisée sans provoquer d'effets indésirables chez le cheval la plupart du temps. Un traitement symptomatique pour maintenir l'hydratation et limiter les oedèmes peut être nécessaire. Il consiste notamment en une fluidothérapie, l'usage d'anti-oedémateux et la pose de bandes de repos aux quatre membres. Les chevaux fortement ataxiques doivent être placés dans un box adapté.

2.5. Pronostic et prophylaxie

Le pronostic est bon, avec de très rares cas rapportés de décès. En général, les chevaux infectés guérissent rapidement avec des soins appropriés et parfois même spontanément (Nolen- Walston *et al.*, 2004 ; Franzén *et al.*, 2005 ; Pusterla *et al.*, 2002).

Ce pronostic s'assombrit si des blessures consécutives à l'ataxie ou des complications infectieuses secondaires à l'immunodépression surviennent (Madigan et Pusterla, 2000).

Il n'existe pas de vaccin contre l'anaplasmose granulocytaire équine les mesures prophylactiques se limitent à éviter ou au moins à réduire l'exposition aux tiques. La lutte peut être à la fois chimique, écologique, biologique et immunologique. La lutte chimique consiste en l'application d'antiparasitaires actifs contre les tiques. Les molécules utilisables font partie de 5 grandes familles : organochlorés, organophosphorés, formamidines , pyréthriinoïdes et avermectines. Il convient de traiter tous les animaux et de désinfecter et désinsectiser les locaux, le matériel et les véhicules de transport (Martin, 1998).

3. DIAGNOSTIC DE L'ANAPLASMOSE GRANULOCYTAIRE EQUINE

Le diagnostic doit être fait rapidement, dès l'expression des symptômes, pour limiter le risque de voir s'installer des complications (Bakken *et al.*, 1996 ; Bakken et Dumler, 2000).

3.1. Diagnostic épidémio-clinique

L'anaplasmose a longtemps été considérée comme une maladie rare, mais l'amélioration des méthodes diagnostiques et de meilleures connaissances de la maladie ont permis d'augmenter considérablement son diagnostic dans diverses régions du globe.

La maladie étant vectorisée, son incidence clinique est liée à la saisonnalité des tiques. La période de plus grande activité des tiques correspond à des conditions climatiques douces et humides. En Algérie, on observe deux pics d'activité : au printemps et à l'automne. En Europe, la séroprévalence des anaplasmoses granulocytaires du bétail augmente progressivement lors des périodes de pâture, au printemps, et diminue avec le retour à la stabulation, au début de l'automne, ce qui est lié à l'exposition au vecteur *Ixodes scapularis* (Brouqui, 1999 ; Joncourt, 2003). L'anaplasmose granulocytaire équine doit être suspectée dans tout syndrome d'hyperthermie indéterminée.

Dans les régions endémiques, un simple abattement accompagné de fièvre doit inclure la maladie dans le diagnostic différentiel de ce syndrome (Amory et Pitel, 2007). De plus, l'infection passe souvent inaperçue et plusieurs études épidémiologiques rapportent des sérologies positives sur des chevaux n'ayant jamais exprimé de symptômes. Ainsi, dans certaines régions de Californie, 50 % de chevaux cliniquement normaux ont des anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum* (Madigan et Gribble, 1987), comme cela a déjà été souligné précédemment.

3.2. Diagnostic différentiel

Depuis quelques années, en France, un syndrome particulier rencontré chez les équidés a été dénommé syndrome « piro-like » par les vétérinaires équins. Ce syndrome englobe les maladies infectieuses qui sont associées à un tableau clinique de fièvre récurrente d'origine inconnue, sans symptômes caractéristiques. Il peut parfois être accompagné d'ictère, d'anémie et/ou d'œdèmes

périphériques ; Les principales maladies infectieuses entrant dans le diagnostic différentiel du syndrome avec abattement et hyperthermie sont :

- l'anaplasmose granulocytaire équine,
- les babésioses,
- la borréliose ou maladie de Lyme,
- la leptospirose,
- et l'anémie infectieuse équine (AIE).

En Algérie, l'anaplasmose est encore peu connue, le vétérinaire pense en général, d'abord, à la leptospirose ou aux babésioses lors d'abattement et d'hyperthermie (Rouina et al., 2012)

3.3. Diagnostic de laboratoire

3.3.1. Frottis sanguin

La mise en évidence de morulas par microscopie optique sur un frottis sanguin permet un diagnostic relativement précoce de l'anaplasmose et est ainsi un moyen de diagnostic facilement réalisable par le praticien (Raoult et Brouqui, 1998). Les premières morulas apparaissent dans les neutrophiles en moyenne 2 à 3 jours après le début des signes cliniques et persistent pendant environ 7 à 8 jours (Franzén *et al.*, 2005). Les bactéries sont sous la forme d'inclusions basophiles, bleu sombre à bleu gris pâle (coloration May-Grünwald-Giemsa), dans le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles et parfois éosinophiles. Ces inclusions sont rondes, parfois pléomorphiques (surtout en culture) et situées en général contre le noyau des cellules parasitées (Raoult et Brouqui 1998).

3.3.2. Culture et isolement

En général, la méthode de choix pour le diagnostic bactériologique est la mise en évidence de la bactérie en culture. Or, *Anaplasma phagocytophilum* ne pousse pas sur milieu gélosé. Néanmoins, l'isolement et/ou la culture de la bactérie sont possibles *in vitro* avec : des granulocytes ou leurs précurseurs (Woldehiwet et Scott, 1982), plusieurs lignées de cellules sanguines humaines - HL-

60, KG-1, THP-1 - et des lignées de cellules adhérentes des tiques IDE8, ISE6. Mais, encore aujourd'hui, la culture reste difficile et peu de laboratoires possèdent l'équipement pour la réaliser. De plus, il faut plusieurs jours, voire semaines, avant de pouvoir identifier la bactérie en culture avec la lignée HL-60 et une confirmation du diagnostic est nécessaire. Cette confirmation passe par une méthode de PCR et le séquençage de gènes spécifiques de la bactérie.

3.3.3. Méthodes sérologiques

Les analyses sérologiques sont fréquemment utilisées dans de nombreux laboratoires. L'immunofluorescence indirecte est la technique de référence bien qu'il existe des communautés antigéniques entre *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Anaplasma marginale* et *Anaplasma platys* ce qui complique l'interprétation des résultats. Ces derniers, doivent être analysés en fonction du contexte épidémiologique et clinique. Mais malgré ces inconvénients, cette technique est actuellement la plus utilisée en pratique par les laboratoires vétérinaires car elle permet souvent de confirmer ou infirmer une exposition initiale à *A. phagocytophilum* chez un cheval.

Il est noté que les immunoglobulines de classe G (IgG) sont décelées approximativement 8 jours après une première exposition à *Anaplasma phagocytophilum* ainsi que 2 à 5 jours après l'apparition des morulas et peuvent persister durant plusieurs mois.

D'autres méthodes sérologiques ont été développées telles que les techniques immuno-enzymatiques (ELISA). Ces techniques, sont basées sur l'utilisation comme antigène des protéines de surface obtenues par recombinaison. Ainsi, l'utilisation de la protéine p44 comme antigène permet de tester des sérums aussi bien chez le chien que chez le cheval (Magnarelli *et al.*, 2001). Un autre test utilisant la protéine majeure de surface recombinante Msp2/p44 est en cours d'évaluation et semble donner des résultats prometteurs pour rechercher les anticorps à *Anaplasma phagocytophilum* dans les sérums de chiens. De plus, l'utilisation de ce peptide synthétique a montré une sensibilité de 99,1% et une spécificité de 100% comparé à la technique immunofluorescence indirecte (Eberts *et al.*, 2011).

Cependant, il est important de noter qu'une sérologie positive n'est pas synonyme d'infection aiguë. Ravnik et ses collaborateurs (2011) ont montré la nécessité d'introduire d'autres stratégies de diagnostic en pratique vétérinaire, car la sérologie et les paramètres hématologiques à eux seuls

ne sont pas suffisants pour confirmer un cas d'anaplasmose granulocytaire équine et le diagnostic ne peut pas être considéré comme certain. En effet, les anticorps persistants longtemps, la sérologie peut être positive alors que le cheval a été contaminé plusieurs mois auparavant et que la bactérie n'est plus présente. Au contraire, un cheval peut avoir une sérologie négative alors qu'il est atteint d'anaplasmose, car il faut un certain temps pour qu'une réaction sérologique se mette en place. Ainsi, seule la technique PCR permettra alors un diagnostic de certitude.

3.3.4. Méthodes de Biologie moléculaire (PCR)

Différents tests de PCR (RT-PCR, RFLP-PCR, Nested-PCR) ont été développés pour la détection de l'ADN d'*Anaplasma phagocytophilum* à partir du sang total, du buffy coat, de la moelle osseuse ou encore à partir d'échantillons de rate. La spécificité des techniques de PCR varie en fonction des amorces utilisées ; les gènes les plus fréquemment recherchés sont : ARNr16S, ankA, msp2 (p44), msp4, rrs, epank1 et gro ESL (Lester *et al.*, 2005). Selon, Massung et ses collaborateurs (2003), la limite de détection des techniques de PCR varie de 0,25 à 25 cellules infectées. Par ailleurs, un autre type de PCR dite quantitative ou en temps réel a été mise au point pour le gène msp2 (Drazenovich *et al.*, 2006). La PCR devient positive à partir du 3-6e jour après l'inoculation et reste positive jusqu'au 18-21e jour. Dans l'étude de Franzén *et al.* (2005) la PCR s'est avérée positive, chez les 5 chevaux inoculés avec *Anaplasma phagocytophilum*, 2-3 jours avant l'apparition des symptômes et l'est restée 4 à 9 jours après la normalisation de la température rectale. La PCR serait donc plus précoce que la détection des inclusions neutrophiliques pour le diagnostic puisqu'elle est positive en moyenne 4 à 7 jours avant que les morulas ne soient visibles.

II. ETUDE BIBLIORAPHIQUE DE LA BORRELIOSE DE LYME EQUINE

1. Historique

La maladie de Lyme est une maladie d'expression polysystémique due à *Borrelia burgdorferi*, bactérie de l'ordre des spirochètales transmise par les tiques. Les borrélioses affectent de très nombreuses espèces de mammifères et d'oiseaux. Les carnivores domestiques représentent une des cibles de la borréliose de Lyme qui est par ailleurs une zoonose majeure.

L'histoire de la borréliose de Lyme commence en Europe à la fin du XIX^e siècle puis se poursuit aux États-Unis. C'est en Allemagne qu'est décrite en 1883 l'acrodermatite chronique atrophiante puis en 1910 en Suède, l'érythème chronique migrant, enfin en 1911 le lymphocytome cutané bénin. Même si ces deux dernières affections étaient associées à des piqûres de tiques, ces syndromes sont alors considérés comme trois maladies différentes. En 1922, Garin et Bujadoux décrivent le premier cas d'atteinte neurologique, la transmission par une tique y est clairement évoquée. C'est Sterne et ses collaborateurs qui ont rattachés les différents aspects dermatologiques, rhumatologiques, neurologiques et cardiologiques de la maladie en enquêtant sur une épidémie d'arthrite atteignant surtout des enfants dans la commune de Old Lyme dans l'Etat du Connecticut aux États-Unis au milieu des années 1970 (Sterne *et al.*, 1977).

En 1982, la preuve de l'étiologie bactérienne de la borréliose de Lyme est apportée. Un spirochète est mis en évidence dans l'intestin d'une tique *Ixodes dammini* par Burgdorfer (Burgdorfer *et al.*, 1982) et cultivé dans le milieu de Kelly modifié par Barbour (Stoenner *et al.*, 1982).

C'est au cours des années 80 que la grande majorité des études consacrées à la borréliose de Lyme chez les carnivores domestiques ont été réalisées et sont presque exclusivement d'origine américaine. L'identification a eu lieu en 1984 au Connecticut chez le chien puis chez le chat et le cheval en 1986, chez les petits ruminants en 1987 (Greene, 1991 ; Levy et Dreesen, 1992).

La première description clinique et la confirmation post mortem de la maladie de Lyme chez le cheval, ont été réalisées par Burgess *et al.*, en 1986 (Burgess *et al.*, 1986). Une étude sérologique, menée en Nouvelle Angleterre, fait état de la découverte d'anticorps dirigés contre *Borrelia burgdorferi* chez le cheval dès 1982 (Marcus *et al.*, 1985). Ce n'est qu'au cours de ces dernières années que des travaux décrivent un modèle expérimental équin (Chang *et al.*, 2000).

2. Taxonomie

Les spirochètes représentent phylogénétiquement un des 11 phylums des eubactéries (Woese, 1987). Les *Borrelia* appartiennent à la famille des *Spirochaetaceae*. Jusqu'à la découverte du spirochète responsable de la borréliose de Lyme, la nomenclature du genre *Borrelia* comprenait uniquement les agents des fièvres récurrentes.

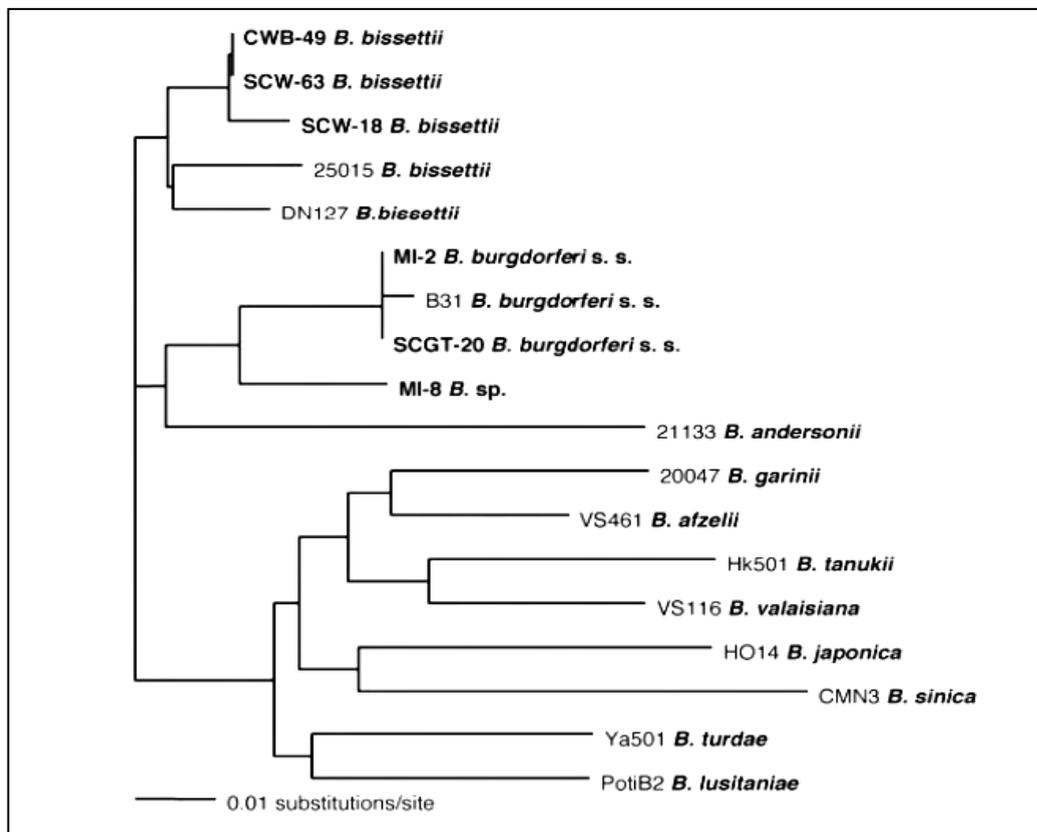


Figure 3 : Arbre phylogénétique de *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Mircean et al, 2012)

Actuellement les *Borrelia* associées à la borréliose de Lyme appartiennent au complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato*. En effet, au sein de ce complexe il n'y a pas d'association stricte vecteur-*Borrelia*. Des études de Postic et Baranton portant sur l'homologie d'ADN entre les souches ont montré l'existence de trois espèces au sein de *Borrelia burgdorferi* devenu *Borrelia burgdorferi sensu lato* : *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* et *Borrelia afzelii* (Postic et al., 1990 ; Baranton et al, 1992) ; ces trois espèces sont reconnues comme pathogène pour l'homme (Van Dam et al., 1993 ; Wang et al., 1999). Depuis, le nombre d'espèces, identifiées en utilisant différentes approches moléculaires, ne cesse de croître, ce qui révèle la grande diversité génétique des *Borrelia* associées à la maladie de Lyme (Wang et al., 1999). Actuellement, on distingue 12 géno-espèces faisant parties du complexe *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Aguero-Rosenfeld et al., 2005)

3. Caractères morphologiques

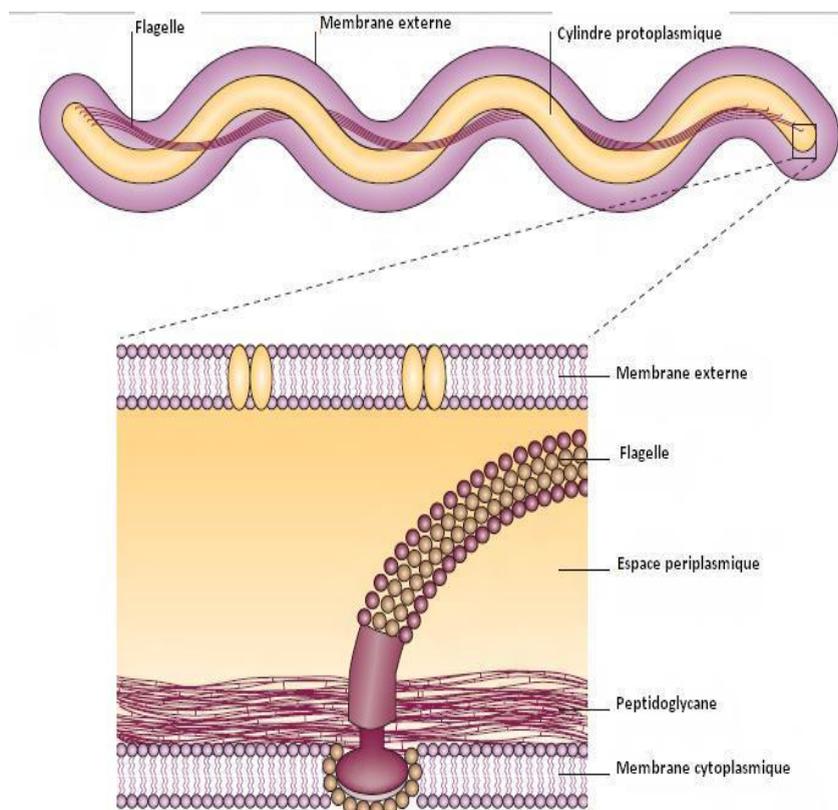


Figure 4 : Structure et morphologie de *Borrelia Burgdorferi* (Rosa *et al.*, 2005)

Borrelia burgdorferi se présente sous forme d'une cellule hélicoïdale dont la longueur est comprise entre 10 et 20 μm et la largeur entre 0,18 et 0,25 μm . Modérément colorable par le Giemsa, cette bactérie est peu mobile mais est capable de rotation et de flexion entre lame et lamelle. Les *Borrelia*, sont caractérisées par une ultra structure très particulière, unique au sein des Eubactéries. Le corps bactérien est limité par une couche amorphe, et une membrane externe multi-lamellaire constituée de peptidoglycane. Les flagelles (filaments ou fibrilles axiaux) sont au nombre de 7 à 11 et localisés entre l'enveloppe externe et le corps bactérien.

L'isolement de cette bactérie est possible dans le milieu de Kelly modifié et à une température optimale de 33 à 35°C. Actuellement, le milieu couramment utilisé est le milieu BSK II qui permet d'atteindre une concentration de 1 à 4 x 10⁸ bactéries /ml à partir de 1 à 2 spirochètes. La croissance est de type micro-aérophile (4% d'O₂) avec un temps de génération variant de 6 à 12 heures

(Barbour, 1984 ; Barbour et Hayes, 1986).

Borrelia burgdorferi est le premier spirochète dont le génome a été entièrement séquencé. D'une taille d'environ 1,5 Mb, il est constitué d'un chromosome linéaire de 910) Pb avec un G+C de 28.6% et de 21 plasmides (9 circulaires et 12 linéaires) d'un poids global de 610 Pb. Ces plasmides se comportent comme de véritables mini-chromosomes et leur grand nombre autorise une quantité importante de recombinaisons (Casjens *et al.*, 2000 ; Fraser *et al.*, 1997). L'étude des plasmides a montré qu'ils portaient l'essentiel des gènes codant pour des protéines de surface. Le codage des gènes de *Borrelia burgdorferi* n'est pas stable, il permet des recombinaisons et des réarrangements inter et intra plasmidiques. Certaines de ces recombinaisons entraînent des modifications au niveau des protéines de surface qui permettent à la bactérie d'échapper au système immunitaire de son hôte et de coloniser les tissus (Firking *et al.*, 1998 ; Schwan et Piesman, 2000).

4. Pouvoir antigénique et immunogène

La description des structures antigénique de *Borrelia burgdorferi* n'est pas complètement aboutie. Au total, environ 150 gènes de lipoprotéines ont été décrits. Parmi les plus étudiés, on distingue :

4.1. Les protéines de membrane externe Osp

Elles représentent une partie importante de la structure protéique de la bactérie et joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Elles sont appelées Osp pour "Outer Surface Protein" et sont codées par des gènes plasmidiques. Actuellement, six protéines de surface ont été identifiées et désignées sous l'appellation d'OspA, OspB, OspC, OspD, OspE et OspF (Firking *et al.*, 1998 ; Schwan et Piesman, 2002).

Les protéines OspA et OspB sont des protéines majeures et immunogènes lorsqu'elles sont inoculées à l'animal. Ces deux protéines ne sont exprimées que chez la tique et elles font place à OspC dès que la bactérie se trouve chez un mammifère (Figure 10).

En effet, dès que la migration vers les glandes salivaires commence, et lors de la transmission, la protéine OspC est exprimée au détriment des protéines OspA et OspB dont la production diminue.

Ainsi, les protéines OspA et OspB ont peu d'intérêt pour le diagnostic biologique chez l'hôte, contrairement à la protéine OspC qui entraîne la synthèse des tous premier anticorps de classe IgM (De Silva et Firking, 1997 ; Ohnishi *et al.*, 2001).

La protéine OspD quant à elle n'est exprimée que chez certaines souches du complexe *Borrelia burgdorferi*

sensu lato. Le rôle exact de cette protéine de surface n'est pas clairement défini (Marconi *et al.*, 1994).

Enfin, les protéines OspE et OspF interviennent dans la défense contre la réponse immunitaire de l'hôte infecté, elles se lient au facteur H du complément et empêche ainsi son activation (Lam *et al.*, 1994).

4.2. Les protéines DbpA et DbpB (decorin-binding-protein)

Il s'agit de deux protéines de membrane externe qui ont des propriétés d'adhésion à la décorine du tissu conjonctif des mammifères. Elles entraînent une réponse immunitaire intense en modèle expérimentale murin (Hubner *et al.*, 2001 ; Crother *et al.*, 2003).

4.3. La protéine BBK32

Elle est caractérisée par un poids moléculaire de 47 KDa et assure la liaison à la fibronectine. Le cycle de cette protéine est similaire à celui de l'OspC. En effet, cette protéine est détectée chez la bactérie durant le gorgement de la tique, mais son taux décroît après réplétion. Des anticorps contre BBK32 ont été observés chez l'homme et chez la souris. Cependant l'implication de cette protéine dans le cycle infectieux est remise en cause (Fikrig *et al.*, 1997 ; Akin *et al.*, 1999 ; Firkig *et al.*, 2000).

4.4. VlsE

VlsE (pour Vmp like sequence Expression) est une lipoprotéine de surface immunogène dont la structure varie en fonction de réarrangements complexes de la structure du gène correspondant. Ces variations de structure permettent l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. Cependant il existe au niveau de ce gène une zone conservée "région invariable" (IR6-peptide C6), exposée à la surface de la bactérie (Ohnishi *et al.*, 2001 ; Embers *et al.*, 2007). Ce peptide est utilisé comme outil spécifique dans le diagnostic sérologique de la maladie de Lyme chez l'homme et le chien (Liang et Philipp, 1999 ; Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

4.5. Flagelline et protéine P39

Le gène *fla* code pour une flagelline spécifique du genre *Borrelia*. Cette protéine immunogène entraîne une réponse sérologique pouvant présenter des réactions croisées avec les tréponèmes et les leptospires. En revanche, la protéine immunogène P39 est considérée comme une protéine associée à la membrane et est considérée comme spécifique en cas de réactivité en immuno-blot. Elle joue un rôle important dans l'adhésion aux tissus et aux cellules épithéliales (Simpson *et al.*, 1991).

5. Pathogénie et mécanismes immunitaires

Le mécanisme à travers lequel les *Borrelia* se propagent et se disséminent dans l'organisme de l'hôte mammifère est encore mal compris car la reproduction expérimentale est difficile à réaliser. La transmission des *Borrelia* chez l'hôte débute 24-48h après la morsure de la tique. Les bactéries se multiplient au lieu de l'inoculation, dans la peau et les muscles. Le tropisme des *Borrelia* pour la peau et les tissus riches en collagène s'explique par son besoin en N-acétyl glucosamine, monosaccharide nécessaire à la structure du collagène (Fraser *et al.*, 1997 ; Krupka et Straubinger, 2010). *Borrelia burgdorferi* utilise ses lipoprotéines et protéines de surface telle que l'OspC qui, une fois fixée aux protéines salivaires de la tique (Salp 15), inhibe la sécrétion d'interféron et l'action des macrophages chez l'hôte infecté (Schuijt *et al.*, 2008), lui permettant de disséminer dans tout l'organisme. De plus, pour migrer plus activement, elle stimule l'activation du plasminogène en plasmine, enzyme protéolytique qui permet de lyser la matrice extracellulaire des tissus (Klempner *et al.*, 1995).

D'autre part, *Borrelia burgdorferi* est capable de traverser l'endothélium des vaisseaux sanguins grâce à sa protéine de liaison BBK32 qui se fixe à la fibronectine et par conséquent permet à la bactérie de se propager par voie hématogène (Fikrig *et al.*, 2000 ; Revell *et al.*, 2002). La bactériémie chez l'hôte infecté reste néanmoins de courte durée et de faible intensité. La bactérie est retrouvée en quelques semaines dans les organes et tissus tels que le foie, la rate, le muscle et les articulations (Skotarczak, 2005). La lipoprotéine de membrane externe VlsE, à l'origine d'une réponse immunitaire protectrice, joue un rôle majeur dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte. La séquence d'acides aminés de cette protéine subit des variations dès les premiers jours qui suivent l'infection (Embers *et al.*, 2007). Il a été démontré que les clones de *Borrelia* qui ne sont pas en mesure de présenter ces variations antigéniques sont préférentiellement reconnus puis éliminés par le système immunitaire (Coutte *et al.*, 2009).

En revanche, la production d'anticorps neutralisant les souches présentant une hétérogénéité génétique se produit beaucoup plus lentement. Par ailleurs, *Borrelia* peut aussi probablement survivre à l'attaque du système immunitaire de l'hôte, par un mécanisme actif d'endocytose. Cette particularité lui confère la possibilité de persister dans une vacuole et à l'intérieur du cytoplasme de certaines cellules telles que les macrophages sans être éliminée (Gruntar *et al.*, 2001).

La production d'anticorps spécifiques dirigés contre *Borrelia burgdorferi* débute tardivement par comparaison aux autres infections bactériennes. Le taux d'IgM commence à augmenter 2 à 4 semaines post-infection et celui des IgG est détectable 4 à 6 semaines post-infection (Craft *et al.*, 1984). L'infection expérimentale des chiens de race Beagle a montré que le pic de production des IgG était observé 90 jours après exposition aux tiques (Straubinger *et al.*, 2000).

Les anticorps produits n'induisent pas une immunité protectrice chez l'homme ou le chien. Dans la phase tardive et chronique de la maladie, des infiltrats massifs de lymphocytes T peuvent être observés dans les membranes synoviales des chiens infectés. Ces réactions sont induites par des cytokines comme l'interleukine IL-8 ou encore les interleukines IL-10 et IL-4 (Straubinger *et al.*, 1997 ; Lazarus *et al.*, 2008).

Par conséquent, les lésions observées au cours de la borreliose de Lyme semblent plus la conséquence d'un dérèglement du système immunitaire que le résultat d'une action directe des *Borrelia* (Krupka et Straubinger, 2010).

6. Epidémiologie de la borreliose équine

6.1. Prévalence et facteurs de risque

L'épidémiologie de la maladie de Lyme est fondée sur des analyses sérologiques. Cette description ne concerne plus une population atteinte mais une population exposée.

La maladie est importante aux Etats-Unis : dans les régions endémiques, le taux de séroprévalence des juments est passé de 12 à 60% entre 1983 et 1986 (Browning *et al.*, 1993), alors qu'en Europe, à la même époque, aucun cas n'était recensé. La plupart des enquêtes sérologiques ont été réalisées aux Etats-Unis.

La première enquête sérologique date de 1982 en Nouvelle Angleterre, où 24% des chevaux présentent des anticorps dirigés contre *Borrelia burgdorferi* en région d'enzootie du Connecticut contre 2% en région non enzootique du Massachusetts (Marcus et Patterson, 1985).

Dans l'état du Wisconsin, Burgess et al. (Bures, 1988) ont mis en évidence des anticorps chez 118 chevaux sur 190, certains d'entre eux présentaient une boiterie et un gonflement des articulations.

Dans une étude sérologique faite sur 705 chevaux provenant des états de New York et du Connecticut, 92 (13%) étaient porteurs d'anticorps, 9 d'entre eux souffraient d'atteintes des membres ou des articulations, se traduisant par un ou plusieurs épisodes récurrents de raideur (Trap, 1990).

Cohen (Cohen, 1996) estime la séoprévalence aux Etats-Unis entre 1% en zone non endémique et 68% dans les zones endémiques.

Magnarelli estime en 2000, à près de 50% le taux de séoprévalence des chevaux, dans les régions du Nord-Est des Etats-Unis (Magnarelli et Idjo, 2000). En Angleterre, le premier cas n'est rapporté qu'en 1993 et une enquête sérologique montre un taux de séopositivité de 3 à 4% chez des chevaux asymptomatiques issus de plusieurs régions et un taux de séopositivité moyen de 52% pour des chevaux qui présentent des symptômes et issus de régions endémiques pour l'homme (Browing et al., 1993).

En Allemagne, une étude épidémiologique réalisée sur 1492 chevaux présentant des signes cliniques évoquant la borréliose, a montré une séoprévalence de 47,9% (Liebisch, 2001).

En France, une enquête réalisée en Bretagne sur 400 chevaux, a révélé la présence d'anticorps chez 36,5% des sujets (Doby et al., 1987). La plupart des chevaux sont asymptomatiques.

Au Laboratoire Central de Recherche, Trap, 1990 prélèvent 126 sérums de chevaux pris au hasard et sans signe clinique pouvant évoquer une borréliose de Lyme, 21 sont positifs (16,27%).

Dans un second lot de sérums provenant de 30 chevaux avec une suspicion clinique, 11 étaient positifs (36,7%), certains avec un taux de positivité élevé (Trap, 1990).

Une étude sérologique, réalisée en 2002 sur une population prise au hasard de 50 chevaux âgés de 1 à 3 ans, a indiqué que 12% des chevaux étaient séopositifs (Portier et Fortier, 2002).

L'essentiel des facteurs de risques est représenté par le mode de vie du cheval et tout ce qui s'y rapporte. L'habitat naturel des tiques étant essentiellement représenté par les zones de forêt, sous-

bois et broussailles, il est évident que les chevaux vivant au contact de ces lieux sont les plus exposés au risque de contamination.

L'enquête réalisée par Doby *et al.*, 1987, sur 400 chevaux montre que la fréquence de l'infection est, du moins en partie, liée aux activités en extérieur, en forêt principalement. Ainsi, 52% des chevaux de randonnée sont positifs contre 23,7% des étalons de haras.

Les chevaux vivants en pâture et les chevaux de randonnée sont, par conséquent, des catégories à risque. La présence d'animaux d'élevage (surtout les ovins) est un facteur favorisant. Pour ces animaux, les pâtures en lisière de forêt, avec un passage fréquent d'animaux sauvages, et la présence d'arbustes pouvant abriter de petits rongeurs ou des oiseaux réservoirs potentiels du germe sont considérés comme zone à risques.

Enfin, la tique *Ixodes ricinus* peut être vectrice d'autres maladies comme la babésiose, l'ehrlichiose, l'encéphalite à tique, qui peuvent être transmises en co-infection avec *Borrelia burgdorferi* et rendre difficile le diagnostic de maladie de Lyme. Ces cas sont de surcroît difficiles à traiter, d'autant que *Babesia* et *Ehrlichia* sont immunosuppressives (Baril *et al.*, 1989).

6.2. Hôtes et réservoirs

De nombreux mammifères sauvages, rongeurs essentiellement, constituent le réservoir de la bactérie. En effet, ils demeurent porteurs de *Borrelia burgdorferi* pendant plusieurs mois voire des années. Parmi ces micromammifères, on décrit le mulot, la musaraigne, le campagnol roux mais aussi le hérisson et l'écureuil. Ces derniers sont parasités principalement par les larves et les nymphes d'*Ixodes*. En revanche, les formes adultes s'alimentent sur des grands mammifères tels que les cervidés, le renard, la marte et le sanglier. Les oiseaux jouent également un rôle important, puisqu'ils assurent la propagation et la dissémination de la bactérie ou des tiques qu'ils portent (Anderson *et al.*, 1986 ; Olsen *et al.*, 1993 ; Olsen *et al.*, 1994).

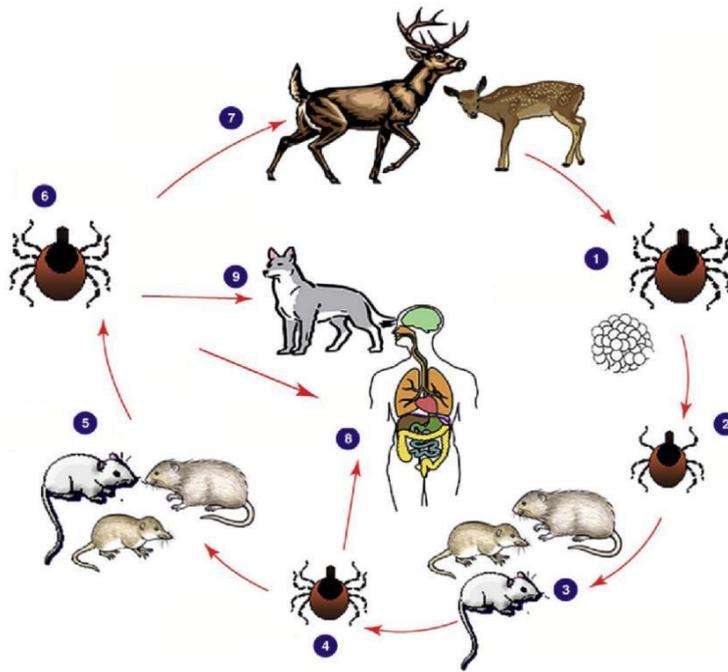


Figure 5 : cycle de transmission de *Borrelia burgdorferi*
(adaptée et modifiée de Little *et al.*, 2010)

Les animaux domestiques sont réceptifs à *Borrelia burgdorferi* mais ne sont que des hôtes accidentels. L'homme et le chien sont considérés comme des hôtes occasionnels ou des culs de sac épidémiologiques.

En effet, ces deux hôtes ne transmettent pas la maladie car seules les tiques adultes en fin de cycle se nourrissent de leur sang (Krupka et Straubinger, 2010 ; Littman, 2003). Cependant, lorsque la tique est porteuse de *Borrelia burgdorferi sensu lato*, le risque de transmission à l'homme serait de l'ordre de 7 à 10 %. Cette transmission est accrue s'il s'agit d'une nymphe (Little *et al.*, 2010 ; Diuk-Wasser *et al.*, 2006).

Les chevaux sont des hôtes accidentels qui peuvent déclarer la maladie (Humer et Gern, 2000).

La compétence de réservoir est le fruit d'une longue évolution, dans laquelle les organismes s'habituent petit à petit l'un à l'autre. L'adaptation physiologique qui en résulte permet la coexistence des deux organismes et la persistance dans le milieu.

Par ailleurs, les tiques infectées peuvent par elles-mêmes constituer un réservoir de la maladie, leur durée de vie étant suffisamment longue pour permettre un maintien dans le temps de la bactérie.

6.3. Mode de transmission

Bien qu'il existe des travaux rapportant la capacité d'autres arthropodes à jouer le rôle de vecteur de *Borrelia burgdorferi*, seule la famille des *Ixodidae* est considérée comme compétente. Après les 12 à 24 premières heures qui suivent la morsure infectante de la tique, les *Borrelia* vont se localiser au niveau de son intestin où elles se multiplient par division binaire. C'est au cours du second repas (stade suivant) que le nombre des borrelies augmente fortement. Elles migrent alors du tube digestif vers l'hémocoèle puis vers les glandes salivaires pour être inoculées à un autre hôte (Littman, 2003). Pendant ce temps, les spirochètes subissent un processus complexe de restructuration de leurs protéines externes de surface qui leur permettra de survivre chez l'hôte immunocompétent mammifère, ou aviaire.

7. Aspect clinique de la borréliose

7.1. Signes cliniques

La maladie clinique a été décrite chez diverses espèces animales de rente ou de compagnie : les chevaux, les chiens et les bovins surtout, mais aussi les ovins et les chats. A la différence de ce qui se passe chez l'homme, on ne retrouve pas la progression en trois phases de la maladie (Phase précoce localisée, phase précoce disséminée et phase tardive).

Chez le cheval, de nombreux signes cliniques ont été attribués à la maladie de Lyme, tels qu'une fièvre légère, de l'abattement, une raideur généralisée, des boiteries intermittentes localisées sur un ou plusieurs membres, des distensions synoviales, des troubles du comportement, une fonte musculaire ou encore de l'hyperesthésie (Magnarelli 2000). (figure 6,7, 8 et 9)



Figure 6 : Pododermatite probablement associée à une forme cutanée de maladie de Lyme (histologie, sérologie et réponse au traitement compatibles avec une infection borrélienne) (Dupuis-Tricaud et Depecker, 2018)



Figure 7 : Distension du récessus proximal de la gaine digitale sur l'antérieur droit - Jument de huit ans- (Habicht et *al.*, 1987)



Figure 8 : Radiographie vue latéro-médiale du carpe droit, montrant les ostéophytes. Ponette âgée de douze ans (Burgess et *al.*, 1986b).



Figure 9 : Jument présentant un blépharospasme bilatéral aigu, une photophobie et un épiphora (Hahn *et al.*, 1996)

Les études rétrospectives ayant mis en relation les chevaux séropositifs et la présence de ces signes cliniques n'ont pas démontré de corrélation significative (Egenvall 2001, Divers 2016). En revanche, il existe peu de doute sur le fait que chez la plupart des chevaux infectés, la maladie reste le plus souvent asymptomatique ou sans signe clinique évocateur (Bartol 2013, Divers 2016).

Expérimentalement, l'infection de poneys par *B. burgdorferi* a entraîné une réaction cutanée et musculaire au site de morsure de la tique, ou encore une atteinte des nerfs périphériques et perisynoviaux. Aucun signe d'atteinte générale n'a été mis en évidence. Histologiquement, les lésions étaient caractérisées par des agrégats lymphohistiocytaires périvasculaires et peri-nerveux dans le derme superficiel et profond. La bactérie était retrouvée par PCR jusqu'à 9 mois après l'infection dans la peau et les fascias en périphérie du site de morsure, et dans les membranes synoviales (Chang 2000). La prédilection anatomique des infections persistantes dans les fascias musculaires et les membranes synoviales pourrait ainsi expliquer les raideurs, boiteries multiples, ou encore l'hyperesthésie rencontrée chez de nombreux chevaux naturellement infectés et suspects de maladie de Lyme. Ces différents symptômes nécessitent toutefois des investigations expérimentales et épidémiologiques supplémentaires afin d'en confirmer l'étiologie.

Les affections décrites dans la littérature et attribuées aux infections naturelles à *Borrelia burgdorferi* sont une uvéite, une neuroborréliose, ou une atteinte cutanée de type « pseudolymphome » (James 2010, Imai 2011, Priest 2012, Sears 2012, Divers 2016).

L'érythème *migrans* caractéristique observé chez les humains lors d'infection aigüe n'est pas décrit chez les chevaux, ce qui rend le diagnostic précoce difficile. Une atteinte cutanée caractérisée par de multiples papules en regard du site de morsure de la tique a toutefois été rapportée, similaire au « lymphocytome borrélien » décrit en médecine humaine dans le stade secondaire (Sears 2012).

Les formes cutanées locales sont probablement sous-diagnostiquées chez le cheval. Les cas de neuroborréliose font état d'une raideur de l'encolure d'apparition aigüe ou subaigüe, d'une amyotrophie cervicale, glutéale et de la ligne du dos, d'une hyperesthésie, d'une ataxie spinale, ou de façon moins fréquente d'une atteinte nerveuse périphérique avec une diminution du tonus anal et de la queue.

Une atteinte des nerfs crâniens avec de la dysphagie a également été décrite (Johnstone 2016). Enfin, plusieurs cas d'uvéite à *Borrelia burgdorferi* ont été rapportés, soit isolés, ou de façon plus fréquente associés à des troubles neurologiques (Hahn, 1996, Imai, 2011, Priest, 2012, Chang 2005, Johnstone 2016). Les cas d'uvéite et de neuroborréliose sont associés à un mauvais pronostic, lié en partie à la mise en place tardive du diagnostic et du traitement. La confirmation étiologique de ces cas a reposé sur la mise en évidence directe (PCR) ou indirecte (sérologie) du

pathogène dans le vitré, la peau, ou le LCR, dans certains cas associés à la présence de lésions histocytologiques caractéristiques. La fièvre est absente dans la plupart des cas confirmés de maladie de Lyme, quelle que soit la symptomatologie associée (Divers 2016).

7.2. Lésions

D'une façon générale, les tissus infectés par *Borrelia burgdorferi*, que ce soit la peau, les membranes synoviales, les nerfs, les méninges ou les vaisseaux sanguins, présentent une infiltration de cellules mononuclées.

Les lésions articulaires sont constituées d'un épaissement, et d'une inflammation lymphocytaire des membranes synoviales associées à une prolifération des villosités synoviales (Buresse *et al.*, 1986).

Ces lésions d'arthrite sérofibrineuse et de synovite sont identiques à celle décrites chez l'homme atteint des formes articulaires de la maladie de Lyme (Burgess *et al.*, 1988). L'érosion des surfaces articulaires et la prolifération d'ostéophytes sont similaires à celles observées lors d'arthrite rhumatoïde (Fivaz *et al.*, 1990).

L'autopsie de la ponette examinée par Burgess, précédemment évoquée, a révélé, en plus des lésions articulaires, une inflammation chronique du corps ciliaire et de la choroïde, des plages d'atrophie et de décollement en périphérie de la portion ventrale de la rétine, une glomérulonéphrite membranoproliférative diffuse modérée, une gastrite lymphoplasmocytaire avec fibrose, une salpingite et une endométrite diffuse sévère (Burgess *et al.*, 1986).

À l'examen post-mortem de la jument présentant d'importants signes neurologiques, des nodules dans la dure-mère (pachyméninge) sont notés (Hahn et Mayhew, 1996). Une néphrite subaiguë et des foyers de fibrose pulmonaire ont été mis en évidence lors de l'autopsie d'un autre équidé infecté par *Borrelia burgdorferi* (Fivaz *et al.*, 1990). Par ailleurs, des petits foyers hémorragiques sur l'endocarde, de nombreux foyers de prolifération cellulaire dans le myocarde, une congestion diffuse du foie avec dégénérescence des hépatocytes et des follicules spléniques actifs, ont été relevés (Burgess *et al.*, 1988).

7.3. Pronostic

La maladie de Lyme chez le cheval n'est pas connue comme étant une cause de mortalité. Cependant, la gravité des manifestations cliniques et l'impotence qu'elle provoque, peuvent conduire à envisager l'euthanasie du cheval. Le pronostic de survie dépend de l'organe concerné, de la durée et de la sévérité de l'infection, et de la rapidité de mise en place d'un traitement.

Le pronostic sportif est souvent défavorable, en particulier dans les formes articulaires, les plus nombreuses, du fait de l'altération de la locomotion associée aux arthrites laissant des séquelles irréversibles.

8. DIANOSTIC DE LA BORRELIOSE DE LYME CHEZ LE CHEVAL

Différentes techniques de laboratoire ont été développées pour le diagnostic spécifique. Il existe des tests directs, dont le principe est de mettre en évidence la bactérie elle-même ou certains de ses composants (acides nucléiques ou protéines), et des tests indirects, basés sur la détection des anticorps anti-*Borrelia*. Ces tests sont parfois réalisés dans le cadre de bilans de fièvres isolées dits « piro-like », qui concernent également d'autres agents pathogènes, essentiellement : *Babesia caballi* et *Theileria equi*, *Anaplasma phagocytophilum*, et de façon plus anecdotique *Leptospira interrogans*. A noter qu'une co-infection des tiques par *Borrelia* et *Anaplasma phagocytophilum* est fréquente dans les zones endémiques (Egenvall 2001).

8.1. Tests directs

La culture de la bactérie étant très difficile (non réalisée comme test diagnostic de routine), la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est la technique directe la plus utilisée : elle permet d'amplifier spécifiquement l'ADN de la bactérie. De plus, la PCR en temps réel permet de suivre l'amplification grâce à l'émission de fluorescence et d'avoir ainsi une estimation de la charge bactérienne. La sensibilité et la spécificité de la PCR n'est actuellement pas connue et la technique peut varier d'un laboratoire à l'autre, en fonction des amorces utilisées (Divers 2006).

Chez le cheval, la PCR est très rarement positive dans le sang. Par contre, elle peut être intéressante sur certains tissus, tels que le liquide ou la membrane synoviale, la peau et les noeuds lymphatiques loco-régionaux du site de morsure, les muscles, les liquides oculaires (notamment le vitré), le liquide céphalorachidien et les tissus nerveux (Chang 2000a, Divers 2006, Passamonti 2015, Priest 2012).

Il est à noter qu'un résultat positif en PCR indique la présence d'ADN bactérien mais pas forcément la présence de bactéries vivantes. Néanmoins, en présence de signes cliniques évocateurs et après exclusion d'autres causes, une PCR positive est en faveur d'une infection (Divers 2006). Ce cas de figure reste cependant rare en pratique.

8.2. Tests indirects

Les tests sérologiques, basés sur la détection des anticorps anti-*Borrelia*, sont les plus couramment réalisés. Il en existe différents types, chacun présentant des avantages et des inconvénients. Dans tous les cas, un résultat positif indique que l'animal a été exposé à la bactérie mais pas forcément qu'il souffre de la maladie de Lyme (Bartol 2013).

Quelle que soit la méthode sérologique, il n'y a aujourd'hui pas de corrélation connue entre le titre en anticorps et le risque de développer la maladie.

Ainsi, dans les régions endémiques, le dépistage sérologique sur des chevaux sains n'est pas recommandé (Divers 2016). D'autre part, il reste délicat d'interpréter un résultat sérologique chroniquement positif. Plusieurs explications ont été avancées : une infection chronique, une réinfection (ou nouvelle exposition), ou une réponse immunitaire persistante, même en l'absence d'infection.

Sur des chevaux présentant des signes compatibles avec la maladie de Lyme, il faut garder à l'esprit que des faux négatifs sont également possibles, et qu'un résultat négatif ne permet donc pas d'exclure l'hypothèse de maladie de Lyme lors d'une infection récente (il faut minimum 3 semaines voire 5 à 6 semaines pour pouvoir détecter des anticorps) (Chang 2000a, Wagner 2011a), lors d'une réponse immunitaire insuffisante ou d'une réaction locale (par exemple lors de formes nerveuses ou oculaires).

8.2.1. Méthodes immuno-enzymatiques ELISA

La méthode ELISA est actuellement la plus utilisée pour réaliser le diagnostic de la maladie. Cette technique utilise soit un antigène soluble (*Borrelia* traitées par ultrasons), soit un antigène figuré (*Borrelia* inactivées par pénicilline et streptomycine). Cette technique, très reproductible, est plus sensible et plus spécifique que l'immunofluorescence indirecte. La méthode ELISA est adaptée à la réalisation de très grandes séries, elle est objective et la lecture des anticorps est automatisée.

Schématiquement, des extraits d'antigènes de *Borrelia* sont fixés au fond des puits. Le sérum à tester est mis au contact des antigènes. Après lavage, la liaison antigène-anticorps est mise en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps anti-IgG équins couplés à une enzyme. Une solution de révélation contenant le substrat pour l'enzyme est alors ajoutée : une coloration apparaît, dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps.

Les avantages de la technique ELISA sont multiples : grande sensibilité, procédure automatisée, résultats quantitatifs. Par contre, il est reconnu que l'ELISA manque de spécificité : des réactions croisées sont possibles, notamment avec des anticorps dirigés contre d'autres spirochètes. Un test de confirmation est donc conseillé lors de résultat positif : le Western Blot ou immunoblot (Divers 2016).

D'autre part, la détection des anticorps par l'ELISA peut être tardive : seulement 5 à 6 semaines après l'infection (Chang 2000a). Les taux d'anticorps augmentent ensuite jusque 3 à 4 mois après infection et restent détectables pendant plusieurs mois (12 voire 18 mois), même lors de la mise en place d'un traitement.

En effet, alors que dans le cadre d'une infection expérimentale, les auteurs ont observé qu'un traitement antibiotique entraînait une forte chute des anticorps (Chang 2005), le déclin reste très faible lors d'une infection naturelle, semblable à celui que l'on peut observer chez des animaux non traités (Divers et al., 2006).

8.2.2. Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte est une technique relativement similaire à l'ELISA, si ce n'est que la détection de la liaison antigène-anticorps est réalisée grâce à un anticorps anti-IgG équin couplé à un fluorophore. L'intensité lumineuse est proportionnelle à la quantité d'anticorps. Cette technique reste opérateur dépendant et est encore moins spécifique que l'ELISA (risque accru de faux positifs) (Dzierzeccka 2002).

Le principe de cette méthode consiste à rechercher les anticorps dans le sérum, dans le LCR et éventuellement dans le liquide synovial. L'antigène provient d'une souche de *borrelia burgdorferi* cultivée en milieu BSKII pendant 5 à 7 jours. En France, comme aux Etats Unis, la souche B31 est la plus utilisée (Monteil *et al.*, 1989). Les seuils de positivité varient de 1/64^{ème} à 1/256^{ème} selon les laboratoires. Les titres significatifs pour les IgG et les immunoglobulines totales dans le sérum et le liquide articulaire sont 1/256^{ème}, de 1/32^{ème} pour les IgM sériques, et de 1/4^{ème} pour le LCR quelque soit l'isotope (ASSOUS, 1993). On peut augmenter la spécificité du test IFI par une étape préalable d'absorption par un antigène voisin (*Treponema reiteri*) afin de diminuer les réactions fluorescentes non spécifiques. L'IFI est une technique de routine, peu coûteuse, très bien adaptée pour les petites séries. Son inconvénient majeur est lié à la subjectivité dans la lecture des lames, surtout pour celles des IgM qui sont très délicates. De plus, Dzierzeccka *et al* évoquent, après deux

études menées sur différents tests sérologiques chez le cheval, la possibilité de faux positifs en IFI (Dzierzecka et al., 2002). Cette technique a permis de nombreux diagnostics de maladie de Lyme chez le cheval.

Burgess *et al.*, ont mis en évidence par immunofluorescence indirecte, des anticorps anti-*B. burgdorferi* dans le liquide synovial et le sérum d'une ponette présentant des troubles articulaires (Burgess et al., 1986) et dans le LCR d'un cheval présentant des troubles nerveux évoquant une encéphalite (Burgess et Matisson, 1987).

8.2.3. Western-blot

Le principe du Western-blot est de soumettre un mélange protéique à une électrophorèse sur gel. On obtient ainsi des bandes de protéines séparées selon leur poids moléculaire, qui sont ensuite transférées sur une membrane. La lecture du nombre de bandes ayant réagi avec le sérum à tester ainsi que de leur intensité est réalisée manuellement ou grâce à un scanner. Ceci permet d'identifier simultanément plusieurs types d'anticorps dirigés contre les antigènes de *Borrelia* présents sur la membrane. Les blots ne donnent qu'une information qualitative (présence ou non d'anticorps anti-*Borrelia*) et sont assez lourds à mettre en oeuvre. Leur interprétation peut être subjective. Néanmoins, ils sont plus spécifiques que l'ELISA, c'est pourquoi on les utilise comme test de confirmation (Dzierzecka, 2002). D'autre part, ils pourraient également permettre de préciser si l'infection est récente ou chronique. En effet, plusieurs études chez l'homme, le chien et le cheval, ont montré que l'expression des antigènes de *Borrelia* était variable en fonction de son environnement (Wagner 2011a, 2012, 2013). Lorsque la bactérie passe de la tique à son nouvel hôte, elle exprime d'abord certaines protéines de surface, comme par exemple OspC (*Outer Surface Protein C*). Plus tard, d'autres protéines vont être exprimées, comme OspF, C6 ou p100. Ainsi, la cinétique des anticorps est également variable en fonction du type d'antigène reconnu. Par exemple, les anticorps anti-OspC seraient détectables relativement précocement (dès 3 semaines) mais ils disparaîtraient en quelques semaines (indétectables après 4 à 5 mois). Au contraire, les anticorps anti-p100, C6 ou OspF, seraient détectables plus tardivement (après 5 à 8 semaines) et persisteraient des mois voire des années (Wagner 2012).

8.2.4. Test d'orientation diagnostique SNAP test C6

Ce test réalisable au chevet du patient est commercialisé pour le diagnostic sérologique de la maladie de Lyme, chez le chien. Bien que validé uniquement chez le chien, il a été parfois utilisé chez le cheval et présenterait une bonne spécificité mais une sensibilité faible (63% lors d'une infection expérimentale de poney (Johnson 2008)). Un test de confirmation est conseillé lors de résultat positif (Bartol 2013), car des faux positifs sont néanmoins possibles (Wagner 2013).

8.2.5. Autres tests

Dans certains cas précis, d'autres examens de laboratoire peuvent être réalisés en complément, notamment des analyses cytologiques et histologiques. Lors de neuroborréliose, l'analyse cytologique du LCR peut révéler une pléocytose lymphocytaire ou neutrophilique et une élévation du taux de protéines, mais ce n'est pas systématique (Johnstone 2016). La détection des antigènes dans le LCR est rare. Certains auteurs ont proposé de mesurer le ratio du taux d'anticorps dans le LCR comparé à celui dans le sang, mais le résultat n'est pas toujours fiable et il ne doit pas être considéré comme le gold standard pour le diagnostic (Divers 2016). En définitive, l'histologie reste l'examen complémentaire le plus sensible et spécifique mais il ne peut être réalisé qu'en post mortem (Imai 2011, Johnstone 2016). Les lésions sont typiques et semblables à celles observées chez l'homme : infiltrations inflammatoires mixtes, multifocales, sans atypie cellulaire, leptoméningite, radiculite, névrite, périvasculite et sclérose vasculaire. Des colorations spéciales, une immunohistochimie ou de l'hybridation *in situ* peuvent être réalisées en complément mais leur sensibilité est faible. Lors d'uvéite, une cytologie des liquides oculaires peut s'avérer intéressante, en particulier du corps vitré. En effet, en plus des cellules inflammatoires, des bactéries spirochètes peuvent être observées. C'est ce qui a été rapporté sur deux cas d'uvéites, confirmés par PCR, pour lesquels les auteurs ont vu les bactéries dans le vitré et non dans l'humeur aqueuse (Priest 2012). Celles-ci étaient également visibles, mais de façon moins évidente, sur des coupes histologiques en coloration de Steiner modifiée sur un cas, mais pas sur l'autre. En complément d'un examen histologique classique, des marquages par immunohistochimie ou hybridation *in situ* sont possibles mais restent peu sensibles.

9. Traitements

9.1. Antibiothérapie

Aujourd'hui la seule possibilité réelle de traitement est l'antibiothérapie. Le protocole doit être mis en place le plus rapidement possible. Ce traitement peut être associé à un traitement anti-inflammatoire par anti-inflammatoires non stéroïdiens pour soulager les symptômes (Parker et White, 1992)

Pendant de longues années, la pénicilline procaine ou la benzathine pénicilline étaient très souvent utilisées en première intention à des doses de 30000 à 45000 UI par kilogramme et par jour en intramusculaire pendant trois semaines. La pénicilline est un antibiotique de choix chez le cheval car de nombreux germes y sont sensibles. Cet antibiotique fait partie de la classe des bêta-lactamines présentant un spectre étroit essentiellement Gram positif et anaérobie. La pénicilline présente aussi l'avantage d'être très bien tolérée. Elle est associée à la procaine qui est un anesthésique local ou à la benzathine utilisée pour stabiliser la pénicilline. La ceftriaxone était utilisée en cas de manifestation nerveuse de la maladie mais son coût élevé limite son utilisation (Site merial, 2020)

Puis des études ont été faites dans les années 2000 comparant l'effet thérapeutique des antibiotiques sur des lots de chevaux montrant la supériorité d'efficacité de l'oxytétracycline en intraveineuse et de la doxycycline par voie orale. La tétracycline est un antibiotique bactériostatique dont le spectre d'activité s'étend à de nombreuses bactéries gram positif et gram négatif, aérobies et anaérobies, aux mycoplasmes, aux chlamydiae, aux rickettsies et à certains protozoaires. Mais des résistances se sont développées chez certaines bactéries aérobies et anaérobies. La tétracycline est utilisée chez le cheval présentant de la fièvre, un œdème des membres inférieurs et une raideur générale à des doses de 6,6 mg/kg une fois par jour. La durée du traitement dépend de la réponse clinique, il dure généralement de 10 à 30 jours. Elle possède un effet anti-inflammatoire immédiat. Les tétracyclines sont des substances relativement bien tolérées, elles peuvent entraîner chez le cheval des diarrhées et une lésion tissulaire à l'endroit de l'injection (site CBIP-VET, 2020)

La doxycycline est utilisée chez les chevaux présentant une boiterie intermittente, une raideur, et une hyperesthésie. La doxycycline est un antibiotique de la famille des tétracyclines. Cet antibiotique est utilisé par voie orale car en intraveineuse même à faible dose elle provoque des anomalies cardiaques avec modification de l'électrocardiogramme et un collapsus. A forte dose elle peut entraîner la mort de l'animal. La posologie est de 5 à 10 mg/kg toutes les 12h pendant un mois. Le traitement antibiotique est d'autant plus efficace qu'il est instauré tôt avant que les dommages n'apparaissent. La tétracycline et la doxycycline peuvent être associées. Une application locale d'antibiotique au niveau de la morsure est recommandée à condition d'intervenir dans les premiers jours (Parker et White, 1992)

9.2. Traitements associés

Le traitement anti-inflammatoire associé à l'antibiotique permet d'améliorer le confort et le rétablissement de l'animal même s'il masque les signes cliniques. On utilise généralement la phénylbutazone, un anti-inflammatoire non stéroïdien appartenant au groupe des pyrazolés. Il est utilisé pour son action anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique. Il présente une activité inhibitrice au niveau des COX 1 et COX2. La posologie est de 2,2 à 8,8 mg/kg par jour (site CBIP-VET, 2020). Un protecteur de la flore intestinale et des compléments chondroprotecteurs peuvent être conseillés en traitement complémentaire. Le traitement de l'uvéite causé par *Borrelia burgdorferi* n'est pas différent des autres uvéites : association d'antibiotique et anti-inflammatoire par voie systémique associés à un corticostéroïde et de l'atropine en local.

Aujourd'hui aucun vaccin n'existe chez le cheval. Plusieurs études ont été faites, notamment sur un vaccin recombinant exprimant la protéine OspA de *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Mais l'existence de nombreuses souches rend l'approche vaccinale difficile en Europe (Site merial, 2020).

MATÉRIEL

&

MÉTHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Introduction

Tous les travaux de recherche présentés dans ce document ont été réalisés au sein de deux structures : le Laboratoire de Microbiologie-Immunologie de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA) et le Service de Bactériologie de l'École Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger.

Au départ de cette étude, rien n'était connu sur la situation de l'anaplasmosse granulocytaire équine et la borréliose de Lyme équine en Algérie. De même, nous ne disposons pas de données publiées sur la séroprévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi* chez les chevaux de la Garde Républicaine.

À partir de cette enquête, deux axes essentiels ont été poursuivis :

estimer la prévalence à *Borrelia burgdorferi* sensu lato et d'*Anaplasma phagocytophilum* par deux méthodes sérologiques : Immunofluorescence indirecte et ELISA ;

estimer le pourcentage de positivité en association avec les facteurs de risque suivants : âge, sexe, race et signes cliniques ;

effectuer une comparaison entre les deux méthodes d'analyses utilisées.

Nous envisagerons d'abord la description du matériel et des méthodes utilisés, puis nous exposerons les résultats de l'enquête et enfin nous les discuterons.

2. Sélection de l'échantillon de chevaux

Une étude transversale a été menée d'août 2015 à septembre 2016 sur 128 chevaux de la Garde Républicaine sis aux Pins Maritimes. Les chevaux ont été sélectionnés au hasard avec une répartition la plus homogène possible. Le facteur limitant a essentiellement été l'accord des propriétaires pour faire les analyses sérologiques de leur cheval. Dans la mesure du possible, tous les chevaux présents au moment de la visite ont été prélevés dans chaque box.

3. Analyses de laboratoire

3.1. Collecte des sérums, acheminement et stockage

Le sang a été collecté sur tube sec (figure 10). Le sérum récupéré après centrifugation dans les 24h et conservé dans des Eppendorfs.



Figure 10 : Tubes secs

Les Eppendorfs ont ensuite été conservés au froid à -12°C , après avoir été identifiés par un numéro. (Figure 11)

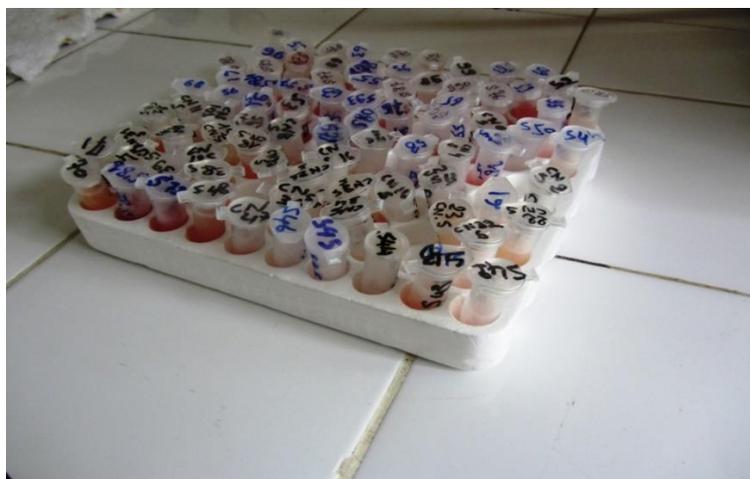


Figure11 : Tubes eppendorfs remplis de sérums de chevaux identifiés par un numéro

A l'issue de l'enquête, les sérums ont été acheminés jusqu'à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort dans des boîtes isothermes avec neige carbonique, sous couvert du froid. Une fois sur place ils ont été stockés dans un des congélateurs du laboratoire, à -18°C.

3.2. Analyses sérologiques

3.2.1. Immunofluorescence indirecte : criblage

Les analyses sérologiques ont été effectuées au laboratoire, d'octobre 2015 à juin 2016. Tous les sérums ont tout d'abord été criblés à une dilution au 50ème. Les sérums positifs à cette dilution ont ensuite été de nouveau testés à la même dilution et à des dilutions supérieures. Chaque lame d'IFI a été lue par deux opérateurs, en double aveugle.

3.2.1.1. Matériel

- 128 sérums de cheval ;
- Phosphate Buffered Saline (PBS) : solution Tampon utilisée comme diluant et solution de lavage en immunofluorescence indirecte (figure12a)



Figure 12a : Phosphate Buffered Saline (PBS)

Cette solution se compose de 7,650 g de chlorure de sodium, de 0,724 g de phosphate disodique, et de 0,210g de phosphate monopotassique.

- pH : 7,2
- Sous forme de poudre à diluer dans 1l d'eau distillée ;
- Eau distillée ;
- Bleu d'Evans ;
- Fluoprep ;
- Microscope optique à fluorescence (olympus, 50 W);
- Micropipettes, (figure 12b) ;



Figure 12b : Micropipettes

- Incubateur à 37°C ;
- 100 Plaques de 12 puits MegaScreen Fluoanaplasma ph. (MegaCor Diagnostik, Autriche). (Figure13)



Figure 13 : Plaques de 12 puits MegaScreen Fluoanaplasma ph. (MegaCor Diagnostik, Autriche).

3.2.1.2. Méthode

Les sérums sont décongelés à température ambiante. Une homogénéisation au vortex est réalisée pour chaque tube avant de prélever le sérum pour effectuer la dilution. (Figure 14)



Figure 14 : Vortexer les sérums après décongélation

Le criblage des sérums a été réalisé à la dilution au 1/50.

10 μ l de sérum ont été prélevés à la micropipette pour une dilution au cinquantième avec 490 μ L de PBS, puis déposés dans un puit d'une plaque MegaScreen Fluoanaplasma ph pour la recherche

de l'espèce *Anaplasma phagocytophilum* et d'une plaque MegaScreen Fluoborrelia burgdorferi sensu lato pour la recherche de *Borrelia* spp. Un sérum par puit, soit 10 sérums par plaque plus un sérum témoin positif et un sérum témoin négatif.

- Témoin positif : sérum de référence du laboratoire ;

- Témoin négatif : PBS seul.

Chaque plaque subit une incubation de 30 minutes à 37°C suivie de 2 rinçages de 5 minutes dans du PBS.

Le conjugué (sérum de lapin, antiIgG (H+L) de cheval ; producteur : Bethyl), dilué au 50ème, est préparé à partir d'une solution de bleu d'Evans dans du PBS et d'anti-immunoglobuline de cheval. 20 µL de conjugué sont déposés dans chaque puits, puis les plaques sont de nouveau incubées à 37°C pendant 30 minutes.

Deux rinçages de 5 minutes sont ensuite effectués puis du fluoprep ainsi qu'une lamelle par plaque sont déposés.

Une fois l'ensemble de ces manipulations effectuées, les lames ont été lues à l'aide d'un microscope à fluorescence.

3.2.1.3. Lecture des lames

Chaque lame est lue par deux opérateurs, de manière indépendante (lecture en double aveugle). Une lame est considérée comme positive lorsque des morulas vertes fluorescentes sont observées en quantité significative (plusieurs par champs, 1 pour 10 cellules). Pour le criblage, les lames sont classées par catégories en fonction du nombre de morulas et de l'intensité de la fluorescence : négative, positive +, ++, +++ ou ++++.

3.2.1.4. Dilution et détermination du taux d'anticorps

Tous les sérums positifs au criblage (de 2 à 4 croix) ont été ré-analysés pour déterminer leur titre en anticorps. Des dilutions ont été effectuées du 50ème au 1600ème. La méthode d'Immunofluorescence est la même que précédemment décrite.

Pour cette étape, les sérums sont considérés positifs s'ils sont vus à au moins 2 croix au 100ème. En effet, le distributeur des plaques considère que le diagnostic est certain si les sérums sont positifs au 100ème. Nous avons ainsi classé les sérums en 3 catégories :

- négatifs : aucune fluorescence au 100ème ;
- positifs : fluorescence significative au 100ème, au moins 2 croix ;
- douteux : quelques points de fluorescence, une croix au 100ème.

3.2.2. Technique ELISA

Pour la sérologie de *Borrelia burgdorferi*, un ELISA commercial développé et validé pour l'examen des sérums de chien ou de cheval (*Borrelia burgdorferi* Veterinary ELISA, Virotech diagnostics, Rüsselheim, Allemagne) a été utilisé selon les recommandations du producteur.

Pour la détection des anticorps IgG contre *Anaplasma phagocytophilum*, un ELISA commercial (*Ehrlichia equi* IgG Antibody Kit, Helica Biosystems, Inc., Santa Ana, CA, USA) a été utilisé selon les recommandations du fabricant.

Le principe de l'ELISA indirect consiste à détecter la présence d'un anticorps spécifique dans un échantillon. Pour cela nous avons besoin :

- d'un antigène connu spécifique à l'anticorps recherché ;
- d'un échantillon à analyser ;
- d'anticorps anti-IgG équins couplés à une enzyme et à une peroxydase (cet anticorps va reconnaître spécifiquement les anticorps IgG) ;
- du substrat spécifique à l'enzyme, ici du TMB.

Le test comporte quatre étapes principales (Figure 15) :

- Fixation de l'antigène : l'antigène connu, spécifique à l'anticorps recherché, est incubé sur une plaque de microtitration. L'antigène va se fixer de manière électrostatique au fond des puits. Ils sont ensuite lavés pour enlever les antigènes non fixés.>
- Fixation de l'anticorps à doser : on incube notre échantillon à doser (sérum contenant l'anticorps), ainsi que nos standards (solution contenant des concentrations connues d'anticorps). Les anticorps spécifiques vont se fixer aux antigènes. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps non fixés.

- Fixation de l'anticorps de détection : on incube ensuite un anticorps secondaire couplé à une peroxydase. C'est un anti IgG qui va donc reconnaître l'anticorps primaire. Un lavage des puits est nécessaire pour enlever les anticorps secondaires non fixés.
- Révélation : on incube un substrat spécifique à l'enzyme qui, si la réaction est positive (présence de l'anticorps recherché), va être transformé et induire une coloration bleue. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés.

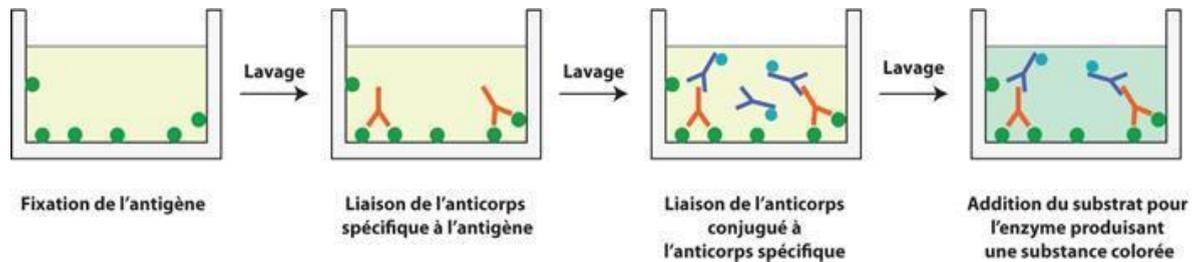


Figure 15. Étapes de la technique ELISA

Les avantages de la technique ELISA sont multiples : sa grande sensibilité, sa procédure automatisée, ses résultats quantitatifs. En revanche, il est reconnu que l'ELISA manque de spécificité : des réactions croisées sont possibles, notamment avec des anticorps dirigés contre d'autres spirochètes ou des espèces du genre *Anaplasma*.

4. Analyses statistiques

Les différences statistiques dans les proportions des niveaux d'anticorps ont été comparées en utilisant le chi carré (corrige de Yates) ou le test exact de Fisher. De plus, l'accord entre ELISA et IFAT a été évalué par le test de McNemar et le calcul de la valeur de κ . Sa valeur a été interprétée comme signifiant aucune cohérence où $\kappa \leq 0,20$, accord médiocre dans la plage de $0,21 \leq \kappa \leq 0,40$, accord modéré pour $0,41 \leq \kappa \leq 0,60$, bon accord à $0,61 \leq \kappa \leq 0,80$, et très bon accord dans le cas de $\kappa > 0,80$ (Lee et al., 2016).

La sensibilité relative est calculée selon le (nombre de résultats positifs pour les deux méthodes / nombre de résultats positifs pour la méthode de référence) $\times 100$.

La spécificité relative est calculée selon le (nombre de résultats négatifs pour les deux méthodes / nombre de résultats négatifs pour la méthode de référence) $\times 100$.

Le logiciel utilisé était Win episcopo 2.0 (Thrusfield et al., 2001), MedCalc (MedCalc Software Ltd., Ostende, Belgique) et XL stat (Addinsoft, Paris, France). Le niveau de signification statistique attribué était de 5%.

RÉSULTATS

&

DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Description de l'échantillon de chevaux

1. Races

128 chevaux ont été sélectionnés au hasard dans cette étude. Nous les avons classés selon leur race en Arabe, Barbe et Arabe barbe (Tableau 1)

2. Age des chevaux

Selon son âge, un cheval est considéré comme :

- jeune : moins de 6 ans,
- adulte : de 6 à 15 ans,
- ou âgé : plus de 15 ans (Tableau 1).

3. Sexe

Il y a 3 catégories de sexe : les femelles, les mâles et les hongres. Aucun mâle castré (hongre) ne figure parmi les chevaux prélevés. Les femelles sont pour une grande majorité dans l'équitation de loisir et pour l'autre dans la reproduction où elles représentent 10 % des chevaux.

Tableau 1. Caractéristiques du groupe d'étude en tenant compte du sexe, de l'âge et de la race des chevaux échantillonnés

Variable	Groupe sain (n = 108)	Groupe affecté (n = 20)
Sexe		
Mâle	62	14
Femelle	46	6
Age (Année)		
1–11	54	14
12–16	33	3
17–25	21	3
Race		
Arabe	85	15
Arabe barbe	13	2
Barbe	10	3

2. Analyse sérologique des sérums par IFAT et ELISA

2.1. Séroprévalence par IFAT et ELISA

Sur 128 échantillons de sérum, 28 (21,9%) étaient positifs pour *Borrelia burgdorferi* par IFAT et 19 (14,8%) par ELISA (tableau 2). Néanmoins, il n'y avait pas de différence significative dans la séroprévalence calculée par les deux méthodes ($P > 0,05$).

De la même manière, 25 sérums (19,53%) étaient positifs pour *A. phagocytophilum* par IFAT et 33 (25,9%) par ELISA. Mais encore une fois, la prévalence n'était pas significativement différente ($p > 0,05$) en ce qui concerne la méthode utilisée (tableau 2).

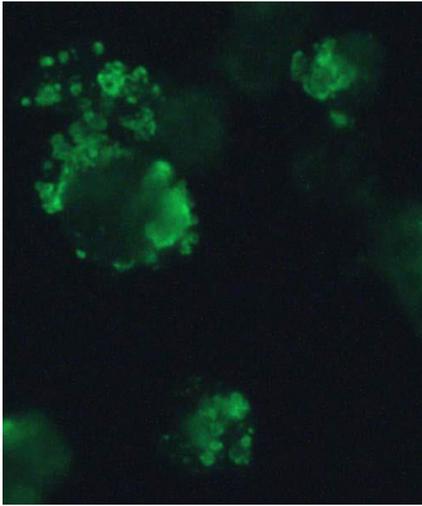


Fig 1: *Anaplasma phagocytophilum*



Fig 2: *Borrelia burgdorferi* sensu lato

2.1.1. Cas de co-infections

L'incidence de la double infection a été étudiée. Selon l'IFAT, 10 sérums étaient positifs pour les deux pathogènes. Cela implique que 15 sérums étaient positifs pour *Anaplasma phagocytophilum* uniquement et 18 pour *Borrelia burgdorferi* uniquement. Par ELISA, 13 sérums étaient positifs pour les deux pathogènes. Cela implique à son tour que 20 sérums étaient positifs pour *Anaplasma phagocytophilum* uniquement et 6 étaient positifs pour *Borrelia burgdorferi* uniquement (tableau 2).

Tableau 2. Séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* et *Anaplasma phagocytophilum* par ELISA et IFAT

Agent pathogène	IFAT (n=128)		ELISA (n = 128)	
	Positif	Seroprevalence (%) (95% CI)	Positif	Seroprevalence (95% CI)
<i>Borrelia burgdorferi</i> uniquement	18	14.1 (9.1–21.1)&	6	4.7 (2.2–9.9)&
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> uniquement	15	11.7 (7.2–18.4)£	20	15.6 (10.4–22.9)£
<i>A. phagocytophilum</i> et <i>B. burgdorferi</i> (co- infection)	10	7.8 (4.3–13.8)£	13	10.2(6.0–16.7)£
<i>Borrelia burgdorferi</i> (total)	28	21.87 (13.79–28.20)*	19	14.84 (7.86–20.13)*
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (total)	25	19.53 (12.06–25.93)*	33	25.87 (17.34–32.65)*

* - La prévalence n'était pas significativement différente entre les méthodes (P> 0,05)

£ - La prévalence n'était pas significativement différente selon l'IFAT et l'ELISA (P> 0,05)

& - La prévalence était significativement différente par IFAT et ELISA (P <0,05)

2.1.2. Association entre séropositivité et signes cliniques

Parmi les chevaux présentant des signes cliniques (n=20), neuf étaient positifs pour les anticorps *anti- Anaplasma phagocytophilum* par IFAT : cinq avec fièvre et inappétence, deux avec de mauvaises performances, un avec des symptômes ophtalmologiques et un avec un trouble neurologique. Parmi onze chevaux positifs en IFAT pour les anticorps de *Borrelia burgdorferi* et présentant des signes cliniques, trois avaient de mauvaises performances, deux présentaient des symptômes ophtalmologiques, deux avec une ostéoarthrite, deux avec des coliques et enfin deux avec des troubles neurologiques. La présence de signes cliniques est un facteur associatif important car la prévalence est plus élevée chez les animaux en mauvaise santé.

Tableau 3. Signes cliniques observés chez les chevaux prélevés

Âge	Sexe	Race	Ectoparasite	Signes cliniques
12 ans	M	Arabe Barbe	tique	Troubles neurologiques
20 ans	M	Arabe Barbe		Faible performance
6 ans	F	Arabe	tique	Fièvre, inappétence
21 ans	M	Arabe		Faible performance
4 ans	M	Arabe	tique	Fièvre, inappétence
4 ans	M	Arabe	tique	Fièvre, inappétence
11 ans	F	Arabe Barbe		Faible performance
8 ans	F	Arabe	tique	Troubles neurologiques
8 ans	M	Arabe	tique	Fièvre, inappétence
25 ans	M	Arabe		Coliques

7 ans	M	Arabe		Troubles ophtalmiques
7 ans	M	Arabe		Faible performance
9 ans	F	Arabe	tique	Fièvre, inappétence
11 ans	M	Arabe		Troubles ophtalmiques
2 ans	F	Arabe		Faible performance
15 ans	M	Arabe		Coliques
1 an	F	Arabe	tique	Osteoarthritis
2 ans	M	Arabe	tique	Osteoarthritis
12 ans	M	Barbe		Coliques
11 ans	M	Barbe		Troubles ophtalmiques

2.1.3. Association entre séropositivité âge, sexe et race

L'association entre la séroprévalence et plusieurs facteurs a été étudiée à l'aide du chi carré (corrige de Yates) ou du test exact de Fisher (tableau 4).

Pour *Anaplasma phagocytophilum*, l'âge était un facteur de risque selon les deux méthodes. Les plus jeunes animaux (1 à 11 ans) étaient plus fréquemment positifs que les plus âgés.

Le sexe n'était pas un facteur de risque par IFAT mais par ELISA, où les femelles étaient plus fréquemment positives.

La race n'était pas un facteur de risque, mais la présence de signes cliniques l'était, car dans le groupe d'animaux touchés, la prévalence était plus élevée que chez les animaux sains.

Pour *Borrelia burgdorferi*, le risque était associé à l'âge lorsque la méthode était l'IFAT, avec une prévalence plus élevée chez les animaux les plus jeunes (1 à 11 ans), mais pas lorsque la méthode était ELISA. Le sexe n'était pas un risque important pour l'une ou l'autre méthode. Les tests IFAT ont montré une prédisposition variable selon la race, mais pas les tests ELISA.

Tableau 4. Séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* et *Anaplasma phagocytophilum* en ce qui concerne la race, le sexe, l'âge et l'état de santé

Variable	<i>A. phagocytophilum</i>		<i>B. burgdorferi</i>	
	IFAT+(%; 95% CI)	ELISA+(%; 95% CI)	IFAT+(%; 95% CI)	ELISA+(%; 95% CI)
Age (Année)				
1–11 (n = 54)	22 (40,7; 28,7–54,0)	26 (48,1; 35,4–61,2)	22 (40,7; 28,7–54,0)	10 (18,5; 10,4–30,9)
12–16 (n = 33)	3 (9,1; 3,1–23,6)	4 (12,1; 4,8–27,3)	3 (9,1; 3,1–23,6)	6 (18,2; 8,6–34,4)
17–25 (n = 21)	0 (0)	3 (14,3; 5,0–34,6)	3 (14,3; 5,0–34,6)	3 (14,3; 5,0–34,6)
P value	<0,01 SS	<0,01 SS	<0,01 SS	0,9 NS
Sexe				
Male (n = 62)	12 (19,4; 11,4–30,8)	9 (14,5; 7,8–25,4)	15(24,2; 15,2–36,2)	14 (22,6; 13,9–34,4)
Femelle (n = 46)	13 (28,3; 17,3–42,6)	24 (52,2;38,1–65,9)	13 (28,3;17,3–42,6)	5 (10,9; 4,7–23,0)
P value	0,3 NS	<0,01 SS	0,6 NS	0,1 NS
Race				
Arabe (n = 85)	20 (23,5; 15,8–33,6)	22 (25,9;17,8–36,1)	20(23,5; 15,8–33,6)	14 (16,5; 10,1–25,8)
Barbe (n = 13)	1(7,7; 1,4–33,3)	5 (38,5; 17,7–64,5)	1 (7,7; 1,4–33,3)	1 (7,7; 1,4–33,3)
Arab–Barbe(n=10)	4 (40; 16,8–68,7)	6 (60; 31,2–83,2)	7 (70; 39,7–89,2)	4 (40; 16,8–68,7)
P value	0,2 NS	0,07 NS	<0,01 SS	0,1 NS
Signes cliniques				
Oui (n = 20)	9 (45; 25,8–65,8)	10 (50; 29,9–70,1)	11 (55; 34,2–74,2)	7 (35; 18,1–56,7)
Non (n = 108)	16 (14,8; 9,3–22,7)	23(21,3; 14,6–29,9)	17(15,7; 10,1–23,8)	12 (11,1; 6,5–18,4)
P value	<0,01 SS	<0,05 S	<0,01 SS	<0,05 S

2.1.4. Comparaisons des deux méthodes sérologiques “test de concordance”

Pour *Borrelia burgdorferi sensu lato*, le pourcentage de concordance entre ELISA et IFAT était 86,7% (111/128) et l'indice κ était de 0,56, ce qui correspond à une concordance modérée, tandis que pour *Anaplasma phagocytophilum*, le pourcentage de concordance était de 85,9% (110/128) et l'indice κ était de 0,6, ce qui correspond à un accord substantiel (111/128). Le test de McNemar a indiqué que le désaccord entre les méthodes ne pouvait pas être attribué au hasard ($P < 0,01$) (tableau 5).

Tableau 5. Analyse de l'accord entre les tests IFAT et ELISA

<i>B. burgdorferi</i>		IFAT			Statistiques	
	Serum	Positive	Negative	Total	$\kappa = 0,56$	
					McNemar $P < 0,01$ SS	
ELISA	Positive	15	4	19	% agreement = 86,7	
	Negative	13	96	109	Relative sensitivity = 53,6%	
	Total	28	100	128	Relative specificity = 96%	
<i>A. phagocytophilum</i>		IFAT			Statistiques	
	Serum	Positive	Negative	Total	$\kappa = 0,61$	
					McNemar $P < 0,01$ SS	
ELISA	Positive	20	13	33	% agreement = 85,9	
	Negative	5	90	95	Relative sensitivity = 80%	
	Total	25	103	128	Relative specificity = 87,4%	

DISCUSSION

Les chevaux sont de grands animaux à sang chaud couramment exposés aux tiques. Ils peuvent être directement affectés par les infections transmises par les tiques ou jouer le rôle de réservoir pour une transmission ultérieure.

Les principales maladies transmises par les tiques chez les chevaux sont la piroplasmose équine causée par *Babesia caballi* et *Theileria equi*, la borréliose de Lyme causée par *Borrelia burgdorferi* et l'anaplasmose granulocytaire équine causée par *Anaplasma phagocytophilum* (Saleem *et al* 2018). La présence de ces infections vectorielles et la connaissance de leur potentiel épidémique en Algérie sont peu connues. Bien que certains travaux ont été décrits au sujet de la présence de cas d'anaplasmose et de borreliose chez les carnivores domestiques et les ruminants, ceux concernant les chevaux n'ont jamais été documentés.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés en particulier à la circulation de *Anaplasma phagocytophilum* et de *Borrelia burgdorferi sensu lato* dans une écurie dans la région d'Alger.

L'Anaplasmose équine est une maladie infectieuse provoquée par la bactérie *Anaplasma phagocytophilum biovar equi*. C'est une maladie vectorielle transmise par les tiques. Encore assez mal connue dans nos pays, elle est sous diagnostiquée et trop souvent confondue avec la piroplasmose équine en raison de la similitude de leur expression clinique. Cependant, l'étude de cette maladie montre qu'elle peut être à l'origine de plusieurs semaines d'inactivité et donc engendrer des pertes économiques importantes. Par ailleurs, le caractère zoonotique supposé ou avéré de cette maladie donne à son étude une importance toute particulière.

La maladie de Lyme chez le cheval reste une affection caractérisée par une grande diversité tant au niveau des espèces de *Borrelia burgdorferi*, de son épidémiologie, des symptômes souvent peu caractéristiques et des méthodes de diagnostic. Ces éléments entraînent souvent un diagnostic trop tardif aboutissant souvent à des séquelles irréversibles. Les conséquences de cette maladie vont être très négatives chez le cheval de sport pouvant aller de l'impotence jusqu'à l'euthanasie. Les analyses sérologiques utilisant l'IFAT ont révélé qu'un total de 25 chevaux (19,5%) sur les 128 analysés étaient séropositifs pour *A. phagocytophilum*. La séroprévalence de cette bactérie obtenue dans cette étude (19,5%) confirme la présence de ce pathogène transmis par les tiques en Algérie (Azzag *et al.*, 2015) et suggère son association possible, en termes de schémas endémiques, avec *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Cette séroprévalence coïncide également avec les données précédemment rapportées dans d'autres pays, dont la France, l'Espagne et la Suède (Amusategui

et al., 2006 ; Egenvall *et al.*, 2001 ; Leblond *et al.*, 2005) est cohérente avec l'endémicité de l'anaplasmose granulocytaire équine signalée dans différentes parties du monde. La séroprévalence d'*A. phagocytophilum* variait de 0,3% à 73% (Saleem, Ijaz *et al.*, 2018).

Le tableau 6 montre la prévalence observée dans cette étude en comparaison avec d'autres études sérologiques du monde entier. Notre étude a permis d'obtenir un pourcentage se rapprochant de la moyenne de ces études. La comparaison la plus intéressante peut être faite avec l'étude de la Tunisie voisine, où la séroprévalence de 16,53% (56/343) n'était pas significativement différente de nos données ($P = 0,4$) (Bensaid *et al.*, 2014). Les différences de prévalence dans les études pourraient être liées aux échantillons, qui peuvent avoir été sélectionnés au hasard ou en mettant davantage l'accent sur les animaux présentant des symptômes. Néanmoins, les chevaux des écuries ou des cas avaient déjà été signalés avaient tendance à avoir des titres moyens plus élevés (Saleem *et al.*, 2018).

Tableau 6. Séroprévalence d'*A. Phagocytophilum* dans le monde

Pays	Année	Technique	n	Positive	Prévalence (%)	Limite sup	Limite infer	Reference
Algérie	2018	IFAT	128	25	19,53	12,66	26,40	Laamari <i>et al.</i> , 2020
Bulgarie	2018	ELISA	155	31	20,00	13,70	26,30	Tsachev <i>et al.</i> , 2018
Canada	2015	SNAP 4Dx	376	2	5,31	0	1,27	Schwartz <i>et al.</i> , 2015
République tchèque	2011	IFAT	92	67	72,8	63,74	81,91	Saleem <i>et al.</i> , 2018
Denmark	2010	SNAP 4Dx	390	87	22,31	18,18	26,44	Saleem <i>et al.</i> , 2018
France	2005	ELISA	424	48	11,32	8,30	14,33	Saleem <i>et al.</i> , 2018

France	2009	ELISA	408	55	13,48	10,17	16,79	Saleem <i>et al.</i> , 2018
Guatemala	2005	IFAT	74	10	13,51	5,72	21,30	Saleem <i>et al.</i> , 2018
Italie	2003	IFAT	561	2	3,56	0	8,50	Saleem <i>et al.</i> , 2018
Italie	2008	IFAT	793	134	16,90	14,29	19,51	Saleem <i>et al.</i> , 2018
Italie	2008	IFAT	154	12	7,79	3,56	12,03	Saleem <i>et al.</i> , 2018
Italie	2010	IFAT	135	23	17,04	10,69	23,38	Saleem <i>et al.</i> , 2018
Italie	2019	IFAT	479	109	22,76	19,00	26,51	Ebani, 2019
Mongolie	2018	IFAT	216	91	42,13	35,54	48,71	Von Fricken <i>et al.</i> , 2018
Tunisie	2014	IFAT	343	56	16,33	12,41	20,24	Bensaid, 2014

L'IFAT a été utilisée comme méthode de référence pour la sérologie, mais l'ELISA a donné des résultats similaires sans différence significative. L'ELISA est une technique plus simple qui peut donc être recommandée pour la sérologie *Anaplasma phagocytophilum*. La sérologie étant une méthode de diagnostic indirect attestant le contact entre le système immunitaire d'un animal et le pathogène, une méthode plus directe telle que la PCR est recommandée dans un contexte clinique (Saleem *et al.*, 2018).

Les différences entre les valeurs de séroprévalence décrites dans ce travail peuvent s'expliquer par une incohérence dans les facteurs qui les déterminent, y compris les populations de chevaux étudiées et, plus impactant, la fréquence d'exposition au vecteur *Ixodes ricinus*.

Le taux de séroprévalence pour *Borrelia burgdorferi* rapporté dans cette étude est de 21,9%. Les récentes études de séroprévalence ont montré une prévalence allant de 0% (Afrique subsaharienne et Guyane française) à 58% (Brésil). Les résultats d'autres études du monde entier sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7. Séroprévalence de *Borrelia burgdorferi* dans le monde

Pays	Année	Technique	n	Positive	Prevalence (%)	Limite inférieure	Limite supérieure	Référence
Algérie	2019	IFAT	128	28	21,88	14,71	29,04	Laamari et al., 2020
Brésil	2018	ELISA	367	214	58,31	53,27	63,36	Socoloski et al., 2018
Canada	2015	SNAP 4Dx	376	6	1,60	0,033	2,86	Tsachev et al., 2018
France	2010	SNAP 4Dx	408	134	32,84	28,29	37,40	Maurizi et al., 2010
Guyane française	2010	SNAP 4Dx	49	0	0	0	0	Maurizi et al., 2010
Italie	2013	IFAT	300	21	7,00	4,11	9,89	Laus et al., 2013
Italie	2012	SNAP 4Dx	98	15	15,31	8,18	22,43	Veronesi et al., 2012
Italie	2012	IFAT	386	94	24,35	20,07	28,63	Ebani et al., 2012
Correa	2016	ELISA	727	40	5,50	3,84	7,16	Lee et al., 2016
Mexique	2001	IFAT	100	34	34,00	24,72	43,28	Salinas-Méendez et al., 2001
Pologne	2008	ELISA	395	101	25,57	21,27	29,87	Stefanciková et al., 2008
Romanie	2011	ELISA	260	31	11,92	7,98	15,86	Kiss et al., 2011
Afrique Sub Saharienne	2010	SNAP 4Dx	113	0	0	0	0	Maurizi et al., 2010
Turquie	2008	ELISA	300	18	6,00	3,31	8,69	Bhide et al., 2008
USA	2012	ELISA and WB	210 0	175	8,33	7,15	9,52	Wagner et al., 2012

La comparaison des deux méthodes sérologiques a indiqué que l'IFAT a donné plus d'échantillons positifs que l'ELISA. Treize sérums étaient positifs par IFAT et négatifs par ELISA. Puisque l'IFAT était considérée comme la méthode de référence, cela signifie que dans ce travail l'ELISA a montré une faible sensibilité (53,6%).

L'ELISA utilisé est un kit commercial validé (9). Deux explications possibles existent : soit la méthode ELISA manque de sensibilité, soit l'IFAT manque de spécificité. L'examen d'autres dilutions de sérum à l'IFAT a indiqué que seuls 16 des 28 sérums positifs étaient encore positifs à 1: 100, 9 à 1: 200 et 3 à 1: 400. Par conséquent, si la comparaison entre IFAT et ELISA est basée sur la dilution du sérum à 1: 100 à l'IFAT plutôt qu'à 1: 50, l'accord entre les méthodes est bien meilleur. L'accord général est de 96,1%, la sensibilité relative de 93,75% et la spécificité relative de 96,4%. Le coefficient κ de Cohen est de 0,83, ce qui correspond à un accord presque parfait.

L'étude des facteurs de risque a étonnamment indiqué une prévalence plus élevée à la fois pour *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi sensu lato* chez les jeunes animaux par

rapport aux animaux plus âgés. Cela est en contradiction avec d'autres études indiquant que les animaux plus âgés étaient plus fréquemment infectés que les jeunes animaux (Hermann 1985 ; Laus *et al.*, 2013). Il n'y a pas de différence de prévalence selon le sexe, les données de cette étude étant confirmées par la littérature (Kiss *et al.*, Maurizi *et al.*, 2010). La race n'est pas un facteur de risque de prévalence d'*Anaplasma Phagocytophilum*, mais pour *Borrelia burgdorferi sensu lato*, les animaux croisés étaient plus susceptibles d'être infectés. Néanmoins, le petit nombre d'animaux dans plusieurs sous-groupes rend les résultats difficiles à interpréter en raison de la large gamme de valeurs (Tableau 4).

Enfin, comme prévu, les animaux présentant des signes cliniques étaient plus fréquemment positifs pour *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi sensu lato* que les animaux sains. Un facteur de risque majeur qui n'a pas été étudié dans ce travail est la présence de tiques sur les chevaux mis en expérimentation (Egenvall *et al.* 2001). En effet, dans notre étude, nous n'avons pas pu identifier les tiques sur les animaux échantillonnés. Néanmoins, des discussions avec les responsables d'écurie ont indiqué que des tiques étaient parfois observées sur les animaux dont ils avaient la charge. Cette observation est bien entendu cohérente avec nos résultats sérologiques. De plus, les chevaux avaient été traités préventivement avec des médicaments antiparasitaires (insecticides organophosphorés), ce qui explique l'absence de tiques lors du prélèvement (communication personnelle).

L'un des objectifs de notre étude était de rechercher s'il existe des associations entre la présence d'anticorps sériques contre l'une ou l'autre de ces deux bactéries et les signes cliniques de la maladie. Dans le groupe sain (n = 108), 16% étaient séropositifs pour *Anaplasma phagocytophilum* et 17% pour *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Les proportions qui étaient séropositives dans le groupe de chevaux qui n'étaient pas considérés comme sains étaient statistiquement significativement différentes de celles des chevaux sains et étaient similaires pour les deux agents. Par conséquent, nous avons montré que les titres d'anticorps dirigés contre *Borrelia burgdorferi* ou *Anaplasma phagocytophilum* étaient associés à des problèmes cliniques. Nos observations sont similaires à celles décrites par Büscher *et al.*, en 1984, à savoir que certains chevaux séropositifs pour *Borrelia burgdorferi* présentaient une boiterie et des articulations enflées. Dans une autre étude, une association entre le statut sérologique de *Borrelia burgdorferi sensu lato* et la myalgie chez les chevaux a été observée (Maloney *et al.*, 1992).

Concernant *Anaplasma phagocytophilum*, une seule étude a rapporté que les chevaux présentant des signes cliniques présentaient des titres d'anticorps contre la bactérie ; 6 sur 12 de ces animaux

ont été testés positifs à l'IFAT et ont reçu un traitement à la tétracycline pour une suspicion de maladie granulocytaire ehrlichiose (Azzag, 2012).

En conclusion et au terme de ce travail, les anticorps contre *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* et les deux agents pathogènes (co-infection) ont été trouvés chez des chevaux du nord de l'Algérie. La question de savoir si une co-exposition à des agents pathogènes augmenterait également les signes cliniques chez les chevaux nécessite une enquête plus approfondie. D'un point de vue technique, même si l'IFAT reste la méthode de référence, l'ELISA a donné des résultats similaires et est plus simple d'utilisation.

La maladie de Lyme et l'anaplasmose granulocytaire chez le cheval représentent un défi diagnostique : il n'existe pratiquement pas de test biologique permettant de confirmer le statut infectieux de l'animal, la réponse au traitement ne peut être utilisée comme critère diagnostique, et les signes cliniques les plus fréquemment traités (boiteries, raideur, hyperesthésie, léthargie) n'ont jamais été reproduits expérimentalement. De nombreux chevaux reçoivent une antibiothérapie prolongée, sans indication évidente de l'origine de l'affection. À l'inverse, les formes localisées de maladie de Lyme (nerveuses, oculaires, cutanées) sont très probablement sous-diagnostiquées.

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'émergence, ou la réémergence des maladies bactériennes et parasitaires vectorisées par les tiques est permise par plusieurs mécanismes. Les modifications du paysage par les hommes, ainsi que les changements de leurs habitudes de vie peuvent entraîner une augmentation du contact entre les espèces cibles et les tiques, et ainsi favoriser l'apparition de maladies dont l'agent pathogène circule à bas bruit. Les tiques infectées peuvent être transportées sur de grandes distances lorsqu'elles sont fixées sur des animaux, comme le bétail lors d'échanges commerciaux légaux ou illégaux. Elles peuvent alors s'implanter dans de nouvelles régions propices à leur développement.

Ce présent travail consiste en une exploration de l'infection chez les chevaux par *Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi sensu lato* vectorisées par des arthropodes hématophages en Algérie. Les pathogènes inclus dans cette étude sont considérés comme majeurs en médecine vétérinaire, d'une part en tant que germes pathogènes reconnus pour les chevaux et d'autre part parce que dans certains cas les chevaux sont considérés comme des sentinelles de ces agents pathogènes.

Au terme de nos recherches et analyses nous avons décrit pour la première fois en Algérie la circulation d'*Anaplasma phagocytophilum* et *Borrelia burgdorferi sensu lato* chez les équidés. Notre étude fournit aussi de nouvelles données concernant les signes cliniques évocateurs et qui peuvent être associés à une infection par les genres *Anaplasma* et *Borrelia*. En effet, la symptomatologie exacte lors d'affection clinique est peu documentée.

La faible taille de notre échantillon ne nous permet pas de poser une conclusion définitive. La recherche de ces agents infectieux hémotropes sur un plus grand nombre de chevaux provenant de plusieurs écuries et l'inoculation expérimentale puis le suivi des paramètres cliniques des animaux infectés permettrait de présenter une conclusion sur leur impact et d'avoir une vision plus représentative sur ces affections.

Les recherches et les différents travaux portant sur ces maladies vectorielles doivent faire progresser la médecine vétérinaire et permettre un diagnostic plus rapide. Il est aujourd'hui important à titre d'exemple d'inclure la maladie de Lyme dans le diagnostic de boiteries intermittentes associées à des symptômes systémiques et une morsure de tique.

Il existe donc un réel besoin :

- d'études épidémiologiques supplémentaires, afin de déterminer la morbidité chez les chevaux infectés et d'identifier l'étendue des signes cliniques spécifiques

- d'un modèle expérimental avec signes cliniques pour déterminer les protocoles diagnostiques et thérapeutiques
- de tests de détection sensibles et spécifiques d'antigènes au sein des tissus pour mieux documenter la maladie
- d'investigations sur les autres organismes *Borrelia spp* et *Anaplasma spp.* présents en Algérie

Les vaccins n'étant pas disponibles, seules des mesures de contrôle des tiques permettent actuellement de prévenir efficacement l'infection des chevaux.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AGUERO-ROSENFELD M.E., WANG G., SCHWARTZ I., & WORMSER G.P. 2005.** Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.*18, **3**, pp: 484-509.
2. **AKIN E., MCHUGH GL., FLAVELL RA., FLAVELL R.A., FIKRIG E. and STERRE A.C. 1999.** The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild and brief arthritis. *Infect. Immun.* **67**, pp: 173-181.
3. **ALEKSEEV A., N., DUBININA H.V., SEENOV A.V., BOLSHACOV C.V. 2001.** Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Akari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J. Med. Entomol.*, **38**, pp :471-474.
4. **AMORY H.& PITEL P-H. 2007.** Le syndrome piro-like: diagnostique differential du syndrome piro-like sur la base des symptômes et cas cliniques de cas de syndrome piro-like incluant les moyens de diagnostic. *Proceeding of the annual meeting of the AVEF.* Deauville.
5. **AMUSATEGUI I., SAINZ A., TESOURO M.A. 2006** Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. *Ann. N. Y.Acad. Sci*, **1078**, pp: 487–490.
6. **ANDERSON J.F., DOBY J.M., COUATARMANACH A. HYDE F.W. et JOHSON R.C. 1986.** Différences antigéniques entre des souches de *borrelia burgdorferi* isolées d'*ixodes ricinus* en Bretagne. *Médecine et Maladies infectieuses*, **16**, pp :171-175.
7. **ANDERSON J.F., JOHNSON R.C., MAGNARELLI L.A. & HYDE F.W. 1986.** Involvement of birds in the epidemiology of lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **51**, pp394-396.
8. **ASSOUS M., POSTIC D., PAUL G., NAVOT T., BARANTON G. 1993.** Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strain used as antigen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **12**, pp: 261-268.

9. **AZZAG N., PETIT E., GANDOIN C., BOUILLIN C., GHALMI F., HADDAD N., BOULOUIS H.J. 2015:** Prevalence of select vector-borne pathogens in stray and client-owned dogs from Algiers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **38**, PP:1–7.
10. **BAKER J. R., LEYLAND A. 1973.** Diarrhoea in the horse associated with stress and tetracycline therapy. *Vet. Rec.*, **93**, (22), pp:583-584.
11. **BAKKEN J. S., DUMLER J. S. 2000.** Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* **31**, pp: 554-560.
12. **BAKKEN J. S., KRUETH J., WILSON-NORDSKOG C., TILDREN R. L. ASANOVICH K., DUMLER J.S. 1996.** Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *JAMA*, **275**, pp:199-205.
13. **BARANTON G., ASSOUS M., & POSTIC. 1992.** Trois espèces bactériennes associées à la borréliose de Lyme. Conséquences cliniques et diagnostiques. *Bull Acad. Natl. Med.* **176** : discussion pp :1085-1086.
14. **BARANTON G., POSTIC D., SAINT-GIRONS I., BOERLIN P., PIFFARETI, J., C., ASSOUS, M., GRIMOT, PAD. 1992,** Delineation of *Borrelia Burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, sp. Nov., and group VS 461 associated with Lyme borreliosis. *Intern. Journ. Systematic Bacteriolo.*, **42**, pp:378-383.
15. **BARBOUR A.G. 1986.** Cultivation of *Borrelia*: A historical review. *Zbt. Bakt. Hyg. A* **263**, pp:11-14.
16. **BARBOUR A.G., HAYES S.F. 1986.**Biology of borrelia species. *Rev.***50**, pp: 381-400.
17. **BARBOUR A.G., TESSIER S.L., and HAYES, S.F.1984.** Variation of a major protein of Lyme disease spirochetes. *Infect. Imm.* **45**, pp: 94-100.
18. **BARIL C., RICHAUD C., BARANTON G., SAINT-GIRONS I. 1989.** Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Res. Microbiol.*, **150**, pp: 507-516.

19. **BARTOL J. 2013.** Is Lyme disease overdiagnosed in horses? *Equine Vet. J.* **45**, pp:529-530.
20. **BEHL R., KLEIN M.B., DANDELET L., BACH R., R., GOODMAN J., L., KEN N. 2000.** Induction of tissue factor procoagulant activity in myelomonocytic cells inoculated by the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Thombosis and haemostasis*, **83**, pp: 114-118.
21. **BENSAID M., BELKAHIA H., SAYAHI L., ALOUI M., JEMLI M.H., HADJ MOHAMED B., SASSI L., DARGHOUT M.A., DJAIEM A.A., BAYOUDH M., MESSADI L. 2014.** Première étude sérologique de la prévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez le Dromadaire (*Camelus dromedarius*) en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot*, **107**, PP:1–6.
22. **BHIDE M., YILMAZ Z., GOLCU E., TORUN S., MILUKA I 2008.:** Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. *Ann Agric Environ Med*, **15**, 85–90.
23. **BJOERSDORF A., BERGSTROM A., MASSUNG R., F. 2001.** *Ehrlichia*-infected ticks on migrating birds. *Emerg. Inect. Dis.*, **7**, pp: 877-879.
24. **BJOERSDORF A. S., VENDENIUS L., OWENS J.H. 1999.** Feline granulotic ehrlichiosis- a report of a new clinical entity and characterization of the infectious agent. *J.Small Anim. Pract.*, **40**, pp:20-24.
25. **BOWN K.J., BEGON M. et al. 2006.** “Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): Potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom?” *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **6**, (4), pp: 404-410.
26. **BROUQUI P. 1999.** Ehrlichiosis in Europe. In: *Rickettsia and rickettsial diseases at the third millennium*. Paris: Elsevier, pp: 393-405.
27. **BROWNLEE A., WILSON D.R., 1932.** Studies of the histopathology of louping-ill. *J. Comp. patho. Ther.* **45**, pp: 67-92.

- 28. BROWNING A., CARTER S., D. BARNES A., MAY C., BENTT D. 1993.** Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *Vet. Rec.*, **132**, pp: 610-611.
- 29. BURGENDORFER W., BARBOUR A.G., HAYES S F., et al. 1982:** Lyme disease – A tick-borne spirochetosis? *Science*, **216**, pp:1317-1319.
- 30. BURGESS E.C. 1986,** Experimental inoculation of dogs with *Borrelia burgdorferi*. *Zbt. Bakt. Hyg.*, **A263**, pp: 49-54.
- 31. BURGESS E. C. 1988.** *Borrelia burgdorferi* in Wisconsin horses and cows. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **539**, pp: 235-243.
- 32. BURGESS E.C., GENDRON-FITZPATRICK A., MATTISON, M. 1988.** Foal mortality associated natural infection of pregnant mare with *Borrelia burgdorferi*. In: *Equine infectious disease V: proceeding of the fifth international conference*, V, pp: 217-220.
- 33. BURGESS E.C., GILLETTE D., PICKETT J.P. 1986.** Arthritis and panuveitis as manifestations of *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin pony. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 189, **10**, pp: 1340-1342.
- 34. BURGESS E.C.& al. 1987.** Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia Burgdorferi* infection in a cow. *J.A.V.A.*. pp:1468-1470.
- 35. BURGESS E.C., MATTISON M. 1987.** Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in horse. *J. Amer. Vet. Assn.* 191, **11**, pp: 1457-1458.
- 36. CARDOSO L., MENDAO C., MAIDERA DE CARVALHO L.,** Prevalence of *Dirofilaria immitis* , *Ehrlichia Canis*, *Borrelia sensu lato*, *Anaplasma Spp* and *Leishmania Infantum* in apparently healthy and CVBD dogs in Portugal. *National serological Parasit Vectors* 2012; 5: 62

- 37. CASJENS S., PALMER N., VAN VUGT, R., et al. 2000.** A bacterial genome in flux : the twelve linear and nine circular extrachromosomal dans in an infectious isolate of lyme disease *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 35, 3 pp : 490-516.
- 38. CHANG E. BUSSI G. RUINI A. and MOLINARY, E. Phys. 2005** *Rev. B* 72, pp:195-423.
- 39. CHANG Y.F., KU Y.W., CHANG C.F. et al. 2005:** Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. *Vet Microbiol* 107, pp:285-294.
- 40. CHANG Y.F., NOVOSOL V., Mc DONOUGH S.P., et al. 2000a.** Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to *Ixodid* ticks. *Vet. Pathol.*
- 41. CHANG Y.F., NOVOSOL V., Mc DONOUGH S.P., JACOBSON R. H. DIVERS T.J., QUIMBY F., W., SHIN S., LEIN D.H. 2000.** Experimental Infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to *Ixodid* ticks. *Vet. Pathol.* 37, pp: 68-76.
- 42. CHARON NW, COCKBURN A, LI C, LIU J, MILLER KA, MILLER MR, MOTALEB MA, WOLGEMUTH CW 2012.** The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of Microbiology*, 66, 349-370.
- 43. CHEN S.M., DUMLER J.S., BAKKEN J.S., WALKER D.H.1994.** Identification of granulocytotropic *Ehrlichia* species as the ethiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.*, 32, pp: 589-595.
- 44. CHOI K., S., GARYU J., PARK J., AND DUMLER J., S. 2003.** Diminished adhesion of *Anaplasma phagocytophilum*-infected cells is associated with reduced expression of leukocyte surface selectin. *Infect Immun* 71, pp: 4586-4594.
- 45. COHEN N., D., 1996.** Borreliosis (Lyme disease) in horses. *Eq. vet. Educ.* 8, 4, 213-215.
- 46. CRAFT J.E., GRODZIKI R.L. & STEERE A.C. 1984.** Antibody Response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J. Infec. Dis.*149, 5, pp.789-795.

- 47. CROTHER T.R., CHAMPION C.I., WU X-Y., BLANCO D.R., MILLER J.N., and LOVETT M.A. 2003.** Antigenic Composition of *Borrelia burgdorferi* during Infection of SCID Mice. *Inf. And Immunity*, pp: 3419-3428.
- 48. DANIELS T. J., BATTALY G. R., LIVERIS D. 2002** Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerg. Infect. Dis.*, **8**, pp :1524-1525.
- 49. Davis G.E. 1940.** Ticks and relapsing fever in the United States. *Public Health Rep.* **55**, pp :2347-2351.
- 50. DE LA FLUENTE J., MASSUNG R.F., WONG S.J. et al., 2005.** Sequence Analysis of the *Msp4* Gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**, **3**, pp : 1309-1317.
- 51. DE LA FLUENTE J., NARANJO V., RUIZ-FONS F. et al. 2004.** Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari :ixodidae) collected from European wild boar (*sus crofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, **50**, **4**, pp. 187-196.
- 52. DE SILVA A.M., FIKRIG E.1997.** *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in thicks and mammals. *Focus* **13**, pp:267-270.
- 53. DIUK-WASSER M.A., GATEWOOD A.G., CORTINA M.R., YAREMYCH-HAMER S., TSAO J., KITRON U., HICKLING G., BROWNSTEIN J.S., WALKER E., PIESMAN J. and FISH. 2006.** Spatiotemporal Patterns of Host-Seeking *Ixodes scapularis* Nymphs (Acari: Ixodidae) in the United States. *J. Med. Entomol.* **43** **2**, pp:166-176.
- 54. DIVERS T., F.W., SHIN S., LEIN D.H., 2000a.** Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. *Vet. Pathol.* **37**,pp: 68-76.
- 55. DIVERS T.J. 2016.** *Borrelia burgdorferi* Infection in the Horse: What Do We Actually Know? *Proceeding of the ACVIM Forum*, Denver, Colorado June, pp: 8-11.
- 56. DIVERS T.J., SELTON M.T. LONG W.B., Saunders. 2006** Lyme disease. *In Equine*

- 57. DOBY J. M., CHEVRIER S., COUATARMANACH A. 1987.** Spirochétose à tique par *Borrelia burgdorferi* chez le cheval en Bretagne. Résultats d'une enquête sérologique portant sur 400 chevaux. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*, **5**, pp : 285-298.
- 58. DRAZENOVICH N., FOLEY J., BROWN R., N. 2006.** Use of real-time quantitative PCR targeting the msp2 protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animal. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **6,33**, pp: 86-90.
- 59. DUMLER J. S. et al. 2002.** Transmission of *Anaplasma phagocytophilum*. (Human granulocytic ehrlichiosis agent). In horses using experimentally infected ticks (*Ixodes scapularis*). *J. Vet. Med.*, **49**, pp: 484-488.
- 60. DUMLER J. S., BAKKEN J. S. 1998.** Human ehrlichiosis: newly recognized infections transmitted by ticks. *Annu. Rev. Med.*, **49**, pp: 201-213.
- 61. DUMLER J. S., et. Al. 2001.** Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and ehrlichia with Neorickettsia, Description of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Inter. Jour. of Syst. And Evol. Microbi.* **51, 6**, pp: 2145-2165.
- 62. DUMLER J. S., TRIGIAN E. R., BAKKEN J. S., AGYERO-ROSENFELD M. E., WORMSER G. P. 2000.** Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **7**, pp: 6-8
- 63. DUMLER J.S., ASANOVICH K.M., BAKKEN J.S. et al., 1995.** Serologic Cross-Reaction among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic Ehrlichia. *Journal of Clinical Microbiology*, **33, 5, 99**, pp: 1098-1103.
- 64. DUMLER J.S., BROUQUI P. 2004.** Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. *Expert Rev. Mol. Diag.*, **4, 4**, pp : 559-569.

- 65. DUMLER J.S., GARCIA-GARCIA J.C. et al. 2005.** Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases*, 11, **12**, pp. 1828-1834.
- 66. DUNNING HOTOPP, J.C., LIN, M., MADUPU, R. et al., 2006.** Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. *PLoS Genetics*, 2, **21**, pp: 0208-0223.
- 67. DZIERZCKA M., KITA J. 2002.** The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part I. Indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Pol. J. Vet. Sci.*, **5**, pp: 71-77.
- 68. EBANI V.V., BERTELLONI F., PIZAUTI P., CERRI D. 2012:** Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Italian horses. *Ann Agric Environ Med*, 19, 237–240.
- 69. EBANI V.V. 2019.** Serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and spotted Fever group *Rickettsia* spp. exposure in horses from central Italy. *Pathogens*, 8, pp:88.
- 70. EBERTS M.D., DINIZ P.P., BEAL M.J. et al., 2011.** Typical and Atypical Manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47, **6**, pp: e86-e94.
- 71. EGENVALL A., FRANZEN P., GUNNARSSON A., et al. 2001.** Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi sensu lato* and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick- exposure factors in Swedish horses. *Prev Vet Med*; **49**, pp:191-208.
- 72. EGENVALL A., LILLIEHOOK I., BJOERSDORFF E., ENGVALL E., KARLSTAM, E., ARTURSSON, K., et al. 2000.** Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. *Vet. Rec.*, **146**, pp: 186-190.
- 73. EMBERS M.E., JACOBS M.B., JOHNSON B.J., PHILIP M.T. 2007.** Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, **8**, pp: 931-936.

- 74. FIRKIG E., BARTHOLD S. W., CHEN M., CHANG C.H. and FLAVELL R.A. 1997.** Protective antibodies develop, and murine Lyme arthritis regresses, in the absence of MHC class II and CD4T cells. *J. Immunol.* **159**, pp: 5982-5686.
- 75. FIRKIG E., FENG W., AVERSA J., SHOEN R.T., FLAVELL R.A. 1998.** Differential Expression of *Borrelia burgdorferi* Genes during Erythema Migrans and Lyme Arthritis. *J. of Inf. Diseases.* **178**, pp:1198-1201.
- 76. FIRKIG E., FENG W., BATHOLD S. W., TELFOR S.R.III, FLAVELL R.A. 2000.** ARTHROPOD- and HOST-SPECIFIC *Borrelia burgdorferi* *bbk32* Expression and the Inhibition of Spirochete Transmission. *J. immunol* **164**, pp: 5344-5351.
- 77. FIVAZ B., H., BOTHA P., CAINRS L., M. 1990.** A putative outbreak of equine Lyme borreliosis in Natal. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **61**, pp: 128-129.
- 78. FOLEY J., CLUEIT S., BROWN R., N., 2008.** Differential exposure to *Anaplasma phagocytophilum* in rodent species in northern California. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, Vol. 8 N. **1**, pp : 49-55.
- 79. FOLEY J., KRAMER V., WEBER D. 2002.** Experimental infection of dusky-footed wood rats. (*Neotoma fuscipes*) with *Ehrlichia phagocytophila sensu lato*. *J. Wildl. Dis.*, **38**, 194-198.
- 80. Foggie, A. 1951.** "Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep." *J.Pathol. Bacteriol.* ,**63**, **1** pp: 1-15.
- 81. FRANZEN P., ASPAN A., EGENVALL A., GUNNARSSON A., ABERG, L., PRINGLE J. 2005.** Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European Strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Vet. Intern. Med.*, **19**, pp: 232-239.
- 82. FRASER C., M. et al. 1997.** Genomic sequence of Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, pp: 580-586.

- 83. FRESNO M., KOPF M., RIVAS, L. 1997.** Cytokines and infectious diseases. *Immunol. Today*, **18**, pp:56-58.
- 84. GE Y., RIKIHISA, Y., 2007.** Identification of Novel Surface Proteins of *Anaplasma phagocytophilum* by Affinity Purification and Proteomics. *J. of Bacteriol.* 189 **21**, pp: 7813-7828.
- 85. GOCKE H. I., ROSS G.& WOLDEHIWET Z. (1999).** Inhibition of phagosome-lysosome fusion in ovine polymorphonuclear leucocyte by (Cytoecetes) phphagocytophila. *J. Comp. Pathol.* **120**, pp:369-381.
- 86. GOETHERT H., K., TELFORD 3rd S., R. 2003.** Enzootic transmission of the human granulotic ehrlichiosis among cottontail rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*,68, 633-637.
- 87. GORDON, W.S., BROWLEE? A & WILSON, D.R. 1940.** Studies in Louping-ill, tick-borne fever and scarpie. Proceeding of the Third International Congress on microbiology, New York, pp:362-363.
- 88. GORDON W.S, BROWNLEE A., WILSON D.R., Mac LEOD.J. 1932** Tick-borne fever. (A hitherto undescribed disease of sheep). *Journal of Comparative Pathology*, **45**, pp : 301-312.
- 89. Greig J. R., Brownlee A., Wilson D. R., Gordon W. S. 1931.** The nature of louping ill. *Vet Rec* 11,pp : 325–333.
- 90. GREENE R. T., HIRSCH D. A., ROTTMAN, P. L. GERIG, T., M. 1991.** Interlaboratory comparaisou of titers of antoby to *Borrelia Burgdorferi* and evaluation of a commercial assay using canine sera. *J. Clin. Microbio.* **29**, pp:16-20.
- 91. GRIBBLE D. H. 1969.** Equine ehrlichiosis . *J. Am. Vet. Med. Assooc.* **155**, pp: 462-469.
- 92. GRUNTAR I., MALOVRH T., et COLL. 2001.** Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. *Acta pathologica, et immunologica scandinavica.* **109**, pp: 383-388.

- 93. HABICHT G, BECK G, BENACH J. 1987.** Lyme disease. *Sci. Am.*, **257**,(1),78-83.
- 94. HAHN C.N., MAYHEW I.G., WHITWELL K.E., et al. 1996.** A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. *Equine Vet. J.* **28**, pp:84-88.
- 95. HERMANN M. 1985:** Colitis X in the horse: 9 cases. *Schweiz Arch Tierheilkd*, **127**, PP: 385–396.
- 96. HUBNER A., YANG X., NOLEN D.M., POPOVA T.G., CABELLO F.C. and NORGDARD M.V. 2001.** Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by RpoN-RpoS regulatory pathway. *PNAS*, **22**, pp: 12724-12729.
- 97. HUDSON J.R. 1950.** The recognition of tick-borne fever as disease of cattle . *British Veterinary journal.* **106**, pp:3-17
- 98. HUMAIR P. GERN L. 2000** *The wild hidden face of lyme borreliosis in europe*, *Microbes and infection*, **2**, pp: 915-922.
- 99. IMAID.M., BARR B.C., DAF, B. et al.** Lyme neuroborreliosis in two horses. *Vet Pathol* **2011**, **48**, pp: 1151-1157.
- 100. IMAI D.M., BARR B.C., DAFT B., BERTON J.J., FENG S., HODZIC E., JOHNSTON, J.M., OLSEN K.J., BARTHOLD S.W. 2011.** Lyme neuroborreliosis in 2 horses. *Veterinary Pathology*, **48**, pp: 1151-1157.
- 101. JAMES F.M., ENGILES J.B., BEECH J. 2010.** Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *J Am Vet Med Ass.*; **237**, pp: 1180-1185.
- 102. JOHNSTON L.K., ENGILES J.B., ACE H., et al. 2016.** Retrospective Evaluation of Horses Diagnosed with Neuroborreliosis on Postmortem Examination : 16 Cases (2004-2015). *J Vet Intern Med*; **30**, pp : 1305-1312.
- 103. JONCOUR G.2003.** Rickettsioses-zoonoses et autres arbo-bacterioses-zoonoses.

Restitution des données (1999-2003). In *Rickettsioses-zoonoses et autre arbo-bacterioses-zoonoses*, 11-12 sept. 2003, Ploufragan. I.S.P.A.I.A. Zoopole Saint-Brieuc, Ploufragan. pp:58-100.

- 104. KAWAHARA et al. 2006.** Novel Genetic Variants of *Anaplasma bovis*, *Anaplasma central*, and a novel *Ehrlichia* sp. In Wild Deer and Ticks on Two Major Island in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2, pp: 11021109.
- 105. KISS T., CADAR D., KRUPACI A.F., BORDEANU A., BRUDASCASI G.F., MIHALCA A.D., MICREAN V., GLIGA L., DUMITRACHE M.O., SPINU M. 2011:** Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in dogs and horses from distinct areas in Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, 11, 1259–1262.
- 106. KLEIN M. B., NELSON C. M., GOODMAN J. L.1997.** Antibiotic susceptibility of the newly cultivated agent of human granulocytic ehrlichiosis: promising activity of quinolones and rifamycins. *Antimicrob. Agents Chemother*, 41, pp: 76-79.
- 107. KLEMPNER M.S., NORING R., EPSTEIN M.P.1995** Binding of Human Plasminogen and Urokinase-Type Plasminogen Activator to the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. of Inf. Diseases*, 171, 5, pp: 1258-1265.
- 108. KRUPKA I., STRAUBINGER R.K. 2010.** Lyme Borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infection with *Borrelia Burgdorferi sensu stricto*. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 40, pp.1103-1119.
- 109. LAM T. T., NGUYEN T. P. K., MONTGOMERY R.R., KANTOR F. S., KIFRIG E., FLAVELL R. A. 1994.** Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Inf., Immu.*, 62, pp: 290-298.
- 110. LANTOS P.M., GRAY G.C. 2018:** Estimated seroprevalence of *Anaplasma* spp. and spotted fever group *Rickettsia* exposure among herders and livestock in Mongolia. *Acta Trop*, 177, 179–185.
- 111. LAPPIN M. R., BREITSCHWERDT E. B., JENSEN W. A. 2004.** Molecular and

serologic evidence of *anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **225**, pp: 893-896.

112. LAUS F., VERONESI F., PASSAMONTI F., PAGGLAG E., CERQUETELLA M., HYATT D., TESEI B., FIORETTI D.P. 2013. Prevalence of tick-borne pathogens in horses from Italy. *J Vet Med Sci*, **75**, pp: 715–720.

113. LAZARUS J.J., KAY M.A., MC CARTER A.L. et al. 2008. Viable *Borrelia burgdorferi* enhances interleukin-10 production and suppresses activation of murine macrophages. *Infect. Immun.* **76**, pp: 1153-1162.

114. LEBLOND A. S., PRADIER et al. 2005. Enquête épidémiologique sur l'anaplasmose équine (*anaplasma phagocytophilum*) dans le sud de la France. *Rev. Sci. Tech.* **24**, **3** pp : 899-908.

115. LEBLOND A. S., PRADIER PITEL P.H., FORTIER G., BOIREAU P., CHADOEUF J. SABATIER P. 2005a. Enquête épidémiologique sur l'anaplasmose équine (*Anaplasma phagocytophilum*) dans le sud de la France. *Rev. Sci. Tech. off. Int. Epiz.* **24**, **3**, pp: 899-908.

116. LEE S.H., YUN S.H., CHOI E., PARK Y.S., LEE S.E., CHO G.J., KWON O.D., KWAKD. 2016. Serological detection of *Borrelia burgdorferi* among horses in Korea. *Korean J.Parasitol*, **54**,pp: 97–101.

117. LEPIDI H., BUNNELL J. E., MARTIN M.E., MADIGAN,J.E., STUEN S., DUMLER J.S. 2000. Comparative pathology and immunology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*,**62**, pp :29-37.

118. LESTER S.J., BREITSCHWERDT et al .2005. *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in dog from Vancouver Island. *Can.Vet. J.* **46**, **9**, pp: 825-827.

119. LEVIN M. L., NICHOLSON W. L., MASSUNG R. F. 2002. Comparaison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Persulcatus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **2**, pp: 125-136.

- 120. LEVY J.A. and DREESEN, D.W. 1992.** Lyme borreliosis in dogs. *Canine practice* 17, 2.
- 121. LIANG F.T., PHILIP M.T. 1999.** Analysis of antibody response to invariable region of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 67, pp: 6702-6707.
- 122. LIEBISCH G., et al.** Isolation of *Ixodes ricinus* transmitted *Borrelia afzelli* from a horse in Germany. *Proceedings of the 18th International Conf. of WAAP, Stresa, Italy.*
- 123. LIN M., DULK-RAS A. P. D., HOOYKAAS P. J. J., RIKIHISA, Y. 2007.** Anaplasma phagocytophilum Anka secreted by type IV secretion system is tyrosine phosphorylated by Abl-1 to facilitate infection. *Cellular Microbiology.* Vol.9. Issue 11.
- 124. LIN Q., RIKIHISA Y., OHASHI N., ZHI, N. 2003** Mechanisms of variable *p44* recombination in *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 71, pp: 5650-5661.
- 125. LITTLE S.E., HEISE S.R., BLAGBURN B.L., CALLISTER S.M., MEAD P.S. 2010.** Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends in Parasitology.* 26, pp:213–218.
- 126. LITTMAN M.P. 2003.** Canine borreliosis. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice.*
- 127. LIZ J.S., ANDERS L., SUMMER, J., W. 2000.** PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, 38, pp: 1002-1007.
- 128. LIZ J.S., SUMMER J.W., PFISTER K. et al. 2002.** PCR Detection and serological Evidence Granulocytic Ehrlichial Infection in Roe Deer (*Caprolus capreolus*) and Chamois (*Rupicapra rupicapra*). *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3), pp.892-897.
- 129. MACLEOD J. GORDON W.S. 1932.** Studies in Louping-ill. (An Encephalomyelitis of sheep). II. Transmission by the sheep tick, *Ixodes ricinus*. *Journal of comparative pathology* 45, 3, pp: 240-256.
- 130. MADIGAN J. E., GRIBBLE D.H. 1987.** Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968-1981). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190, pp: 445-448.

131. MADIGAN J. E., PUSTARELA N. 2000. Ehrlichia diseases. *Vet. Clin. North. Am. Equine. Pract.*, 16, 3, pp: 487-499.
132. MAGNARELLI L.A., ANDERSON J. F., LEVINE H. R., LEVY S. A. 1990. Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats. *J. Am. Vet. Med.* 197, pp: 63-66.
133. MAGNARELLI L.A., IJDO J.W., KIRBY C. STAFFORD III, and FRIKIG E. 1999. Infections of *granulocytic Ehrlichiae* and *Borrelia burgdorferi* in white-tailed deer in Connecticut. *J.of Wildlife diseases* 35, 2, pp: 266-274.
134. MAGNARELLI L.A., IJDO J.W., VAN ANDEL A.E., et al. (2001). Evaluation of a polyvalent enzyme-linked immunosorbant assay incorporating a recombinant p44 antigen for diagnosis of granulotic ehrlichiosis in dogs and horses. *American Journal of Veterinary Research*, 62, 1, pp.29-32.
135. MAGNARELLI L.A., IJDO J.W., VAN ANDEL A.E., et al. 2000. Serologic confirmation of Ehrlichia equi and Borrelia burgdorferi infections in horses from the northeastern United States. *J Am Vet Med Ass*; 217, pp: 1045-1050.
136. MALONEY E.M., LINDENMAYER J.L. 1992. Seroprevalence and clinical signs of Lyme Disease in Cape Cod horses. *Eq. Pract.*, 14, pp: 15–19.
137. MARCONI R.T., SCOTT SAMUELS D., LANDRY R.K., and GARON C.F.1994. Analysis of the Distribution and Molecular Heterogeneity of the ospD Gene among the Lyme Disease Spirochetes: Evidence for Lateral Gene Exchange. *J. of Bact.* pp:4572-4582.
138. MARCUS L.C., PATTERSON M.M.& GILFILLAN R.E.1985. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses. *Am. J. Vet. Res.* 46, pp : 2570-2571.
139. MARTIN H. 1998. *Les tiques chez les ovins en France métropolitaine : rôle pathogène et moyens de lutte. Thèse Med. Vét.*, Nantes, n°5, 100p.
140. MASSUNG R.F., SLATER K. G., (2003). Comparaison of PCR assays for detection of human granulotic ehrlichiosis, Anaplasma phagocytophilum. *J.Clinical Microbiol.* 41, 2, pp: 717-722.

- 141. MAURIN M., BAKKEN J. S. 2003.** Antibiotic susceptibilities of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophilum* strains from various geographic areas in the United States. *Agents Chemother*, **47**, pp: 413-415.
- 142. MORISSETTE E., MASSUNG R.F., FOLEY J.E. et al., 2009.** Diversity of *Anaplasma Phagocytophilum* Strains, USA. *Emerging Infectious Diseases*, **15,6**, pp.928-931.
- 143. MUNDERLOH U.G., LYNCH M.J., HERRON M.J. et al., 2004.** Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Veterinary Microbiology*, **101, 1**, pp: 53-64.
- 144. MAURIZI L., MARIE J.L., AOUN O., COURTIN C., GORSANE S., CHAL D., DAVOUST B. 2010.** Seroprevalence survey of equine Lyme borreliosis in France and in sub-Saharan Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **10**, 535–537.
- 145. NICHOLSON W.L., ALLEN K.E., MAC QUISTON J.H., BREITSCHERDTH E.B., LITTLE S.L. 2010.** The increasing recognition of Rickettsial pathogens in dogs and people. Review: Zoonoses of people and pets in the USA.
- 146. NOLEN-WATSON R. D. D’OENCH S. M., HANELT L. M. SHARKEY L. C., PARADIS M. R. 2004.** Acute recumbency associated with *Anaplasma phagocytophilum* infection in horses. *JAVMA*, **224, 12**, pp: 1964-1966.
- 147. OGDEN N. H., BOWN K., HORROKS Z., WOLDEHIWET Z., and BENNETT M. 1998.** Granulocytic *Ehrlichia* infection in Ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med. Vet. Entomol.* **12**, pp: 423-429.
- 148. OGDEN N., H., CASEY A.N.J., WOLDEHIWET Z., FRENCH N. P., BOWN J. D. W. 2002.** Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep “carriers” to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. *Parasitology*, **124**, pp: 127-136.
- 149. OGDEN N. H., WOLDEHIWET Z., HART A. (1998a).** Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *J. Med. Microbiol.* **47**, pp:475-482.

- 150. OHASHI N., ZHI N., LIN Q., RIKIHIA Y. 2002.** Characterization et transcriptional analysis of genes clusters for a type IV secretion machinery in human granulocytic and monocytic ehrliosis agents. *Infect. Immun.*, **70**, pp: 2128-2138.
- 151. OHNISH J., PIESMAN, J. and DE SILVA 2001.** Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, pp: 670-675.
- 152. OLSEN B. JAENSON G.T.T., NOPPA L., BUNKIS J., BERGSTROM S. 1993.** A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* **362**, **6418**, pp: 340-342.
- 153. OPORTO B., GIL H., BARRAL A., HURTADO A., JUSTE R A., GARCIA-PEREZ, A. L. 2003.** A survey of *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in northern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **990**, pp: 98-102.
- 154. PARK J., CHOI K. S., DUMLER J., S. 2003** Major surface protein2 of *anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect. Immun.* **71**, pp 4018-4025.
- 155. PARK J., KIM, K. J. CHOI K., DENNIS J., GRAB J., DUMLER S., 2004.** *Anaplasma phagocytophilum* AnkA binds to granulocyte DNA and nuclear proteins KCellular Microbiology. Vol **6**, pp: 1462-5822.
- 156. PARKER J.L.& WHITE K.W. 1992.** Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Vet.* **82**, pp.253-274.
- 157. PAROLA P., BEATI L., CAMBON M., BROUQUI P., RAOULT D. 1998.** Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari :ixodidae) in France. *J. Med. Entomol.* **35**, **2** pp : 180-183.
- 158. PASSAMONTI F., VERONESI F., CAPPELLI K., et al. 2015.** Polysynovitis in a horse due to *Borrelia burgdorferi sensu lato* infection--Case study. *Ann Agric Environ Med*; **22**, pp: 247-250.

- 159. PHILIP F. A. M., MURRAY E. D. G., SMITH N. R. 1957.** Bergey's Manual of determinative Bacteriology, 7th ed., the Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp: 980-984.
- 160. POPOV V. L., et al. 1998.** Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med. Microbiol.* **47**, pp: 235-251.
- 161. PORTIER K., FORTIER G., RIFFAUT C., PERRIN R., 2002.** Suspicion de maladie de Lyme chez un poney. *Pratique Vétérinaire Equine*, **34**, pp : 59-67.
- 162. POSTIC D., EDLINGER C., RICHAUD C., GRIMONT F., DUFRESNE Y., PEROLAT P., BARANTON G. & GRIMONT P.A.D.1990.** Two genomic species in *Borrelia burgdoferi*. *Res. Microbiol.* **141**, pp: 465-475.
- 163. POSTIC D., RAS N.M., LANE R.S., HENDSON M., BARANTON G., (1998).** Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissesetti* s.p. Nov. (formely *Borrelia* group DN127). *Journal of clinical Microbiology*, **36**, pp: 3497-3504.
- 164. PRIEST H.L., IRBY N.L., SCHLAFER D.H., et al. 2012.** Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. *Vet Ophthalmol*; **15**, pp :398-405.
- 165. PUSTERLA N., CHAE J., S., KIMSEY R. B., BERGER PUSTERLA J.B, DEROK, E., DUMLER J. S. et al. 2002.** Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* (human granulocytic agent) in horses using experimental infected ticks (*Ixodes scapularis*). *J. Vet. Med.*, **49**, pp: 484-488.
- 166. PUSTERLA N., PUSTERLA et al. 1999.** 'Experimental cross-infections with *Ehrlichia phagocytophilla* and human granulocytic *ehrlichia*-like agent in cows and horse. *Vet. Rec.* **145**, **11**, pp : 311-314.
- 167. PUSTERLA N., PUSTERLA J.B., DEPLAZES, P. et al., 1998.** Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and Canine Granulocytic Ehrlichia Infection in Dogs in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, **12**, pp.3460-3462.

- 168. RAOULT D. 1990.** Diagnostic biologique de la maladie de Lyme. Intérêt du western-blot. *Med. Mal. Infect.*, **20**, pp :163-164.
- 169. Pusterla N., Madigan J.E. 2006.** Initial clinical impressions of the U.C. Davis large animal lift and its use in recumbent equine patients. *Schweiz Arch Tierheilkd*, **148** pp:161–166.
- 170. RAOULT D., BROUQUI P.1998.** Les Rickettsioses. Editions Elsevier, Paris, P.190.
- 171. RAVNIK U., TOZO N., SMRDEL, K. S., ZUPANC T. A., 2011.** Anaplasmosis in dogs: The relation of haematological, biochemical, and clinical alterations to antibody titre and PCR confirmed infection. *Vet. Microbiol.* Vol. **149**, pp.172-176.
- 172. REVEL A.T., TAALAT A.M. and NOGARD M.V. 2002.** DNA microarray analysis of differential gene expression *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **99**, pp: 1562-1567.
- 173. RIKIHISA Y. 1991.** The tribe Ehrlichiae and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, **4**, pp: 286-308.
- 174. RIKIHISA Y., 2010.** Molecular Events Involved in Cellular Invasion by *Ehrlichia chaffensis* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary parasitology*, 167, **2-4**, pp.155-175.
- 175. ROUINA A., BOUCHERMA S., SAIFI H.,** LA maladie de Lyme chez le cheval Projet fin d'études 2012.
- 176. SALEEM S., LIAZ M., FAROOQUI S.H., RASHID M.I., KHAN A., MASUD A., AQUIB A.I., HUSSAIN K., MEHMOOD K., ZHANG H. 2018 :** First molecular evidence of equine granulocytic anaplasmosis in Pakistan. *Acta Trop*, **180**, PP:18–25.
- 177. SALINAS-MELENDZ J.A., GALVAN DE LA GARZA S., RIOJAS-VALDES V.M., WONG GONZALES A., AVALOS-RAMIREZ R. 2001 :** Antibody detection against *Borrelia burgdorferi* in horses located in the suburban areas of Monterrey, Nuevo León. *Rev Latinoam Microbiol* , 43, 161–164.

- 178. SCAIFE H., WOLDEHIWET Z., ANTHONY HART C., EDWADS S.W. 2003.** *Anaplasma phagocytophilum* reduces neutrophil apoptosis in vivo. *Inf. Immun.* **71**, pp: 1995-2001.
- 179. SCHUIJT T.J., HOVIUS J.W., VAN BURGEL N.D., RAMAMOORTHI N., FIKRIG E. and VAN DAM A.P.2008.** The tick Salivary protein Salp15 Inhibits the Killing of Serum-sensitive *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* Isolates. *Infection and Immunity*, pp: 2888-2894.
- 180. SCHWAN T.G., PIESMAN J. 2000.** Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, pp: 382-388.
- 181. SCHVATZ G., EPP T., BURGESS H.J., CHILTON N.B., LOHMANN K.L.: 2015** Comparison between available serologic tests for detecting antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in horses in Canada. *J Vet Diagn Invest*, **27**, 540–546.
- 182. SEARS K.P., DIVERS T.J., Neff R.T., et al. 2012.** A case of *Borrelia*-associated cutaneous pseudolymphoma in a horse. *Vet Dermatol*; **23**, pp: 153-156.
- 183. SIMPSON W., J., BURGDORFER M., E., SCHRUMPF R., H., KARSTEN and SCHWAN T.G. 1991.** Antibody to a 39-kilodalton antigen (P39) as amarker for infection in experimentally and naturally inoculated animals. *J. Clin. Microbiol.* **29**, pp:236-243.
- 184. SKOTARCZAK B., WODECKA B., RYMASZEWSKA A., SAWCZK M., MACIEJEWSKA A., ADAMSKA M., HERMANWSKA-SZPAKOWICZ T., SWIERZBINSKA R. 2005.**Prevalence of DNA and antibodies to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in dogs suspected of borreliosis.*Ann. Agric. Environ.Med.* **12**, **2**, pp: 199-205.
- 185. STEFANCIKOV A., ADAZEK L., PET'KO B., WINIARCZYKI S., DUDINAK V. 2008:** Serological evidence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. *Ann Agric Environ Med* , **15**, 37–43.

- 186. STERRE A. C. MALAWISTA S. E., HARDIN J.A., et al. 1977,** « *Erythema chronicum migrans* and Lyme arthritis, the enlarging clinical spectrum », *Ann. Intern. Med.*, vol.86. **6**, pp: 685-698.
- 187. STERRE A. C., MALAWISTA S. E., SNYDMAN D. R., SHOPE R. E., ANDIMAN, W. A., ROSS M. R. et al. 1977b.** Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in tree Connecticut communities. *Athritis Rheum.*, **20**, pp: 7-17.
- 188. STOENNER H.G., DODD T., & LARSEN, C. 1982.** Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *J. Exp. Med.* **156**, pp: 1297-1311.
- 189. STRAUBINGER R.K. STRAUBINGER A.F., SUMMERS B.A. JACOBSON R.H. 2000.** Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. *J.Infect.Dis.* **181**, pp: 1069-1081.
- 190. STRAUBINGER, R.K., STRAUBINGER, A.F., HARTER, L. ET COLL. 1997.** *Borrelia Burdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. *Infection and immunity* **65**, pp: 1273-85.
- 191. STUEN S. A., CASEY A. N, WLDEHIWET Z., FRENCH N. P. OGDEN N. H. 2006.** Detection by the polymerase chain reaction of *Anaplasma phagocytophilum* in tissues of persistently infected sheep. *J. Comp. Pathol.* **134**, pp: 101-104.
- 192. SUKUMARAN B., MASTONUNZIO J.E., NARASIMHAN S. et al., 2011** *Anaplasma phagocytophilum* AptA modulates Erk1/2 signalling. *Cellular Microbiology*, **13**, **1**, pp: 47-61.
- 193. TSACHEV I., PANTCHEV N., MARUTSOV P., PETROV V., GUNDASHEVA D., BAYMOKOVA M. 2018.:** Serological evidence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. infections in horses from Southeastern Bulgaria. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **18**, 588–594.

- 194. TELFORD S. R., DAWSON J. E., KATAVLOS P., WANER C. K., KOLBERT C. P., PERSING D. H. 1996.** Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **93**, pp : 6209-6214.
- 195. Thrusfield M., Ortega C., De Blas I., Noordhuizen J.P., Frankena K. 2001** Win Episcopo 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec*,148, p : 567–572.
- 196. TRAP D.1990.**La maladie de Lyme : une cause d’arthrite et de boiterie souvent mal connue chez les chevaux. *Prat.Vet. Eq.*, **3**, pp : 49-51.
- 197. VAN DAM A.P., KUIPER H., VOS K., WIDDOJOKUSUMO A., DE JONGH B.M., SPANJAARD S., RAMSELAAR A.C.T., KRAMER M.D. and DANKERT, J. 1993.**Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis.. *Clin. Inf. Dis.* **17**, pp: 708-717.
- 198. VEROENESI F., LAU F., PASSOMONTI F., TESEIB., PIERGILI FIORETTI D., GENCHI C.2012.** Occurrence of *Borrelia lusitaniae* infection in horses. *Vet Microbiol*, **160**, 535–538.
- 199. VON FRICKEN M.E., SUKHBAATAR L., BOLDBAATAR B., NYMADAWA P., WEPPELMANN T.A., BAIGMAA B.O., ANDERSON B.D., RELLER M.E., LANTOS P.M., GRAY G.C. 2018.:** Estimated seroprevalence of *Anaplasma* spp. and spotted fever group *Rickettsia* exposure among herders and livestock in Mongolia. *Acta Trop* 2018, **177**, 179–185.
- 200. WAGNER B., ERB H.N. 2012:** Dogs and horses with antibodies to outer surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011. *Prev Vet Med.*
- 201. WAGNER B., FREER H., ROLLINS A. 2011a.** Development of a multiplex assay for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. *Vet. Immunopathol.*; **144**, pp: 374-381.

- 202. WAGNER B., FREER H., ROLLINS A. 2011a.** Development of a multiplex assay for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. *Vet Immunol Immunopathol*; **144**, pp: 374-381.
- 203. WAGNER B., FREER H., ROLLINS A., ERB H.N., 2011.** A fluorescent bead-based multiplex assay for the simultaneous of antibodies to B. burgdorferi outer surface proteins in canine serum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **140**, pp:190-198.
- 204. WAGNER B., FREER H., ROLLINS A. 2012.** Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. *Clin. Vacc. Immunol.*
- 205. WAGNER B., GLASER A, Bartol J. 2011.** A new sensitive Lyme multiplex assay to confirm neuroborreliosis in horses – a case report. Proceeding of the AAEP's 57th Annual Convention, Nov. pp: 18-22, in San Antonio, Texas.
- 206. WAGNER B., GOODMAN L.B., ROLLINS A., FREER H.S. 2013.** Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. *Equine Vet J*; **45**, pp: 533-537.
- 207. WALKER D. H., DUMLER J. S. 2001.** Human monocytic and granulocytic ehrlichioses: Discovery and diagnosis of emerging tick, borne infections and the critical role of the pathologist. *Journal of Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* .Vol. 121, **6**, pp:785-791.
- 208. WALKER D.H., & DUMLER J.S., 1996.** Emergence of the Ehrlichioses as human health problems. *Emerging Infectious Diseases*, 2, **1**, pp.18-29.
- 209. WALKER, D.H., & DUMLER, J.S., 1997.** Human granulocytic ehrlichiosis: Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **121**, pp: 785-791.

- 210. WANG N., DYKHUIZEN D.E., QUI W., DUNN J.J., BOSLER E.M. & LUFT B.J. 1999.** Genetic diversity of OspC in a local population of *borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics*, 151,1, pp: 15-30.
- 211. WHITE G., PRIOR S. D.1982.** Comparative effects of oral administration of thrimethoprim/sulphadiazine or tetracycline on the fecal flora of horses. *Vet. Rec.*, **111**, pp: 316-318.
- 212. WOESE, C., R., 1987.** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, pp: 221-271.
- 213. WOLDEHIWET Z., SCOTT G. R.1982.** Stages in the development of *cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *J. of comp. patho.* 92, **3** , pp.469-474.
- 214. YOSHIE K., KIM H.Y., MOTT J. & RIKIHISA Y.,2000.** Intracellular Infection by the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent Inhibits Human Neutrophil Apoptosis. *Infection and Immunity*, 68, 3), pp.1125-1133.

Liste des sites consultés

Borréliose de Lyme, Merial (en ligne). Disponible sur <http://veto.merial.com>

CBIP-VET: Detail [Internet]. [cité 2 Juillet 2020]. Disponible sur: <https://www.vetcompendium.be/fr>

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

ARTICLE PUBLIÉ

Seroprevalence of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in horses (*Equus caballus*) from northern Algeria

Abdelouahab Laamari¹, Naouelle Azzag¹, Safia Tennah¹, Salima-Yamina Derdour¹, Bernard China², Ryhan Bouabdallah¹, Farida Ghalmi¹

¹Research Laboratory Management of Local Animal Resources,
Higher National Veterinary School, El Alia, Oued Smar, 1615 Algiers, Algeria ²Sciensano,
Quality of Laboratories, B-1050 Brussels, Belgium
f.ghalmi@ensv.dz

Received: December 27, 2019 Accepted: June 25, 2020

Abstract

Introduction: Horses (*Equus caballus*) are susceptible to tick-borne diseases. Two of them, Lyme borreliosis due to *Borrelia burgdorferi* and granulocytic anaplasmosis due to *Anaplasma phagocytophilum* were investigated in Algerian horses. The diseases have been less extensively studied in horses and results pertinent to Algeria have not been published. **Material and Methods:** Blood samples were obtained from 128 horses. IgG antibodies directed against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* were detected by an indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and ELISA. The potential effects of age, gender, breed, and health status on seropositivity were also evaluated. **Results:** Using IFAT, 28 (21.8%) and 25 (19.5%) animals were positive for *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum*, respectively. Using ELISA, 19 (14.8%) and 33 (25.9%) animals were positive for these bacteria. **Conclusion:** The study shows that horses in Algeria are exposed or co-exposed to tick-transmitted zoonotic bacterial species.

Keywords: horses, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, seroprevalence, co-infection.

Introduction

Equine granulocytic anaplasmosis and Lyme borreliosis have long been recognised as multi-systemic tick-borne diseases affecting several species of wild and domesticated mammals, including carnivores, ruminants, and equines. These zoonotic agents have also been reported in dogs in northern Algeria (2). *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia equi*) is an intracellular bacterium invading the granulocytes of horses, where it may induce a febrile disease called equine granulocytic anaplasmosis. The disease is characterised by a wide range of clinical signs including fever, lethargy, limb oedema, petechiae, reluctance to move, thrombocytopenia, leukopenia, and anaemia (23, 28). Granulocytic ehrlichiosis in horses is a seasonal disease closely associated with the activity of the tick vectors from mid-spring to the end of summer. Horses (*Equus caballus*) from endemic areas have a high seroprevalence of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*,

corresponding to the prevailing distribution of the ticks of the *Ixodes* genus. The disease has predominantly been reported in Europe. Clinical cases have been reported in Germany (7), Switzerland (15), Sweden (13), Great Britain (19), France (4), and Italy (32). In North Africa, a recent study (3) in Tunisia showed a seropositivity of 16.3% to *A. phagocytophilum* in horses.

Lyme disease, or borreliosis, is a bacterial illness caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi*. The infection in horses is caused by attachment and prolonged feeding of infected adult *Ixodes* spp. ticks. The clinical signs most often associated with equine Lyme disease include stiffness and lameness in more than one limb, muscle wasting, hyperaesthesia, lethargy, and polysynovitis (8, 26). Pain over the thoracolumbar area has been reported in a few horses with high serum antibody titres (16). In several studies conducted on horse populations in endemic areas, high seroprevalence was observed and in Europe it ranged from 0% to 68%

(9). In North America, a large range of seroprevalence was also observed: 63% in Wisconsin, 0.2% in Texas or 84% in Connecticut (9). Other species of *Borrelia* (e.g. *B. parkeri*) are also involved in equine disease, transmitting tick-borne relapsing fever which causes abortion (14). The recommended diagnostic test to detect antibodies against *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* in horses is the indirect fluorescent antibody assay (IFA). *B. burgdorferi* antibodies in horses may be detected by ELISA and confirmed by Western blot (17). The point-of-care SNAP 4Dx ELISA (IDEXX Laboratories, Westbrook, MN, USA) is authorised for the detection of antibodies against the *A. phagocytophilum* P44 antigen and the *B. burgdorferi* C6 antigen in dogs (17). As far as we know, the occurrence of these pathogens in horses from Algeria has never been investigated by serological methods. Therefore, using ELISA and an indirect fluorescent antibody method, the aim of the present study was to evaluate the seroprevalence of *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum* and the possible association of these bacteria in Algerian horses with risk factors and health status.

Material and Methods

Equine samples. A cross-sectional study was conducted from August 2015 to September 2016 on 128 horses of the Algerian Republican Guard. The sampled horses included in the study were 13 Arab-Barbs, 100 Arabians, and 15 Barbs aged from 1 to 25 years. Two groups of horses were distinguished. The first group comprised healthy horses admitted to the Republican Guard veterinary clinic for a vaccination (n = 108). The second group included horses presenting various clinical signs (n = 20) such as poor performance, lameness, oligoarthritis, fever, inappetence, colic or ophthalmological symptoms, and neurological disorders (Table 1). Practitioners in the veterinary clinics answered questions about the health status of the horses. Breed and age were also noted besides health status. Blood samples were drawn from the jugular vein into sterile dry tubes and kept at 4°C for 12 to 24 h, and then the sera were frozen at -20°C. No

ectoparasites were collected from the sampled horses.

Serological testing

Immunofluorescence assay. Immunofluorescence antibody assays were performed for *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi sensu lato* using commercial slides (MegaScreen, Megacor Diagnostik, Hoerbranz, Austria). Rabbit anti-horse IgG conjugate was used (Jackson Immunoresearch, Ely, UK). Sera were initially screened at a dilution of 1:50 in phosphate-buffered saline and all seropositive samples were re-diluted from 1:100 up to 1:1,600 in order to determine the antibody titres. The significant antibody titres were 1/50 for *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* as stated by the manufacturer. Slides were evaluated using a fluorescence microscope at 400× magnification, comparing each sample to the visual intensity and appearance of the bacteria fluorescence pattern seen in the positive and negative controls included in the kit. **ELISA.** For *B. burgdorferi* serology, a commercial ELISA developed and validated (9) for the examination of dog or horse sera (*Borrelia burgdorferi* Veterinary ELISA, Virotech diagnostics, Rüsselheim, Germany) was used according to the recommendations of the producer.

Table 1. Characteristics of the study group considering gender, age, and breed of sampled horses

Variable	Healthy group (n = 108)	Affected group (n = 20)
Gender		
Male	62	14
Female	46	6
Age (years)		
1–11	54	14
12–16	33	3
17–25	21	3
Breed		
Arabian	85	15
Barb	13	2
Arab–Barb	10	3

For the detection of IgG antibodies against *A. phagocytophilum*, a commercial ELISA (*Ehrlichia equi* IgG Antibody Kit, Helica Biosystems, Inc., Santa Ana, CA, USA) was used according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis. Statistical differences in the proportions of antibody levels were compared using the chi-squared (Yates corrected) or Fisher's exact test. Also, the agreement between ELISA and IFAT was assessed by the McNemar test and calculation of the value of κ . Its value was interpreted as meaning no consistency where $\kappa \leq 0.20$, poor agreement in the range of $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$, moderate agreement for $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$, good agreement at $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$, and very good agreement in the case of $\kappa > 0.80$ (22).

Relative sensitivity = (number of positive results for both methods/number of positive results for the reference method) \times 100. Relative specificity = (number of negative results for both methods/number of negative results for the reference method) \times 100.

The software used was Win episcopo 2.0 (36), MedCalc (MedCalc Software Ltd., Ostend, Belgium) and XL stat (Addinsoft, Paris, France). The level of statistical significance assigned was 5%.

Results

Serological evaluation of sera by IFAT and ELISA. Out of 128 serum samples, 28 (21.9%) were positive for *B. burgdorferi* by IFAT and 19 (14.8%) by ELISA (Table 2). Nevertheless, there was no significant difference in the seroprevalence calculated by the two methods ($P > 0.05$). In the same way, 25 sera (19.53%) were positive for *A. phagocytophilum* by IFAT and 33 (25.9%) by ELISA. But once again, the prevalence was not significantly different ($P > 0.05$) in regard to the method used (Table 2). The incidence of double infection was investigated. By IFAT, 10 sera were positive for both pathogens. It implies that 15 sera were positive for *A. phagocytophilum* only and 18 for *B. burgdorferi* only. By ELISA, 13 sera were positive for both pathogens. This in turn implies that 20 sera were positive for *A. phagocytophilum* only and 6 were positive for *B. burgdorferi* only (Table 2). Among horses with clinical signs, nine were positive for *A. phagocytophilum* antibodies by IFAT: five with fever and inappetence, two with poor

performance, one with ophthalmological symptoms, and one with a neurological disorder. Among eleven horses positive in IFAT for *B. burgdorferi* antibodies and presenting clinical signs, three were performing poorly, three had ophthalmological symptoms, one fever and inappetence, two oligoarthritis, and two neurological disorders.

Risk factors. The association between the seroprevalence and several factors was investigated using the chi-squared (Yates corrected) or Fisher's exact test (Table 3).

For *A. phagocytophilum*, age was a risk factor by both methods. The younger animals (1–11 years) were more frequently positive than the older ones. Gender was not a risk factor by IFAT but was by ELISA, where the females were more frequently positive. Breed was not a risk factor but the presence of clinical signs was, since in the affected group of animals, the prevalence was higher than in healthy animals.

For *B. burgdorferi*, risk was associated with age when the method was IFAT, with a higher prevalence in the youngest animals (1–11 years), but not when the method was ELISA. Gender was not material to risk for either method. IFAT testing showed varying predisposition by breed but ELISA testing did not. The presence of clinical signs is a significant associative factor since the prevalence is higher in animals which are not healthy.

Comparison of methods. For *B. burgdorferi*, the percentage of agreement between ELISA and IFAT was 86.7% (111/128) and the κ index was 0.56, corresponding to moderate agreement, while for *A. phagocytophilum*, the percentage of agreement was 85.9% (110/128) and the κ index was 0.6, corresponding to substantial agreement (111/128). The McNemar test indicated that the disagreement between the methods could not be attributed to chance ($P < 0.01$) (Table 4).

Table 2. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* by ELISA and IFAT

Pathogen	IFAT (n = 128)		ELISA (n = 128)	
	Positive	Seroprevalence (%) (95% CI)	Positive	Seroprevalence (%) (95% CI)
<i>B. burgdorferi</i> only	18	14.1 (9.1–21.1) ^{&}	6	4.7 (2.2–9.9) ^{&}
<i>A. phagocytophilum</i> only	15	11.7 (7.2–18.4) [£]	20	15.6 (10.4–22.9) [£]
<i>A. phagocytophilum</i> and <i>B. burgdorferi</i> (co-infection)	10	7.8 (4.3–13.8) [£]	13	10.2 (6.0–16.7) [£]
<i>B. burgdorferi</i> (total)	28	21.87 (13.79–28.20) [*]	19	14.84 (7.86–20.13) [*]
<i>A. phagocytophilum</i> (total)	25	19.53 (12.06–25.93) [*]	33	25.87 (17.34–32.65) [*]

* – The prevalence was not significantly different between methods ($P > 0.05$)

£ – The prevalence was not significantly different by IFAT and ELISA ($P > 0.05$)

& – The prevalence was significantly different by IFAT and ELISA ($P < 0.05$)

Table 3. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* regarding breed, sex, age, and health status

Variable	<i>A. phagocytophilum</i>		<i>B. burgdorferi</i>	
	IFAT + (%; 95% CI)	ELISA + (%; 95% CI)	IFAT + (%; 95% CI)	ELISA + (%; 95% CI)
Age (years)				
1–11 (n = 54)	22 (40.7; 28.7–54.0)	26 (48.1; 35.4–61.2)	22 (40.7; 28.7–54.0)	10 (18.5; 10.4–30.9)
12–16 (n = 33)	3 (9.1; 3.1–23.6)	4 (12.1; 4.8–27.3)	3 (9.1; 3.1–23.6)	6 (18.2; 8.6–34.4)
17–25 (n = 21)	0 (0)	3 (14.3; 5.0–34.6)	3 (14.3; 5.0–34.6)	3 (14.3; 5.0–34.6)
P value	<0.01 SS	<0.01 SS	<0.01 SS	0.9 NS
Gender				
Male (n = 62)	12 (19.4; 11.4–30.8)	9 (14.5; 7.8–25.4)	15 (24.2; 15.2–36.2)	14 (22.6; 13.9–34.4)
Female (n = 46)	13 (28.3; 17.3–42.6)	24 (52.2; 38.1–65.9)	13 (28.3; 17.3–42.6)	5 (10.9; 4.7–23.0)
P value	0.3 NS	<0.01 SS	0.6 NS	0.1 NS
Breed				
Arabian (n = 85)	20 (23.5; 15.8–33.6)	22 (25.9; 17.8–36.1)	20 (23.5; 15.8–33.6)	14 (16.5; 10.1–25.8)
Barb (n = 15)	1 (7.7; 1.4–33.3)	5 (38.5; 17.7–64.5)	1 (7.7; 1.4–33.3)	1 (7.7; 1.4–33.3)
Arab–Barb (n = 10)	4 (40; 16.8–68.7)	6 (60; 31.2–83.2)	7 (70; 39.7–89.2)	4 (40; 16.8–68.7)
P value	0.2 NS	0.07 NS	<0.01 SS	0.1 NS
Clinical signs				
Yes (n = 20)	9 (45; 25.8–65.8)	10 (50; 29.9–70.1)	11 (55; 34.2–74.2)	7 (35; 18.1–56.7)
No (n = 108)	16 (14.8; 9.3–22.7)	23 (21.3; 14.6–29.9)	17 (15.7; 10.1–23.8)	12 (11.1; 6.5–18.4)

No (n = 108)

P value	<0.01 SS	<0.05 S	<0.01 SS	<0.05 S
---------	----------	---------	----------	---------

Table 4. Agreement analysis between IFAT and ELISA tests

<i>B. burgdorferi</i>		IFAT			Statistics
Sera		Positive	Negative	Total	$\kappa = 0.56$
ELISA	Positive	15	4	19	McNemar P < 0.01 SS
	Negative	13	96	109	% agreement = 86.7
	Total	28	100	128	Relative sensitivity = 53.6%
					Relative specificity = 96%
<i>A. phagocytophilum</i>		IFAT			Statistics
Sera		Positive	Negative	Total	$\kappa = 0.61$
ELISA	Positive	20	13	33	McNemar P < 0.01 SS
	Negative	5	90	95	% agreement = 85.9
	Total	25	103	128	Relative sensitivity = 80%
					Relative specificity = 87.4%

Table 5. Seroprevalence of *A. phagocytophilum* around the world

Country	Year	Technique	n	Positive	Prevalence (%)	Lower limit	Upper limit	Reference
Algeria	2018	IFAT	128	25	19.53	12.66	26.40	this study
Bulgaria	2018	ELISA	155	31	20.00	13.70	26.30	37
Canada	2015	SNAP 4Dx	376	2	5.31	0	1.27	33
Czech Republic	2011	IFAT	92	67	72.8	63.74	81.91	30
Denmark	2010	SNAP 4Dx	390	87	22.31	18.18	26.44	30
France	2005	ELISA	424	48	11.32	8.30	14.33	30
France	2009	ELISA	408	55	13.48	10,17	16.79	30
Guatemala	2005	IFAT	74	10	13.51	5.72	21.30	30
Italy	2003	IFAT	561	2	3.56	0	8.50	30
Italy	2008	IFAT	793	134	16.90	14.29	19.51	30

Italy	2008	IFAT	154	12	7.79	3.56	12.03	30
Italy	2010	IFAT	135	23	17.04	10.69	23.38	30
Italy	2019	IFAT	479	109	22.76	19.00	26.51	12
Mongolia	2018	IFAT	216	91	42.13	35.54	48.71	39
Tunisia	2014	IFAT	343	56	16.33	12.41	20.24	3

Table 6. Seroprevalence of *B. burgdorferi* in the world

Country	Year	Method	n	Positive	Prevalence (%)	Lower limit	Upper limit	Reference
Algeria	2019	IFAT	128	28	21.88	14.71	29.04	this study
Brazil	2018	ELISA	367	214	58.31	53.27	63.36	34
Canada	2015	SNAP 4Dx	376	6	1.60	0.033	2.86	33
France	2010	SNAP 4Dx	408	134	32.84	28.29	37.40	25
French Guiana	2010	SNAP 4Dx	49	0	0	0	0	25
Italy	2013	IFAT	300	21	7.00	4.11	9.89	20
Italy	2012	SNAP 4Dx	98	15	15.31	8.18	22.43	38
Italy	2012	IFAT	386	94	24.35	20.07	28.63	11
Korea	2016	ELISA	727	40	5.50	3.84	7.16	22
Mexico	2001	IFAT	100	34	34.00	24.72	43.28	31
Poland	2008	ELISA	395	101	25.57	21.27	29.87	35
Romania	2011	ELISA	260	31	11.92	7.98	15.86	18
Sub-Saharan Africa	2010	SNAP 4Dx	113	0	0	0	0	25
Turkey	2008	ELISA	300	18	6.00	3.31	8.69	5
USA	2012	ELISA and WB	2100	175	8.33	7.15	9.52	40

Discussion

Horses are large warm-blooded animals commonly exposed to ticks. They can be directly affected by tickborne infections or can play the role of reservoir

for further transmission. The aetiological agent of one such infection, *Anaplasma phagocytophilum*, has medical as well as veterinary importance because of its zoonotic nature. The main tick-borne diseases in horses are equine piroplasmosis caused

by *Babesia caballi* and *Theileria equi*, Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi*, and equine granulocytic anaplasmosis caused by *Anaplasma phagocytophilum* (30). The last of these has symptoms of loss of appetite, lethargy, haemorrhages, and lameness (29).

Serological testing using IFAT revealed a total of 25 (19.5%) horses out of the 128 analysed to be seropositive for *A. phagocytophilum*. The seroprevalence of the microbe obtained in this study (19.5%) confirms the presence of this tick-borne pathogen in Algeria (2) and suggests its possible association, in terms of endemic patterns, with *B. burgdorferi sensu lato*. This seroprevalence also coincides with data previously reported in other countries, including France, Spain, and Sweden (1, 13, 21) and coheres with the endemicity of equine granulocytic anaplasmosis reported in different parts of the world. The seroprevalence of *A. phagocytophilum* ranged from 0.3% to 73% (29). Table 5 shows the observed prevalence in this study in comparison with other serological studies from around the world. Our study returned a percentage approximating the average of those studies. The most interesting comparison can be made with the study from neighbouring Tunisia, where the seroprevalence of 16.53% (56/343) was not significantly different to our data ($P = 0.4$) (3). The differences in prevalence in the studies could be related to the samples, which may have been selected at random or with more focus on animals with symptoms. Nevertheless, horses in stables from which cases had previously been reported tended to have higher average titres (29).

IFAT was used as the reference method for serology, but ELISA gave similar results with no significant differences. ELISA is an easier technique that can therefore be recommended for *A. phagocytophilum* serology. Since serology is an indirect diagnostic method attesting contact between an animal's immune system and the pathogen, a more direct method such as PCR is recommended in a clinical context (29).

The differences between seroprevalence values described in this work may be explained by inconstancy in the factors which determined them,

including the horse populations surveyed and, more impactfully, the frequency of exposure to the vector *Ixodes ricinus*.

The seroprevalence rate for *B. burgdorferi* reported in this study is 21.9%. The recent seroprevalence studies showed a prevalence ranging from 0% (Sub-Saharan Africa and French Guiana) to 58% (Brazil). Results of other studies from around the world are presented in Table. 6.

The comparison of the two serological methods indicated that IFAT gave more positive samples than ELISA. Thirteen sera were positive by IFAT and negative using ELISA. Since IFAT was considered the reference method, it means that in our hands ELISA showed low sensitivity (53.6%). The ELISA used is a validated commercial kit (9). Two possible explanations exist: either the ELISA method lacks sensitivity or the IFAT lacks specificity. The examination of further serum dilutions in IFAT indicated that only 16 out of 28 positive sera were still positive at 1:100, 9 at 1:200, and 3 at 1:400. Therefore, if the comparison between IFAT and ELISA is based on 1:100 serum dilution in IFAT rather than 1:50, the agreement between the methods is much better. The general agreement is 96.1%, the relative sensitivity is 93.75%, and the relative specificity is 96.4%. The Cohen's κ coefficient is 0.83, corresponding to an almost perfect agreement.

The study of risk factors surprisingly indicated a higher prevalence both for *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* in young animals in comparison with older animals. It is in contradiction to other studies indicating that older animals were more frequently infected than young animals (15, 20). There is no difference in prevalence according to gender, with data from this study being confirmed by the literature (18, 25). Breed is not a risk factor for *A. phagocytophilum* prevalence, but for *B. burgdorferi*, crossbred animals were more susceptible to being infected. Nevertheless, the small number of animals in several subgroups renders the statistics difficult to interpret due to the large range of values (see confidence intervals). Finally, as expected, the animals presenting

symptoms were more frequently positive for both *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* than the healthy animals. One major risk factor that was not investigated in this work is the presence of ticks on experimental horses (13). Indeed, in our study, we were unable to identify ticks on the sampled animals. Nevertheless, discussion with stablehands indicated that ticks were sometimes observed on the animals in their charge. It is of course coherent with our serological results. Moreover, the horses had been preventively treated with anti-parasitic drugs (organophosphate insecticides), which explains the absence of ticks during the sampling (personal communication).

One of the aims of our study was to investigate if there are any associations between the presence of serum antibodies against either of these two bacteria and clinical signs of the disease. In the healthy group (n = 108), 16% were seropositive for *A. phagocytophilum* and 17% for *B. burgdorferi sensu lato*. The proportions that were seropositive in the group of horses that were not considered healthy were statistically significantly

different from the healthy horses and were similar for both agents. Therefore, we have shown that antibody titres to *B. burgdorferi* or *A. phagocytophilum* were associated with clinical problems. Our observations are similar to those described by Büscher *et al* (7), which were that some horses seropositive for *B. burgdorferi* showed lameness and swollen joints. In another study, an association between *B. burgdorferi sensu lato* serological status and myalgia in horses was observed (24). Regarding *A. phagocytophilum*, only one study reported that horses presenting clinical signs showed antibody titres to the bacterium; 6 out of 12 of these animals tested positive in IFAT and received tetracycline treatment for suspected granulocytic ehrlichiosis disease (personal communication). In conclusion, antibodies against *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi sensu lato*, and both pathogens (coinfection) were found in horses from northern Algeria. Whether a co-exposure to pathogens would also increase clinical signs in horses needs further investigation. From the technical point of view, even if IFAT remains the

reference method, ELISA gave similar results and is easier to use.

Conflict of Interests Statement: The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Financial Disclosure Statement: This study was supported by the Directorate General of Scientific Research and Technological Development (Research Laboratory Management of Local Animal Resources).

Animal Rights Statements: The experiments on animals were conducted in accordance with local Ethical Committee laws and regulations as regards care and use of experimental animals.

References

1. Amusatogui I, Sainz A., Tesouro M.A.: Serological evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in livestock in northwestern Spain. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1078, 487–490.
2. Azzag N., Petit E., Gandoïn C., Bouillin C., Ghalmi F., Haddad N., Boulouis H.J.: Prevalence of select vector-borne pathogens in stray and client-owned dogs from Algiers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2015, 38, 1–7.
3. Bensaid M., Belkahia H., Sayahi L., Aloui M., Jemli M.H., Hadj Mohamed B., Sassi L., Darghouth M.A., Djaïem A.A., Bayouh M., Messadi L.: Première étude sérologique de la prévalence d'*Anaplasma phagocytophilum* chez le dromadaire (*Camelus dromedarius*) en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot* 2014, 107, 1–6.
4. Bermann F., Davoust B., Fournier P.E., Brisou-Lapointe A.V., Brouqui P.: *Ehrlichia equi* (*Anaplasma phagocytophila*) infection in an adult horse in France. *Vet Rec* 2002, 150, 787–788.
5. Bhide M., Yilmaz Z., Golcu E., Torun S., Mikula I.: Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. *Ann Agric Environ Med* 2008, 15, 85–90.
6. Burgess B.: British Columbia. Lyme disease in horses. *Can Vet J* 1988, 29, 393–394.
7. Büscher G., Gandras R., Apel G., Friedhoff K.T.: The 1st case of ehrlichiosis in a horse in Germany. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1984, 91, 408–409.
8. Devilbiss B., Mohammed H.O., Divers T.J.: Perception of equine practitioners regarding the occurrence of selected equine neurologic diseases in the Northeast over a 10-year period. *J Equine Vet Sci* 2009, 29, 237–246.
9. Durrani A.Z., Goyal S.M., Kamal N.: Retrospective study on seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in horses in Minnesota. *T Equine Vet Sci* 2011, 31, 427–429.

10. Dzierzecka M., Kita J.: The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part I. Indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Pol J Vet Sci* 2002, 5, 71–77.
11. Ebani V.V., Bertelloni F., Pinzauti P., Cerri D.: Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Italian horses. *Ann Agric Environ Med* 2012, 19, 237–240.
12. Ebani V.V.: Serological evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and spotted fever group *Rickettsia* spp. exposure in horses from central Italy. *Pathogens* 2019, 8, 88.
13. Egenvall A., Franzén P., Gunnarsson A., Engvall E.O., Vågsholm I., Wikström U.B., Artursson K.: Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi sensu lato* and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. *Prev Vet Med* 2001, 49, 191–208.
14. Elelu N.: Tick-borne relapsing fever as a potential veterinary medical problem. *Vet Med Sci* 2018, 4, 271–279.
15. Hermann M.: Colitis X in the horse: 9 cases. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1985, 127, 385–396.
16. Imai D.M., Barr B.C., Daft B., Bertone J.J., Feng S., Hodzic E., Johnston J.M., Olsen K.J., Barthold S.W.: Lyme neuroborreliosis in 2 horses. *Vet Pathol* 2011, 48, 1151–1157.
17. Johnson A.L., Divers T.J., Chang Y.F.: Validation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. *J Vet Diagn Invest* 2008, 20, 321–324.
18. Kiss T., Cadar D., Krupaci A.F., Bordeanu A., Brudașcă G.F., Mihalca A.D., Mircean V., Gliga L., Dumitrache M.O., Spînu M.: Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi sensu lato* in dogs and horses from distinct areas in Romania. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011, 11, 1259–1262.
19. Korbutiak E., Schneiders D.: Equine granulocytic ehrlichiosis in the UK. *Vet Rec* 1994, 135, 387–388.
20. Laus F., Veronesi F., Passamonti F., Paggi E., Cerquetella M., Hyatt D., Tesi B., Fioretti D.P.: Prevalence of tick borne pathogens in horses from Italy. *J Vet Med Sci* 2013, 75, 715–720.
21. Leblond A., Pradier S., Pitel P.H., Fortier G., Boireau P., Chadoeuf J., Sabatier P.: Enquête épidémiologique sur l'anaplasmose équine (*Anaplasma phagocytophilum*) dans le Sud de la France. *Rev Sci Tech* 2005, 24, 899–908.
22. Lee S.H., Yun S.H., Choi E., Park Y.S., Lee S.E., Cho G.J., Kwon O.D., Kwak D.: Serological detection of *Borrelia burgdorferi* among horses in Korea. *Korean J Parasitol* 2016, 54, 97–101.
23. Madigan J.E., Gribble D.: Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968–1981). *J Am Vet Med Assoc* 1987, 190, 445–448.
24. Maloney E.M., Lindenmayer J.L.: Seroprevalence and clinical signs of Lyme disease in Cape Cod horses. *Eq Pract* 1992, 14, 15–19.
25. Maurizi L., Marié J.L., Aoun O., Courtin C., Gorsane S., Chal D., Davoust B.: Seroprevalence survey of equine Lyme borreliosis in France and in sub-Saharan Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, 10, 535–537.
26. Passamonti F., Veronesi F., Cappelli K., Capomaccio S., Reginato A., Miglio A., Vardi D.M., Stefanetti V., Coletti M., Bazzica C., Pepe M.: Polysynovitis in a horse due to *Borrelia burgdorferi sensu lato* infection – Case study. *Ann Agric Environ Med* 2015, 22, 247–250.
27. Petrie A., Watson P.: *Statistics for Veterinary and Animal Science*, Wiley Blackwell, Chichester, 2013.
28. Pusterla N., Madigan J.E.: Initial clinical impressions of the U.C. Davis large animal lift and its use in recumbent equine patients. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2006, 148, 161–166.
29. Saleem S., Ijaz M., Farooqi S.H., Ghaffar A., Ali A., Iqbal K., Mehmood K., Zhang H.: Equine granulocytic anaplasmosis 28 years later. *Microb Pathog* 2018, 119, 1–8.
30. Saleem S., Ijaz M., Farooqi S.H., Rashid M.I., Khan A., Masud A., Aqib A.L., Hussain K., Mehmood K., Zhang H.: First molecular evidence of equine granulocytic anaplasmosis in Pakistan. *Acta Trop* 2018, 180, 18–25.
31. Salinas-Méendez J.A., Galván de la Garza S., Riojas-Valdés V.M.,

- Monterrey, Nuevo León. Rev Latinoam Microbiol 2001, 43, 161–164.
32. Scarpulla M., Caristo M.E., Macri G., Lillini E.: Equine ehrlichiosis in Italy. Ann N Y Acad Sci 2003, 990, 259–263.
 33. Schvartz G., Epp T., Burgess H.J., Chilton N.B., Lohmann K.L.: Comparison between available serologic tests for detecting antibodies against *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in horses in Canada. J Vet Diagn Invest 2015, 27, 540–546.
 34. Socoloski S.N.G., de Castro B.G., Cordeiro M.D., da Fonseca A.H., Cepeda M.B., Nicolino R.R., Lopes L.B.: Epidemiological investigation of *Borrelia burgdorferi* in horses in the municipality of Sinop-MT, Brazil. Trop Anim Health Prod 2018, 50, 831–836.
 35. Stefanciková A., Adaszek L., Pet'ko B., Winiarczyk S., Dudinák V.: Serological evidence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. Ann Agric Environ Med 2008, 15, 37–43.
 36. Thrusfield M., Ortega C., De Blas I, Noordhuizen J.P., Frankena K.: Win Episcopy 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. Vet Rec 2001, 148, 567–572
 37. Tsachev I., Pantchev N., Marutsov P., Petrov V., Gundasheva D., Baymakova M.: Serological evidence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. infections in horses from Southeastern Bulgaria. Vector Borne Zoonotic Dis 2018, 18, 588–594.
 38. Veronesi F., Laus F., Passamonti F., Tesi B., Piergili Fioretti D., Genchi C.: Occurrence of *Borrelia lusitaniae* infection in horses. Vet Microbiol 2012, 160, 535–538.
 39. von Fricken M.E., Sukhbaatar L., Boldbaatar B., Nymadawa P., Weppelmann T.A., Baigalmaa B.O., Anderson B.D., Reller M.E., Lantos P.M., Gray G.C.: Estimated seroprevalence of *Anaplasma* pp. and spotted fever group *Rickettsia* exposure among herders and livestock in Mongolia. Acta Trop 2018, 177, 179–185.
 40. Wagner B., Erb H.N.: Dogs and horses with antibodies to outer surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011. Prev Vet Med 2012, 107, 275–279

