MASTER 2
«Gestion Intégrée des Zoonoses et des Maladies Animales Tropicales »

RAPPORT DE STAGE

Identification des facteurs de risque de dirofilariose, d'ehrlichiose et d'anaplasmose dans les populations de chiens de l'île de la Réunion

---

Présenté par
ROGER-CALLEWAERT Juliette

Stage réalisé du 6 Mars 2023 au 18 Août 2023
Au **Cirad de Saint-Denis**, La Réunion, hébergé au CYROI, La Réunion

Sous la direction de
SQUARZONI-DIAW Cécile – Vétérinaire épidémiologiste

Financé par le FEADER et la Préfecture de la Réunion

Soutenu le 24 Juin 2025

Remerciements

A Monsieur le Docteur Timothée VERGNE,

Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse;

Maladies animales réglementées, santé publique vétérinaire

Qui m'a accompagnée et grandement aidée dans la rédaction de ce mémoire,

Mes plus sincères remerciements pour votre disponibilité et votre gentillesse.

A l'équipe de l'UMR ASTRE du CIRAD de Saint-Denis, La Réunion

A Madame la Docteure Cécile SQUARZONI,

Vétérinaire épidémiologiste, coordinatrice du Partenariat Régional de recherche One Health

Qui m'a permis d'intégrer ce projet de recherche,

Sincères remerciements pour cette opportunité et pour votre accompagnement.

A Madame la Docteure Katerina ALBRECHTOVA,

Vétérinaire épidémiologiste

Qui m'a co-encadrée avec bienveillance et été d'une aide précieuse,

Mille mercis.

A tous les autres membres de l'équipe,

Sans qui ce travail n'aurait pas été possible,

Merci de m'avoir tant aidée et soutenue.

Table des matières

Liste des abréviations....3
Liste des figures....4
Liste des tableaux....5
Liste des annexes....5
I. Introduction....6
1. Situation de l'errance canine à la Réunion....6
1.1. Dynamique démographique de la population canine et définition des sous populations....6
1.2. Principaux enjeux liés à l'errance et à la divagation animale....7
2. Maladies vectorielles étudiées chez les chiens de La Réunion....7
2.1. Dirofilaria immitis....8
a. Généralités....8
b. Etiologie et pathogénie....8
c. Hôtes et cycle de transmission....8
d. Situation épidémiologique et caractère zoonotique....9
e. Facteurs de risques....10
f. Diagnostic, prévention et traitement....11
2.2. Ehrlichia canis....12
a. Généralités....12
b. Etiologie et pathogénie....12
c. Hôtes et cycles de transmission....13
d. Situation épidémiologique et caractère zoonotique....13
e. Facteurs de risques....14
f. Diagnostic, prévention et traitement....14
2. 3. Anaplasma platys....14
a. Généralités....14
b. Etiologie et pathogénie....15
c. Hôtes et cycles de transmission....15
d. Situation épidémiologique et caractère zoonotique....15
e. Facteurs de risques....16
f. Diagnostic, prévention et traitement....16
h. Co-infections avec Ehrlichia canis....16
II. Matériels et méthodes....18
1. Etude rétrospective 2022....18
1.1. Elaboration de la base de données....18
1.2. Analyses statistiques....18
2. Etude prospective 2023....19
2.1. Elaboration de la base de données....20
a. Acteurs impliqués dans l'étude scientifique....20
2.2. Analyses de laboratoire....20
a. Réception des tubes EDTA....20
b. Test par quantitative polymerase chain reaction (qPCR)....21
c. Test du Knott....21
2.3. Analyses statistiques....22

III. Résultats..... 23
1. Etude rétrospective 2022..... 23
1.1. Analyse descriptive..... 23
1.2. Estimation de la prévalence..... 23
1.3. Facteurs de risques..... 24
a. Dirofilariose..... 24
b. Ehrlichiose..... 25
c. Anaplasmose..... 25
2. Etude prospective 2023..... 26
2.1. Analyse descriptive de l'échantillon..... 26
2.2. Prévalences observées..... 27
2.3. Facteurs de risques..... 28
IV. Discussion..... 30
1. Facteurs de risque des maladies vectorielles étudiées..... 30
2. Implications pour la gestion..... 31
3. Limites de l'étude..... 31
3.1. Représentativité et biais de l'échantillon analysé pour l'étude 2022..... 31
3.2. Représentativité et biais de l'échantillon analysé pour l'étude 2023..... 32
3.3. Comparaison des trois méthodes de diagnostic..... 34
4. Perspectives..... 35
Conclusion..... 37
Bibliographie..... 38
Annexes..... 45

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribo-nucléique
AIC : Akaike Information Criterion
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN: Acide ribonucléique
ASTRE: Animal Santé Territoires Risques Écosystèmes
CASUD: Communauté d'agglomération du Sud de La Réunion
CDC: Centre pour le contrôle et la prévention des maladies
CINOR : Communauté d'agglomération - Intercommunale du Nord de la Réunion (CINOR)
CIRAD : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement
EMC: Ehrlichiose monocytaire canine
CHU: Centre Hospitalier Universitaire
CIREST: Communauté d'agglomération - Intercommunale de la Réunion EST
CIVIS: Communauté Intercommunale des Villes Solidaires
DAAF: Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt
DROM: Département et Région d'Outre-Mer
EDTA: Acide éthylènediaminetétraacétique
EPLEFPA: Établissement Public Local d'Enseignement et de Formation Professionnelle Agricoles
EMC: Ehrlichiose Monocytaire Canine
FEADER: Fonds européen agricole pour le développement rural
GDS: Groupement de Défense Sanitaire
GEVEC: Groupe d'Etude Vétérinaire sur l'Errance des Carnivores à La Réunion
IC 95% : Intervalle de confiance à 95 %
j.p.i : jours post-infection
LVD: Laboratoire Vétérinaire Départemental
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
REVEZ: Renyon Viv Ensamb ek Zanimos
Se: Sensibilité
Sp: Spécificité
TCO: Territoire de la Côte Ouest
UMR: Unité Mixte de Recherche
VPT: Vétérinaires Pour Tous

Liste des figures

Figure 1: Cartographie de la densité de chiens estimés au km² par IRIS - Source: EPLEFPA 2018.……7
Figure 2: Cycle de *Dirofilaria immitis* - Source: American Heartworm Society……..…9
Figure 3: Répartition mondiale des cas de dirofilariose humaine - Source: Semat, 2016……..……10
Figure 4: Chronologie du développement et période de sensibilité aux traitements de *D. immitis* - Merial Limited, Duluth, GA. ©2008 (Tous droits réservés). Source: American Heartworm Society……..…..11
Figure 5: Taxonomie de la famille des Anaplasmataceae - Source: National Center for Biotechnology Information……..…….12
Figure. 6: Localisation des cliniques vétérinaires interrogées pour la base de données 2022 - Source personnelle……..18
Figure 7: Schéma récapitulant les étapes à la réception des tubes EDTA - Source personnelle……..21
Figure 8: Microfilaires de *Dirofilaria immitis* au microscope optique, grossissement x100 (A: extrémité céphalique; B: extrémité caudale) - Source personnelle……...22
Figure 9: Répartition des chiens selon leur sexe (1: Échantillon étudié 2022; 2: Population générale).....31
Figure 10: Répartition des chiens selon leur population (1: Échantillon étudié 2023; 2: Population générale).....33
Figure 11: Répartition des chiens selon leur sexe (1: Échantillon étudié 2023; 2: Population générale).....33

Liste des tableaux

Tableau 1: Prévalence de *Dirofilaria immitis* chez les chiens dans plusieurs pays du monde …..……..9
Tableau 2: Prévalence d'*Ehrlichia canis* chez les chiens dans plusieurs pays du monde ……13
Tableau 3: Prévalence d'*Anaplasma platys* chez les chiens dans plusieurs pays du monde……15
Tableau 4: Analyse descriptive de l'échantillon selon les variables d'intérêt - Etude 2022……..…23
Tableau 5: Proportions de chiens positifs selon les variables d'intérêt et p-value associée - Etude 2022…….24
Tableau 6: Odds Ratio et intervalle de confiance 95% pour la dirofilariose, l'ehrlichiose et l'anaplasmose……..25
Tableau 7: Analyse descriptive de l'échantillon prélevé selon les variables d'intérêt - Etude 2023…..26
Tableau 8: Nombre de chiens testés et positifs à *Dirofilaria immitis* pour chaque méthode diagnostic - Etude 2023……..27
Tableau 9: Résultats des 3 méthodes de diagnostic de *Dirofilaria immitis* pour les 25 chiens considérés comme positifs pour l'étude des facteurs de risque - Etude 2023……..28
Tableau 10: Proportions de chiens positifs selon les variables d'intérêt et p-value associée - Etude 2023……29

Liste des annexes

Annexe 1: Descriptif de l'étude globale - CIRAD UMR-ASTRE 2023…….45
Annexe 2: Fiche commémorative - CIRAD UMR-ASTRE 2023……..47
Annexe 3: Fiche de consentement - CIRAD UMR-ASTRE 2023……48
Annexe 4: Matériel de prélèvement- CIRAD UMR-ASTRE 2023……..…….49
Annexe 5: Protocole d'étude partenariat Idexx - CIRAD UMR-ASTRE 2023……...50

I. Introduction

Selon le dernier rapport de l'établissement public local d'enseignement et de formation professionnelle agricole (EPLEFPA) de Saint-Paul sur l'errance animale de 2018, l'île de la Réunion hébergerait une population canine d'environ 240 000 individus dont plus d'un tiers serait divagant ou errant (EPLEFPA-CFPPA, 2018). Les vétérinaires, en partenariat avec les associations de protection animale jouent un rôle essentiel dans la prise en charge médicale des chiens de l'île de la Réunion. Ils sont donc en première ligne dans la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses. Parmi elles, les maladies vectorielles sont au cœur des enjeux actuels de santé publique et vétérinaire. Le contexte de l'île de La Réunion ajoute une dimension particulière sur ce sujet avec, d'une part, un climat tropical, favorable à la présence de vecteurs et à des cycles parasitaires plus rapides et d'autre part, le phénomène d'errance et de divagation animale, qui contribue à alimenter des animaux peu médicalisés, hôtes voire réservoirs de ces maladies infectieuses. Ce rapport précise aussi que la dirofilariose cardiaque (due à *Dirofilaria immitis*), l'ehrlichiose monocytaire canine (due à *Ehrlichia canis*) et l'anaplasmose plaquettaire canine (due à *Anaplasma platys*) font partie des maladies les plus recherchées par les vétérinaires de l'île.

Dans cette partie introductive, nous détaillons tout d'abord la situation de l'errance canine sur le territoire de l'île. Puis nous décrivons plus spécifiquement les trois pathogènes d'intérêt en nous intéressant aux maladies qu'ils provoquent, leur situation épidémiologique dans le monde et à La Réunion, les facteurs de risque montrés dans la littérature et les méthodes de prévention, traitement et diagnostic. Nous concluons cette partie introductive en décrivant les objectifs généraux et spécifiques de notre étude.

1. Situation de l'errance canine à la Réunion

1.1. Dynamique démographique de la population canine et définition des sous populations

L'île de la Réunion, département et région d'outre mer (DROM) française est une île de l'Archipel des Mascareignes, située dans l'Océan Indien et d'une superficie totale de 2500 km2, faisant face à un phénomène particulièrement interpellant d'errance et de divagation animale sur son territoire.
Au sein de la population canine de l'île de la Réunion, le rapport de EPLEFPA distingue trois catégories. La population A correspond à une population de chiens détenus par des propriétaires. Les chiens de cette population sont en général confinés, sortis en laisse ou sous surveillance. En 2018, leur nombre était estimé à environ 165 000 individus. La population B comprend les chiens divagants, auxquels les propriétaires laissent un accès à l'extérieur sans surveillance. Sa taille, probablement sous-estimée, était évaluée à environ 30 000 individus. Enfin, la population C regroupe les chiens errants, nés errants, perdus ou abandonnés. Cette population se caractérise par l'absence de propriétaires et sa taille était estimée à 43000 individus (EPLEFPA-CFPPA, 2018).

Les chiens présentent une adaptabilité élevée aux conditions environnementales et humaines, ce qui leur a permis de coloniser l'ensemble des habitats du territoire réunionnais. Le climat subtropical sans période hivernale éprouvante permet la survie des chiens à l'extérieur. La répartition de la population humaine, avec une forte densité dans les "bas" de l'île et une présence jusque dans les territoires les moins accessibles, rend l'accès aux ressources alimentaires aisé et régulier. Les cinq intercommunalités sont toutes concernées par le phénomène de divagation et d'errance animale avec toutefois des zones critiques à forte densité de chiens (Figure 1).

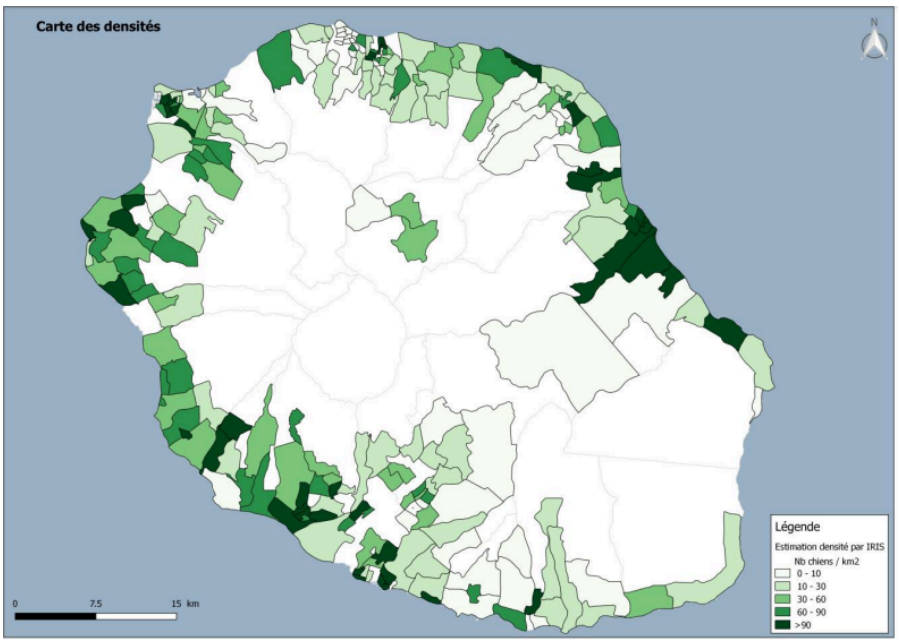

Fig 1: Cartographie de la densité de chiens estimés au km² par IRIS - Source: EPLEFPA 2018

A La Réunion, la population de carnivores errants aurait tendance à augmenter en taille. En effet, avec presque 30% de la population canine ayant moins de 10 mois, le renouvellement de la population serait plutôt élevé (EPLEFPA-CFPPA, 2018). L'âge moyen est de 5,9 ans, largement abaissé par la population errante et divagante dont les causes de décès précoce sont liées aux conditions de vie (maladie, accident de la route, empoisonnement).

1.2. Principaux enjeux liés à l'errance et à la divagation animale

Les problèmes liés à l'errance et à la divagation animale ressentis par la population réunionnaise interrogée sont les problèmes sanitaires (21,4%), les problèmes de sécurité, principalement causés par les attaques et les morsures (16,4%), les nuisances sonores (14,4%), la sécurité routière (12,1%) et la vision des animaux morts sur la route (9,6%), le bien-être animal (7,6%) et enfin les attaques de troupeaux (5,9%) (EPLEFPA-CFPPA, 2018).

Concernant les problèmes sanitaires, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a établi en 2018 une liste des 15 principaux dangers sanitaires à La Réunion dont dix concernent les chiens (ANSES, 2018). *Dirofilaria immitis* y figure à la dixième place. La section suivante présente les trois pathogènes, à transmission vectorielle, auxquelles nous nous intéressons dans cette étude.

2. Maladies vectorielles étudiées chez les chiens de La Réunion

La notion de vecteur a été définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme "un arthropode hématophage qui assure la transmission biologique (ou mécanique) active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre vertébré" (WHO, 2020). Les maladies à transmission vectorielle, dont un certain nombre émerge mondialement, sont au cœur des préoccupations de la santé humaine et animale. Le réchauffement climatique permet aux vecteurs d'étendre leur répartition géographique dans des zones où ils étaient auparavant absents. L'augmentation des populations animales et humaines, ainsi que de leur mobilité et leurs échanges sont également quelques-unes des raisons à ces bouleversements dans l'épidémiologie des maladies.

Dans leur exercice quotidien, les praticiens vétérinaires de l'île de la Réunion utilisent régulièrement les tests de diagnostic rapide disponibles sur le marché, et en particulier le Snap Test 4Dx® qui permet de détecter 4 agents pathogènes à transmission vectorielle: *Dirofilaria immitis* par détection directe, *Anaplasma* spp. (*A. platys* et *A. phagocytophilum*), *Ehrlichia spp.* (*E. canis* et *E. ewingii*) et *Borrelia burgdorferi* par détection indirecte. Cependant, les seuls vecteurs reconnus de *A. phagocytophilum* et *B. burgdorferi* sont des tiques Ixodidés, absentes sur le territoire (Little, 2010, Uzcategui et al., 2019). De plus, il semblerait que *E. ewingii* n'ait été isolée qu'aux USA (Paddock and Childs, 2003). Par conséquent, les seuls pathogènes détectables par le Snap Test 4Dx® à la Réunion semblent être *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys* qui seront donc notre sujet d'étude.

2.1. *Dirofilaria immitis*

a. Généralités

Dirofilaria immitis est une espèce de nématode, appartenant au genre des Dirofilaria qui comprend aussi entre autres les espèces *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria tenuis* et *Dirofilaria ursi*. Parmi celles susceptibles de parasiter le chien, on ne retrouve que *D. immitis* et *D.repens*, respectivement responsables de la dirofilariose cardio-pulmonaire et de la dirofilariose sous-cutanée.

b. Etiologie et pathogénie

Dirofilaria immitis est à l'origine de la dirofilariose cardio-pulmonaire, aussi appelée maladie des vers du cœur. La forme bénigne est asymptomatique et la forme modérée provoque des symptômes respiratoires assez généraux (toux, intolérance à l'effort et bruits respiratoires modifiés) ce qui rend le diagnostic compliqué. Étant donné le cycle parasitaire, les premiers symptômes peuvent apparaître chez le chien jusqu'à des années après l'infestation. Aux signes cliniques précédemment mentionnés peuvent s'ajouter une hépatomégalie, des syncopes (pertes de conscience momentanées à cause d'un flux sanguin réduit au niveau du cerveau), de l'ascite. Enfin, lorsque l'infestation est massive, certains chiens peuvent aussi développer un syndrôme de la veine cave caractérisée par une régurgitation tricuspidienne sévère et aiguë et une diminution du débit cardiaque entraînant une hémolyse massive et une hémoglobinurie. A ce stade, la mort de l'animal intervient dans les 24 à 48 heures suivantes (Tilley and W. K. Smith Jr., 2008).

Les femelles adultes mesurent entre 250 et 300 mm de longueur et 1 à 1,3 mm de diamètre. Les mâles sont plus petits: entre 120 et 200 mm de longueur et de 0,7 à 0,9 mm de diamètre. Les microfilaires sont détectables au microscope optique: ils mesurent de 290 à 330 µm de longueur pour 5 à 7 µm de diamètre. Ils possèdent une queue droite et une extrémité céphalique en tête d'épingle.

c. Hôtes et cycle de transmission

Le cycle de *Dirofilaria immitis* est un cycle dixène obligatoire (figure 2). Il se réalise entre l'hôte intermédiaire, le vecteur arthropode (moustiques de la famille des Culicidae) et l'hôte définitif vertébré: l'infestation a été diagnostiquée chez plus de 30 espèces de mammifères: carnivores domestiques et sauvages, félins domestiques et sauvages, mustélidés, singes, mammifères marins, rongeurs et ongulés (Otto, 1975). Cependant, les chiens représentent le réservoir d'infection le plus compétent car ils sont sujets à la charge parasitaire la plus élevée (Genchi et al., 1988).

La période du développement de *Dirofilaria immitis* chez l'hôte définitif est relativement longue puisque les femelles adultes commencent à produire les premières larves (microfilaires L1) après 6 à 9 mois post-infection. Le moustique se contamine en ingérant le microfilaire de stade 1 (L1) lors d'un repas sanguin sur l'hôte définitif. Dans les tubes de Malpighi, le microfilaire arrive au stade 2 (L2) au bout de 8 à 10 jours, puis en larve de stade 3 (L3) encore trois jours plus tard. A ce stade, les L3 perforent l'extrémité des tubes de Malpighi et migrent vers l'appareil buccal du moustique. Celui-ci dépose de l'hémolymphe contenant la larve L3 devenue infestante lors d'un repas sanguin dans un

nouvel hôte. La mue de L3 à L4 se fait entre 3 et 12 jours post-infection (j.p.i). La mue ultérieure se fait entre 50 et 70 jours post-infection. A ce stade, le premier adulte immature migre dans l'artère pulmonaire et dans le ventricule droit entre 70 et 85 j.p.i. Il atteint sa maturité sexuelle à partir du 120ème j.p.i (stade à partir duquel les femelles produisent des antigènes détectables par les tests antigéniques).

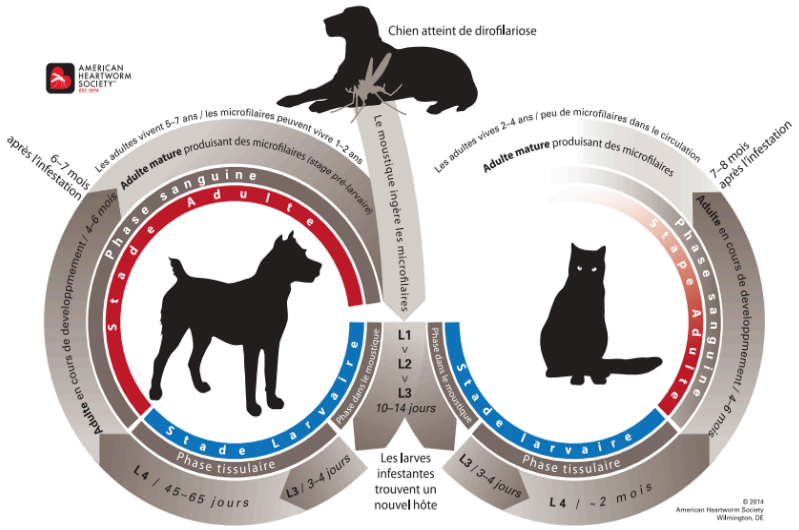

Fig 2: Cycle d'infestation de *Dirofilaria immitis* chez le chien et le chat - Source : American Heartworm Society

d. Situation épidémiologique et caractère zoonotique

La dirofilariose cardio-pulmonaire canine est une maladie à répartition mondiale, rencontrée sur tous les continents et préférentiellement dans les régions à climat tropical et tempéré du globe. Il existe une très grande disparité entre les pays d'un même continent, cependant on observe une tendance actuelle qui va vers une diminution des cas reportés, notamment en Europe (Genchi and Kramer, 2020). La prévalence canine dans quelques pays du monde est présentée dans le tableau 1.

Tab 1: Prévalence de *Dirofilaria immitis* chez les chiens dans plusieurs pays du monde

Pays	Prévalence	Sources
Nouvelle-Calédonie	57%	(Beugnet et al., 1993)
Iles Canaries	15,7%	(Montoya-Alonso et al., 2010)
Iran	24 %	(Khedri et al., 2014)
Autriche	9.6% (chiens de refuge)	(Sonnberger et al., 2021)
Inde	18%	(Borthakur et al., 2015)
Allemagne	1,4 %	(Vrhovec et al., 2017)
Colombie	6,3% (chiens de refuge)	(Muñoz et al., 2020)

A Madagascar, l'ADN et les microfilaires de *D. immitis* ont été identifiées chez des lémuriens mais pas chez les chiens (Zohdy et al., 2019). La prévalence chez les chiens de l'île de la Réunion n'a, à ce jour, jamais été estimée.

Dirofilaria immitis est un enjeu de santé publique à cause de son potentiel zoonotique. Chez l'homme, hôte accidentel généralement asymptomatique, les stades parasitaires pré-adultes forment des kystes en forme de pièce de monnaie dans les branches des artères pulmonaires. Les chiffres sont sûrement sous-estimés car les nodules pulmonaires passent souvent inaperçus ou sont mal diagnostiqués (McCall et al., 2008).
Il semblerait que les infestations à *D. immitis* et *D. repens* chez le chien et l'humain soient liées. Actuellement, des cas de dirofilariose sous-cutanée sont signalés chez le chien dans des régions du monde où seuls des cas de maladie pulmonaire sont rapportés chez l'homme et vice versa. La répartition mondiale des cas de dirofilariose humaine recensés jusqu'en 2012 sont présentés dans la figure 3 en fonction de l'espèce responsable (Simón et al., 2012). *Dirofilaria repens* n'a jamais été étudiée non plus à La Réunion.

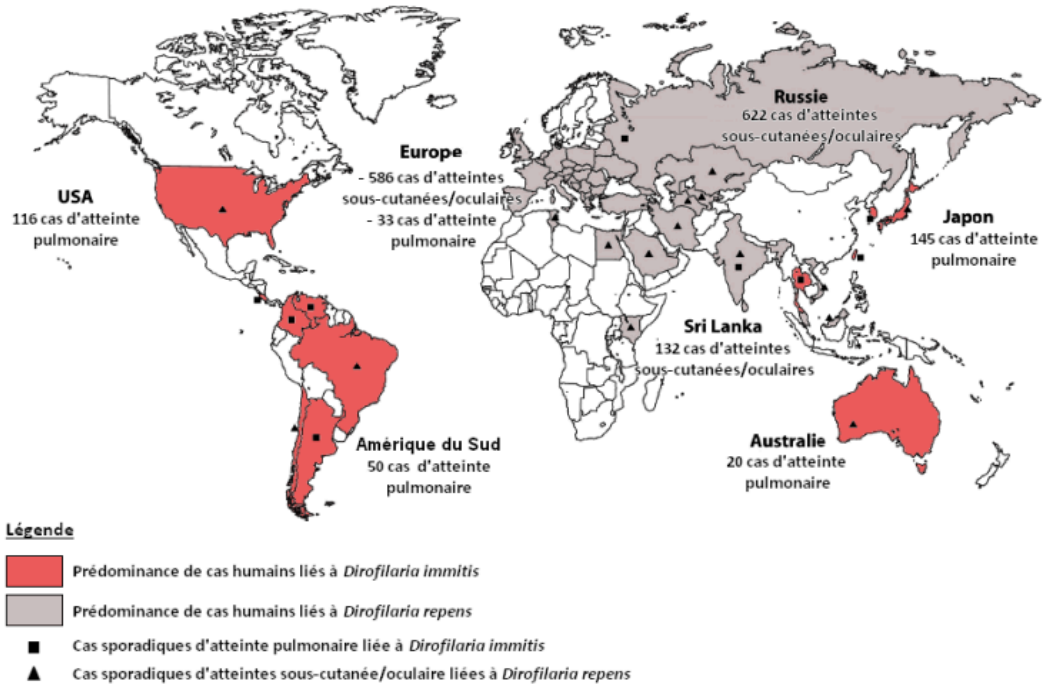

Fig 3: Répartition mondiale des cas de dirofilariose humaine. Source : (Semat, 2016)

e. Facteurs de risques

L'environnement et le climat ont une influence sur la prévalence de *Dirofilaria immitis*. Une fois ingérés par le moustique, les microfilaires dépendent de la température tout au long du processus de développement, jusqu'au stade larvaire infectant (L3). Une température élevée est donc en faveur d'un cycle parasitaire plus court puisque le temps de développement des stades larvaires chez le moustique serait de 8-10 jours à 28-30 ° C, 11-12 jours à 24 ° C et 16-20 jours à 22 ° C. Il a été montré que la maturation de L3 chez *Aedes trivittatus* est arrêtée à des températures inférieures à 14°C (Slocombe et al., 1989).
La température optimale doit être atteinte dans les 30 jours qui suivent l'ingestion des larves L1 pour atteindre le stade d'infestation, un processus appelé période d'incubation extrinsèque. L'île de la Réunion offre un climat idéal, à la fois suffisamment chaud et qui se maintient dans le temps pour permettre la maturation des microfilaires, et à la fois humide pour la reproduction des moustiques.

Le mode de vie du chien a une influence sur le risque : une étude a montré que les chiens errants en Inde sont significativement plus infectés par *D. immitis* que les chiens des autres groupes (Borthakur et al., 2015). Enfin, l'âge élevé semble également être un facteur de risque à prendre en compte (Orr et al., 2020).

f. Diagnostic, prévention et traitement

Plusieurs méthodes existent pour diagnostiquer l'infestation à *Dirofilaria immitis*. Le Snap Test 4Dx® utilise la méthode immuno-enzymatique ELISA, à la recherche des antigènes sécrétés par les femelles adultes de *Dirofilaria immitis*. En prenant compte le cycle du parasite, il convient de n'utiliser ce type de test que 7 mois après une éventuelle infestation. Le test permet d'obtenir un résultat en 10 minutes et possède une sensibilité de 98.0% (IC 95%: 89.1–99.9) et une spécificité de 100.0% (IC 95%: 99.2–100) (IDEXX Laboratories, Inc, 2022). Il est intéressant d'effectuer en parallèle un test de concentration des microfilaires appelé test de Knott modifié. Cette méthode permet d'observer au microscope optique les microfilaires de *D. immitis* à partir d'un prélèvement sanguin périphérique. Moins utilisée car réalisée en laboratoire mais plus sensible, la PCR quantitative en temps réel permet d'amplifier et de détecter l'ADN de *Dirofilaria immitis* via la détection du gène du cytochrome C oxidase mitochondrial (cox-1). Enfin, l'infestation peut être confirmée et sa gravité évaluée à l'aide d'une radiographie cardio-pulmonaire et/ou d'une échocardiographie.

Des produits insecticides disposant d'une AMM vétérinaire, sous forme de spot-on ou de collier sont disponibles pour lutter contre les piqûres des moustiques vecteurs. La prévention agit également sur la destruction des larves si elles sont tout de même inoculées. Les molécules actuellement sur le marché sont de la famille des lactones macrocycliques (ivermectine, milbémycine oxime, moxidectine, et sélamectine) et ont un intervalle posologique de 30 jours. Elles agissent sur les microfilaires et les larves L3 et L4.
Entre J30 et J120 post-infection, soit pour les stades L4 avancés et les juvéniles de *Dirofilaria immitis*, il existe un manque de sensibilité des parasites aux traitements à base de lactones macrocycliques et de mélarsomine (figure 4).

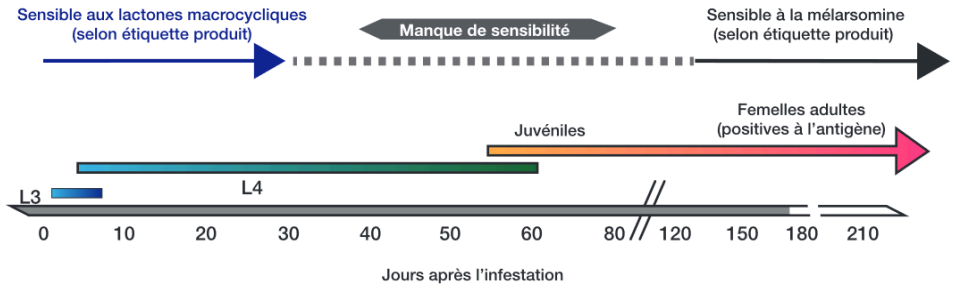

Fig 4: Chronologie du développement et période de sensibilité aux traitements de *D. immitis* - Merial Limited, Duluth, GA. ©2008 (Tous droits réservés). Source: American Heartworm Society

Aucun effet thérapeutique des lactones macrocycliques contre les adultes de *Dirofilaria immitis* n'a été établi. Il est par conséquent recommandé que tous les chiens âgés de 8 mois ou plus, vivant dans des zones endémiques de dirofilariose soient testés avant le traitement préventif, pour vérifier la présence d'une éventuelle infestation par des vers adultes.

En cas de diagnostic positif, le protocole de traitement recommandé par l'American Heartworm Society relève d'une approche multimodale, avec une réussite élevée sous condition indispensable que les efforts physiques soient limités pendant la période de convalescence. Celui ci consiste en une administration de traitement préventif à base de lactones macrocycliques à J1, J30, J60 et J90, de la doxycycline administrée à 10 mg/kg deux fois par jour durant les 4 premières semaines, combinées à 3 injections de mélarsomine, seul médicament adulticide approuvé par la FDA (Food and Drug Administration), à 2,5 mg/kg IM à J60, J90 et J91. L'administration de petites doses de glucocorticoïdes anti-inflammatoires aide à contrôler les signes cliniques de la thromboembolie pulmonaire liée à la thérapie adulticide (American Heartworm society, 2014).

2.2. *Ehrlichia canis*

a. Généralités

Ehrlichia canis appartient à la famille des Anaplasmataceae qui regroupe 4 genres : Ehrlichia, Anaplasma, Neorickttesia ainsi que Wolbachia (figure 5).

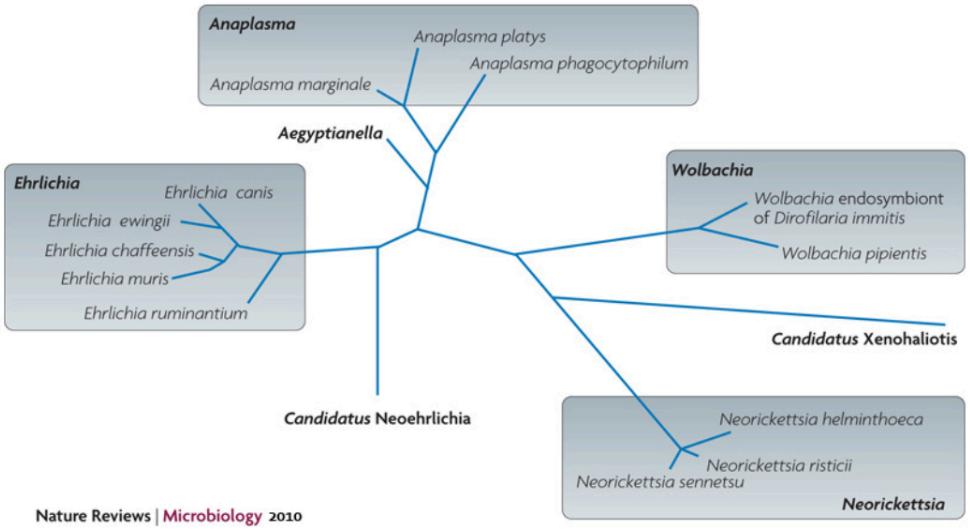

Fig 5: Taxonomie de la famille des Anaplasmataceae - Source: National Center for Biotechnology Information

Parmi le genre Ehrlichia, on distingue 5 espèces: *Ehrlichia canis*, agent de l'ehrlichiose monocytaire canine, *Ehrlichia chaffeensis*, agent de l'ehrlichiose monocytaire humaine, *Ehrlichia ewingii*, agent de l'ehrlichiose granulocytaire canine, *Ehrlichia ruminantium*, responsable de la cowdriose ou «heartwater» des bovins en Afrique et aux Caraïbes et *Ehrlichia muris*, espèce isolée au Japon sur des souris sauvages. Ce sont toutes de petites bactéries intracellulaires strictes qui parasitent les cellules sanguines et épithéliales de nombreux mammifères et de l'homme.

b. Etiologie et pathogénie

L'ehrlichiose monocytaire canine (EMC) ou pancytopénie tropicale canine est une maladie infectieuse causée par *Ehrlichia canis*, une bactérie Gram négatif, intracellulaire obligatoire, ayant un tropisme particulier pour les monocytes et les macrophages.

Plusieurs études d'infections expérimentales ont permis de mettre en lumière les phases cliniques de la maladie (Munhoz et al., 2012, Waner et al., 1996).
La phase aiguë est caractérisée par un syndrome fébrile après une période d'incubation de 8 à 20 jours. Celui-ci peut durer de 1 à 4 semaines avec pour principaux symptômes une hyperthermie dans plus de 95% des cas, un abattement, une anorexie associée à une perte de poids et de manière plus occasionnelle une splénomégalie, une lymphadénomégalie, de la toux et un jetage oculo-nasal. L'hémolyse intravasculaire que provoque la parasitémie est à l'origine d'une anémie. En clinique, on observe un temps de saignement augmenté causé par une thrombopénie. Cette phase aiguë se résout habituellement spontanément, même sans traitement, et commence alors une phase subclinique, pendant laquelle le chien reste porteur de la bactérie, mais ne présente que des anomalies hématologiques et biochimiques, sans aucune conséquence clinique.
Enfin, les infections répétées dans le temps seraient à l'origine de la phase chronique sévère (Breitschwerdt et al., 1998). Les chiens en phase chronique présentent des symptômes peu spécifiques: perte de poids, cachexie, anorexie, apathie, hyperthermie, déshydratation, pâleur des

muqueuses. Des saignements de plusieurs types sont fréquents (entre autres épistaxis, méléna, ecchymoses, pétéchies) causés par une hypoplasie voire une aplasie médullaire. A ce stade, les individus pancytopéniques sont plus à risque de développer des infections opportunistes.

c. Hôtes et cycles de transmission

Le vecteur d'*Ehrlichia canis* est la tique brune du chien *Rhipicephalus sanguineus*. Les espèces hôtes sont les canidés domestiques et sauvages : chiens, chacals (non symptomatiques), loups et coyotes. Toutes les formes de tiques, qu'elles soient larvaires, nymphales ou adultes, peuvent transmettre par morsure la bactérie au chien. Cependant, les tiques adultes ont une durée de vie longue (jusqu'à 568 jours) et semblent donc jouer un rôle plus important dans la transmission de la maladie (Huxsoll et al., 1969).

La contamination de la tique se fait par ingestion de monocytes infectés, lors d'un repas de sang sur un animal contaminé en phase aiguë de la maladie, pendant laquelle les monocytes infectés circulants sont les plus nombreux. La transmission chez la tique est uniquement trans-stadiale, la transmission trans-ovarienne n'ayant pas été démontrée à ce jour (Ipek et al., 2018). *Rhipicephalus sanguineus* constitue donc, avec les chiens infectés en phase aiguë, un réservoir de *Ehrlichia canis*.

d. Situation épidémiologique et caractère zoonotique

E. canis a une répartition quasi-mondiale puisque le seul territoire dont elle est absente est l'Australie malgré la présence de son vecteur naturel (Mason et al., 2001).
La prévalence d'*E. canis* dans la population canine est dépendante de la distribution de son vecteur que l'on retrouve préférentiellement dans les régions tropicales ou subtropicales. Le tableau 2 montre la grande variabilité de prévalence en fonction des pays étudiés et de la méthode de diagnostic utilisée.

Tab 2: Prévalence d'*Ehrlichia canis* chez les chiens dans plusieurs pays du monde

Pays	Prévalence (méthode utilisée)	Sources
Iran	9,44 % (non précisé)	(Jafari et al., 1997)
Amérique du Nord	0,8 % (ELISA)	(Beall et al., 2012)
Mexique	29,3% (qPCR)	(Ojeda-Chi et al., 2019)
Chine	1,29% (ELISA)	(Luo et al., 2021)
Pologne	8,0 % (ELISA)	(Ploneczka and Smielewska-Los, 2003)
Serbie	11,1 % (ELISA)	(Bogicevic et al., 2017)
Egypte	9,7 % (PCR)	(Selim et al., 2021a)

Une étude réalisée sur 146 chiens a permis d'estimer la séroprévalence de l'ehrlichiose canine à la Réunion à 26% avec une forte disparité entre la population médicalisée (1,47%) et la population de refuge, donc non médicalisée (75,55%) (S Muller, 2004).

Une souche très proche génétiquement d'*E. canis* a été isolée au Venezuela sur un patient asymptomatique et nommée VHE (Venezuelan human ehrlichia) (Perez et al., 1996). Une étude conduite plus tard, également au Venezuela, a permis d'identifier par PCR l'ADN d'*E. canis* chez 6 patients, dont les symptômes étaient très proches de ceux de l'EMC chez les chiens (Perez et al.,

2006). La forte prévalence d'*E. canis* dans cette région chez les chiens (Arraga - Alvarado, 1992) et le fait que les patients infectés vivaient avec des chiens ou en zone rurale laisse envisager le caractère zoonotique d'*E.canis*.

e. Facteurs de risques

Une deuxième étude réalisée sur 176 chiens symptomatiques à la Réunion (Beugnet et al., 2002) a permis de mettre en lumière des différences significatives de prévalence entre les groupes d'individus. Les facteurs de risques identifiés sont l'âge du chien et son mode de vie (les chiens errants étaient significativement plus infectés). Une autre étude réalisée en Pologne l'année suivante a montré que le sexe et la race n'ont pas d'influence (Ploneczka and Smielewska-Los, 2003). Ces facteurs de risque ont également été confirmés dans d'autres études (Barrantes-Gonzalez et al., 2016), Navarrete et al., 2018), le mode de vie étant directement corrélé à la pression parasitaire.

f. Diagnostic, prévention et traitement

L'infection se manifestant parfois par des signes cliniques non spécifiques, le vétérinaire s'oriente vers un diagnostic de présomption. En première intention, le test rapide qui utilise la méthode d'immunofluorescence indirecte à la recherche d'anticorps est un outil de diagnostic rapide et relativement fiable. Un résultat positif indique une infection passée ou en cours, mais les anticorps peuvent persister plusieurs mois à plusieurs années dans le sang. De même, on peut obtenir un résultat faux négatif puisque la production d'anticorps n'intervient pas avant 12 à 14 j.p.i. (Harrus et al., 1998). Le Snap Test 4Dx® présente une sensibilité de 93.4% (IC 95%: 86.9–97.3) et une spécificité de 96.8% (IC 95%: 94.6–98.3) (IDEXX Laboratories, Inc, 2022). Il peut être intéressant de coupler au test rapide un diagnostic en laboratoire : la PCR a la recherche de l'ARN 16S d'*E. canis* est une méthode directe très sensible et spécifique qui permet de détecter une infection aiguë (McBride et al., 1996). La mise en évidence directe de *E. canis,* sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa à la recherche d'inclusions cytoplasmiques en forme de morulae est difficile et aléatoire et présente donc une faible sensibilité (Harrus and Waner, 2011). Enfin, la culture bactérienne n'est pas pratiquée en routine car longue et coûteuse.

Aucun vaccin n'existe pour le moment mais les essais vaccinaux réalisés sur souris de laboratoire sont prometteurs (Nambooppha et al., 2022). Le contrôle des infestations repose donc uniquement sur un traitement acaricide préventif régulier. L'utilisation d'une chimiothérapie préventive à base de doxycycline à raison de 3 mg/kg per os (PO) en une prise était utilisée avec succès dans les camps militaires situés en zones d'endémie (Davoust et al., 1994).

Le traitement de choix de l'EMC repose sur l'administration de tétracyclines, qui exercent une activité bactériostatique. Il consiste en une prise de 10 mg/kg PO SID ou 5 mg/kg PO BID de doxycycline pendant 3 à 4 semaines. Lorsque la doxycycline est contre-indiquée, il est possible d'utiliser de la minocycline (10 mg/kg, PO, BID, pendant 3 à 4 semaines) ou la rifampicin (10 mg/kg, PO, BID, pendant 3 semaines). L'utilisation de dipropionate d'imidocarb (CARBESIA®) n'est plus recommandée à ce jour (Mylonakis et al., 2019).

2. 3. *Anaplasma platys*

a. Généralités

Anaplasma platys appartient au genre Anaplasma, de la même famille que *Ehrlichia canis*, les Anaplasmataceae (figure 6). Ce genre est très proche du genre des Ehrlichia, avec jusqu'à 94,9 % d'homologie sur les séquences du gène ARNr 16S (NCBI).
Parmi le genre Anaplasma, on distingue 3 espèces : *Anaplasma platys*, responsable d'une thrombopénie cyclique chez le chien, *Anaplasma phagocytophilum*, qui regroupe trois entités (*Ehrlichia phagocytophila*, agent de la fièvre à tique des petits ruminants, *Ehrlichia equi*, responsable

de l'ehrlichiose granulocytaire du cheval, et l'agent de l'ehrlichiose granulocytaire humaine) et *Anaplasma marginale*, parasite des érythrocytes des bovins.

b. Etiologie et pathogénie

Auparavant dénommée *Ehrlichia platys*, *Anaplasma platys* a été décrite pour la première fois aux Etats-Unis en 1978. Il s'agit d'une bactérie Gram négatif, intracellulaire stricte qui infecte de façon spécifique les thrombocytes du chien. Elle est responsable d'une maladie appelée anaplasmose plaquettaire canine ou thrombopénie infectieuse cyclique.

Le temps d'incubation a été évalué entre 8 et 15 jours après inoculation expérimentale. Les signes cliniques sont rares (apathie, hyperthermie, hémorragie, polyadénomégalie). La maladie est principalement caractérisée par une thrombopénie où les plaquettes peuvent atteindre des valeurs très basses (<10 000 plaquettes/µL). Après 3 à 4 jours, ce nombre augmente jusqu'aux valeurs usuelles et on constate simultanément la disparition des plaquettes infectées dans le sang. La parasitémie s'installe alors de façon cyclique, selon le même schéma, avec des intervalles de l'ordre de une à deux semaines. On note une différence significative entre la première parasitémie (31 à 63 % de plaquettes infectées) et les suivantes (1 à 13 %) (Harvey et al., 1978).

c. Hôtes et cycles de transmission

Le vecteur principal d'*Anaplasma platys* supposé est la tique *Rhipicephalus sanguineus* (Inokuma et al., 2000). Cependant, une autre espèce de tique pourrait également être impliquée : *Dermacentor auratus* (Parola et al., 2003). L'ADN d'*Anaplasma platys* a été identifié par PCR chez des rongeurs du genre Apodermus agrarius en Corée, qui pourraient servir de réservoir pour la maladie (Chae et al., 2003). Le cycle de transmission est similaire à celui d'*E. canis.*

d. Situation épidémiologique et caractère zoonotique

A. platys a une répartition mondiale, et l'incidence de la maladie semble la plus importante en été et au début de l'automne dans les pays tempérés, ce qui correspond au maximum d'activité du principal vecteur potentiel. Dans les régions tropicales et subtropicales, la tique est présente toute l'année. Le tableau 3 résume les prévalences observées et la méthode de diagnostic utilisée chez les chiens dans plusieurs pays du monde.

Tab 3: Prévalence d'*Anaplasma platys* chez les chiens dans plusieurs pays du monde

Pays	Prévalence (méthode utilisée)	Sources
Venezuela	16 % (PCR) - chiens militaires	(Huang et al., 2005)
Thaïland	6,9% (PCR)	(Sarker et al., 2021)
Taiwan	8,6% (PCR)	(Yuasa et al., 2017)
Egypte	6,4% (PCR)	(Selim et al., 2021b)
Croatie	2,5% (PCR)	(Huber et al., 2017)
Kenya / Côte d'Ivoire	12,5% (PCR) - chiens errants	(Matei et al., 2016)
Chine	15,4% (PCR) - chiens errants	(Yang et al., 2020)

Aucune étude n'a pour le moment été réalisée pour évaluer la prévalence d'*Anaplasma platys* à la Réunion. Cependant, une prévalence de 18,7% de la bactérie sur des chiens asymptomatiques a été trouvée à Grenade, dans les îles Caraïbes (Alhassan et al., 2021), où le climat et la proportion importante de chiens errants se rapprochent des conditions de l'île de la Réunion.

Le premier cas humain rapporté est au Vénézuela où une jeune femme a été présentée avec des symptômes cliniques proches de ceux retrouvées en cas d'ehrlichiose. Un test d'immunofluorescence indirect a permis d'identifier des anticorps à *E. chaffensi*, cependant un prélèvement provenant de la circulation périphérique a montré des inclusions plaquettaires semblables à celles observées lors d'infections par *A. platys* chez le chien. La microscopie électronique ne permettant pas de conclure sur la nature des rickettsies, le doute subsistait sur le caractère zoonotique d'*Anaplasma platys* (Arraga-Alvarado et al., 1996). Cependant, une vétérinaire a récemment été testée positive par PCR à trois agents infectieux dont *Anaplasma platys* (Maggi et al., 2013). Aussi, deux membres d'une même famille et leur chien ont été testés positifs à *A. platys*, *E. chaffeensis* et *E. ewingii* (Breitschwerdt et al., 2014), permettant d'envisager le caractère zoonotique de *A. platys.*

e. Facteurs de risques

L'étude réalisée en Egypte sur 500 chiens a permis de montrer que les femelles de race Berger Allemand n'ayant pas accès aux soins vétérinaires ainsi que les individus ne recevant pas de traitement acaricide et avec une infestation importante par des tiques étaient soumis à un risque plus élevé d'être infecté par *A. platys* (Selim et al., 2021). Une autre étude brésilienne a permis d'identifier un facteur de risque climatique, lié à la température et l'humidité (Costa-Junior et al., 2013).

f. Diagnostic, prévention et traitement

Le Snap Test 4Dx® utilise la méthode ELISA par immunofluorescence indirecte à la recherche des anticorps d'*Anaplasma platys*. Il présente une sensibilité de 94.1% (IC 95%: 86.8–98.1) et une spécificité de 98.4% (IC 95%: 96.6–99.3) (IDEXX Laboratories, Inc, 2022). Les premiers anticorps de chiens infectés expérimentalement par *A. platys* sont détectables par des tests rapides 16 j.p.i. (Gaunt et al., 2010). Le diagnostic de certitude est la PCR, puisqu'elle est à la fois sensible et spécifique. L'ADN d'*A. platys* est identifié par cette méthode dans pratiquement toutes les études scientifiques. La PCR nichée permet d'accroître la sensibilité du test. Enfin, la cytologie est une méthode de diagnostic direct permettant l'observation des morulae intracytoplasmiques au sein des plaquettes sur un frottis sanguin coloré au May Grünwald Giemsa. Cependant, au vu de la cyclicité de la maladie, la probabilité d'observer des cellules parasitées sur les frottis est faible ce qui laisse à ce test une faible sensibilité.

La prévention et le traitement recommandés sont les mêmes qu'en cas d'infection par *Ehrlichia canis* (Selim et al., 2021).

h. Co-infections avec Ehrlichia canis

Les co-infections de *A. platys* et *E. canis* sont possibles et fréquentes car elles ont le même vecteur: *Rhipicephalus sanguineus*. Parmi 68 chiens errants prélevés en Thaïlande, 29,4% ont été testés positifs à *A. platys* et 25% à *E. canis*. La co-infection avait lieu dans 11,8% des cas. (Piratae et al., 2019). Les signes cliniques que développe le chien sont souvent plus sévères qu'en cas d'infection seule avec un hématocrite plus bas et une thrombocytopénie plus marqués (Gaunt et al., 2010).

3. Objectifs et hypothèses

Cette première partie bibliographique a montré que très peu d'études ont été réalisées à ce jour sur le territoire de La Réunion pour caractériser l'épidémiologie de ces trois pathogènes, à commencer par leur prévalence au sein des populations de chiens de l'île. En considérant la littérature précédemment mentionnée et en prenant en compte l'épidémiologie des maladies, on peut émettre l'hypothèse que les chiens divagants et errants de l'île de la Réunion constituent le réservoir d'agents infectieux le plus important. Effectivement, leur mode de vie à l'extérieur implique une exposition importante aux vecteurs. De plus, il s'agit d'une population très peu voire pas médicalisée donc soumise à une pression d'infection supplémentaire. Le lieu de vie pourrait constituer un autre facteur de risque : les chiens vivant en zones rurales seraient plus exposés aux maladies vectorielles. Enfin, l'âge des chiens sera également considéré comme un potentiel facteur de risque.

Réalisé au cours d'un stage de six mois dans l'UMR ASTRE du CIRAD de Saint Denis, La Réunion, le travail expérimental de ce stage avait pour objectif d'évaluer la prévalence de *Dirofilaria immitis*, et la séroprévalence d'*Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys* au sein des populations de chiens de l'île de la Réunion et de mettre en lumière les facteurs de risques associés aux maladies qu'ils provoquent respectivement. Pour répondre à cet objectif, nous avons réalisé deux études complémentaires :

1. Une enquête rétrospective a été réalisée en analysant les bases de données des logiciels vétérinaires de l'île à la recherche des chiens testés avec un Snap Test 4Dx® entre le 1er janvier et le 31 décembre 2022. L'objectif est de calculer la prévalence de la dirofilariose, de l'ehrlichiose et de l'anaplasmose circulant chez les chiens en 2022. Les informations commémoratives récoltées sur les individus testés ont permis d'identifier les facteurs de risque associés à ces maladies.

2. A partir de janvier 2023, une étude collaborative a été menée par le CIRAD impliquant la réalisation de prélèvements sanguins par les vétérinaires sur les chiens admis en consultation ou en chirurgie. Les analyses de laboratoire à la recherche d'une infestation par *Dirofilaria immitis* ont permis de calculer la prévalence de dirofilariose cardiaque sur l'île de la Réunion et les facteurs de risque ont pû être identifiés grâce à la fiche commémorative associée à chaque animal.

II. Matériels et méthodes

1. Etude rétrospective 2022

1.1. Elaboration de la base de données

Le but de l'étude rétrospective est d'élaborer une base de données comprenant les informations relatives à tous les chiens ayant eu un Snap Test 4Dx® entre le 1er janvier 2022 et le 31 décembre 2022. Pour cela, les cliniques vétérinaires et les associations de protection animale de l'île ont été contactées. Huit cliniques vétérinaires ont ainsi été recrutées (dont deux groupements de cliniques possédant respectivement trois et cinq établissements sur l'île) (figure 6), ainsi que trois associations. Le logiciel de gestion, variable pour chacune des cliniques, a été exploré pour extraire les fiches de chiens ayant été testé en 2022. Pour chaque individu, les informations disponibles comprenaient le sexe, le statut reproducteur, l'âge, le lieu de vie (adresse des propriétaires ou lieu de capture), le mode de vie (pris en charge par une association ou appartenant à un propriétaire), les raisons de la réalisation du test par symptôme (cardio-respiratoire, locomotion, état général, parasitisme, digestif, autres) et les résultats du test (positif ou négatif à la dirofilariose, l'ehrlichiose et l'anaplasmose).

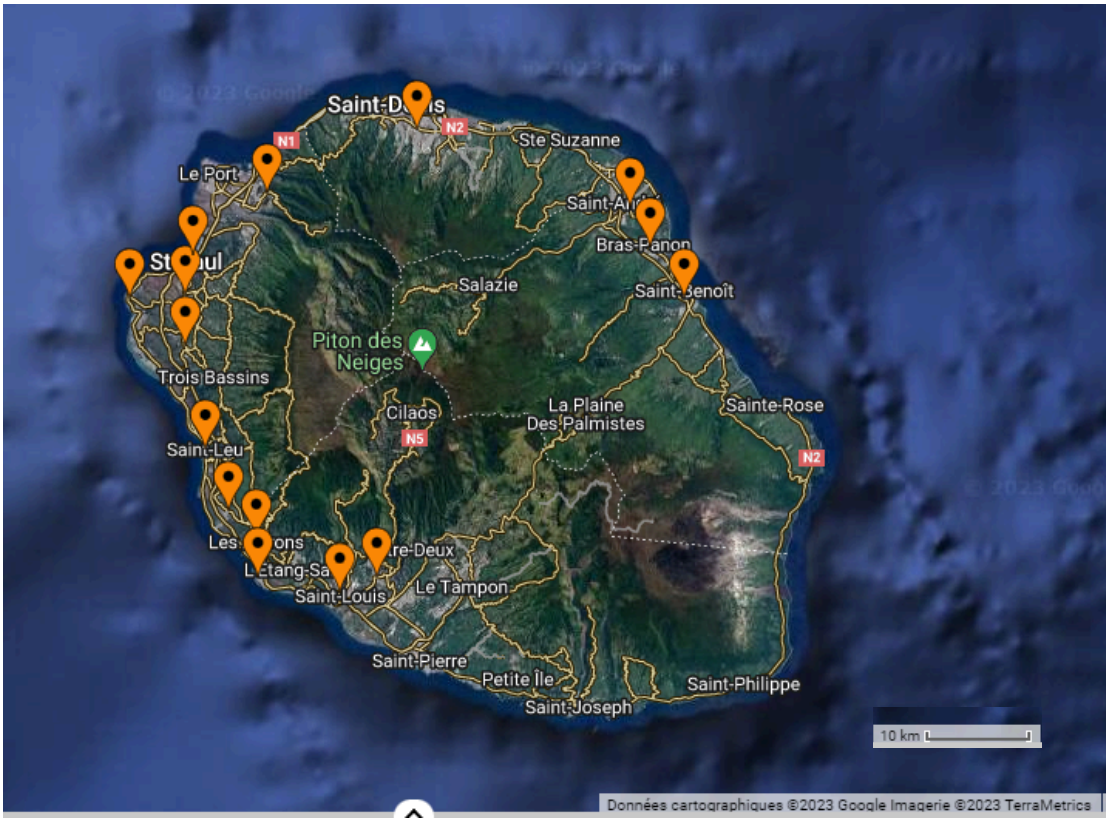

Fig. 6: Localisation des cliniques vétérinaires interrogées pour la base de données 2022 - Source personnelle

1.2. Analyses statistiques

Pour chacune des trois maladies, la prévalence réelle a d'abord été calculée en prenant en compte une sensibilité du test de 98.0% (IC 95%: 89.1–99.9) et une spécificité de 100.0% (IC 95%: 99.2–100) pour la dirofilariose, une sensibilité de 93.4% (IC 95%: 86.9–97.3) et une spécificité de

96.8% (IC 95%: 94.6–98.3) pour l'ehrlichiose et une sensibilité de 94.1% (IC 95%: 86.8–98.1) et une spécificité de 98.4% (IC 95%: 96.6–99.3) pour l'anaplasmose, telles que spécifiées par le fabricant (IDEXX Laboratories, Inc, 2022). Ces calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel Epitools - Ausvet (https://epitools.ausvet.com.au).

L'identification des facteurs de risque pour chacune des trois maladies a été réalisée selon une approche basée sur des régressions logistiques simples (Dohoo, 2003). Les variables réponses de ces régressions étaient les résultats du test (négatif ou positif). Les variables explicatives testées comprenaient le sexe (mâle ou femelle), le statut reproducteur (stérilisé ou entier), l'âge (moins de 2 ans, de 2 à 6 ans, plus de 6 ans), la zone du prélèvement (Est , Ouest, Nord, Sud et inconnu correspondant respectivement aux intercommunalités CIREST, TCO, CINOR, CIVIS et à l'absence de données) et la présence ou non d'éventuel symptômes ayant pu justifier la réalisation du test. A l'origine, lors de la prise de commémoratifs dans la base de données des vétérinaires, une catégorie avait été instaurée, nommée "prise en charge" contenant les variables "association" et "propriétaire". Cependant, sur les 545 chiens issus du secteur "inconnu", 529 étaient pris en charge par une association. Ces deux variables ont alors été considérées comme colinéaires et la catégorie "prise en charge" a été exclue du modèle logistique. On peut tout de même légitimement corréler la prise en charge par une association et le statut errant ou divagant du chien, lié à un mode de vie à l'extérieur (même si certaines prises en charge étaient liées à de la maltraitance animale chez des propriétaires).

Dans un premier temps, grâce à une analyse univariée basée sur un test du Chi2 ou de Fischer (dans le cas où les conditions de validité du test du Chi2 n'étaient pas respectées), nous avons exclu les variables présentant une p-value supérieure à 0,2, en considérant que celles-ci n'avaient sûrement aucune association avec les variables réponses. Puis, un modèle de régression logistique multivarié "saturé" a été construit avec toutes les variables ayant respecté la condition précédente. La sélection des variables a été faite selon une approche descendante basée sur le critère d'information d'Akaike (AIC) qui mesure le compromis entre la complexité du modèle (i.e. le nombre de paramètres) et son ajustement aux données (Burnham and Anderson, 2004). Plus l'AIC d'un modèle est faible, meilleur est le modèle. Le modèle final était donc celui qui présentait le plus petit AIC. L'influence de chaque variable a été estimée par l'obtention des odds-ratios (OR) et des intervalles de confiance à 95% associés (IC95%). Toutes les analyses statistiques ont ensuite été réalisées sur le logiciel R Studio (R Core Team, 2021).

2. Etude prospective 2023

Une étude scientifique de large ampleur, a été élaborée par l'équipe de l'UMR-ASTRE (Unité mixte de recherche - Animal Santé Territoires Risques Écosystèmes) du CIRAD de Saint-Denis et soutenue financièrement par la Région Réunion, l'Union Européenne et le Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire via le FEADER (Fonds européen agricole pour le développement rural). Elle fonctionne en collaboration avec les vétérinaires privés, le GDS (Groupement de Défense Sanitaire), le CHU (Centre Hospitalier Universitaire) et le LVD (Laboratoire Vétérinaire Départemental) de la Réunion. Le projet, détaillé en annexe 1, s'est porté sur trois grands axes: la leptospirose, l'antibiorésistance et la dirofilariose. Notre étude prospective s'inscrit dans celle-ci et s'intéresse spécifiquement à *Dirofilaria immitis*, les pathogènes *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys,* précédemment mentionnés, ne sont donc pas étudiés dans cette partie.

2.1. Elaboration de la base de données

a. Acteurs impliqués dans l'étude scientifique

Concernant spécifiquement notre étude, les prélèvements sanguins analysés sont ceux réalisés entre le 15 janvier et le 20 août 2023 par les 18 cliniques vétérinaires de l'île qui ont accepté de participer. Parmi elles, 13 ont participé activement à la récolte d'échantillons (n>10).
De plus, la campagne de stérilisation des chiens et chats divagants, menée par l'association réunionnaise REVEZ ("Renyon Viv Ensamb ek Zanimos", https://www.revez974.re) et financée par l'association VPT (Vétérinaires pour tous, https://veterinairespourtous.fr), le TCO et la DAAF (Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt), a permis de stériliser 238 chiens et chats divagants avec l'aide de sept étudiants vétérinaires et de quatre cliniques vétérinaires partenaires, le tout en trois semaines. Parmi ces 238 animaux stérilisés, 110 ont été prélevés pour l'étude globale.

b. Matériel de prélèvement

Chaque clinique vétérinaire était approvisionnée régulièrement de kits de prélèvement contenant :
- une fiche commémorative recueillant l'anamnèse et les données cliniques de l'animal (Annexe 2),
- une fiche de consentement éclairé autorisant les prélèvements et l'exploitation des résultats (Annexe 3),
- un tube EDTA pour notre étude,
- d'autres matériels de prélèvement, non utilisés dans notre étude: un écouvillon rectal stérile avec milieu de transport pour la récolte de fèces (projet antibiorésistance), un tube Falcon de 30 mL et un tube Eppendorf avec milieu de conservation de l'ADN pour la récolte d'urine (projet leptospirose) et un tube préalablement rempli d'éthanol à 70°C pour la récolte d'ectoparasites (Annexe 4).

A chaque animal prélevé était attribué un identifiant unique au format "X000", "X" étant la lettre attribuée à la clinique, "000" l'identifiant spécifique de l'individu prélevé. Les informations de la fiche commémorative étaient ensuite saisies informatiquement et centralisées via le logiciel Kobotoolbox® (GitHub, Inc) (https://ee.kobotoolbox.org/x/7lSl9Aey).

2.2. Analyses de laboratoire

Les analyses et la gestion des échantillons sanguins, de la confection des kits à la réception, ont toutes été effectuées par les membres de l'équipe au sein du laboratoire de l'UMR ASTRE, à la plate-forme CYCLOTRON pour la recherche biomédicale à St Denis, La Réunion.

a. Réception des tubes EDTA

A la réception des tubes EDTA, ils étaient stockés en milieu réfrigéré (4 à 8°C). Après homogénéisation et selon la quantité disponible, jusqu'à 1 mL de sang total était prélevé et stocké de nouveau en milieu réfrigéré. Le reste du sang était centrifugé 5 minutes à 8000 tours par minute. Le plasma et le culot ainsi séparés étaient prélevés et conservés au congélateur à -20°C. (figure 7).

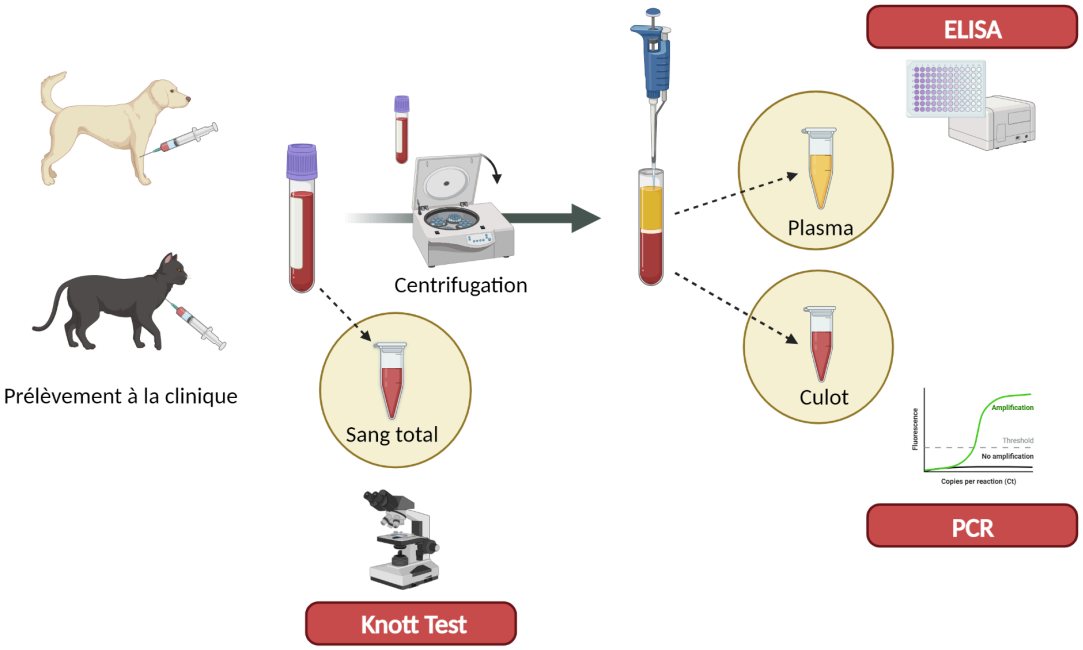

Fig 7: Schéma récapitulant les étapes à la réception des tubes EDTA - Source personnelle

b. Test par quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Les régions ciblées par les amorces de la qPCR sont un fragment de 166 paires de bases de la sous unité 1 du gène du cytochrome C oxidase mitochondrial (cox-1) permettant la détection de l'ADN de *Dirofilaria immtis* (Negron et al., 2022). L'extraction de l'ADN est réalisée avec le mini-kit NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel GmbH, Allemagne) suivant les conditions du fabricant, à partir de 50 µL de culot d'un prélèvement sanguin. La lyse initiale est réalisée en présence du tampon RAV, d'ARN-Carrier et de 20 µL de protéinase K (20 mg/mL) pendant 5 minutes ou jusqu'à liquéfaction du contenu. Après précipitations et lavages, l'élution d'ADN pur est faite dans 50 µL du tampon d'élution fourni avec le kit et préchauffé à 70°C. Puis, 5 µL de l'ADN génomique extrait à tester, de témoin négatif ou de témoin positif sont ajoutés dans 15 µL d'un mélange de réaction Mix 2X AgPath One Step RT-PCR incluant le 25X RT PCR Enzyme ainsi que les deux amorces Fil.COI.749-F (5′-CAT CCT GAG GTT TAT GTT ATT ATT TT-3′ et Fil.COI.914- R (5′-CWG TAT ACA TAT GAT GRC CYC A-3′) et la sonde ajoutée préalablement. On utilise une sonde d'hydrolyse Taqman (D.imm.COI.777-P (6FAM-CGG TGT TTG GGA TTG TTA GTG-BHQ1) qui accroît la spécificité du diagnostic.
La première dénaturation est réalisée en un cycle de 20 secondes à 95°C. L'amplification (dénaturation, hydratation et lecture de fluorescence) est réalisée en répétant 40 fois un cycle à 95°C pendant 30 secondes puis à 60°C pendant 20 secondes.

c. Test du Knott

La méthode de Knott Test modifié repose sur la détection et l'identification des microfilaires sanguins dans un échantillon lysé et concentré, au microscope optique (Magnis et al., 2013). Un mL de sang total EDTA est ajouté à 9 mL de formol à 2%. Le mélange est centrifugé à 3000 tours par minute pendant 5 à 8 minutes afin de lyser les hématies. Le surnageant est ensuite éliminé et une goutte de bleu de méthylène (1 %) est ajoutée au culot. Vingt microlitres du culot sont ensuite observés entre lame et lamelle au microscope optique d'abord à faible grossissement (x40) pour détecter la présence éventuelle de microfilaires puis au grossissement x100 pour identifier l'espèce (Negron et al., 2022) (figure 8). L'identification morphologique d'espèce n'a pas été faite dans cette étude car la méthode moléculaire, effectuée en parallèle, permettait déjà de déterminer l'espèce. De plus, la disponibilité

limitée en sang nous a poussé à réduire les quantités de moitié (0,5 mL de sang total et 4,5 mL de formol) afin d'économiser le reste du sang pour la PCR, sans que cela n'ait d'impact sur le résultat du test (Negron et al., 2022).

C'est une méthode rapide et simple, dont certains vétérinaires s'inspirent en cas de suspicion d'une infestation par *Dirofilaria immitis*, la différence étant qu'ils observent au microscope un frottis sanguin non concentré (pas de centrifugation).

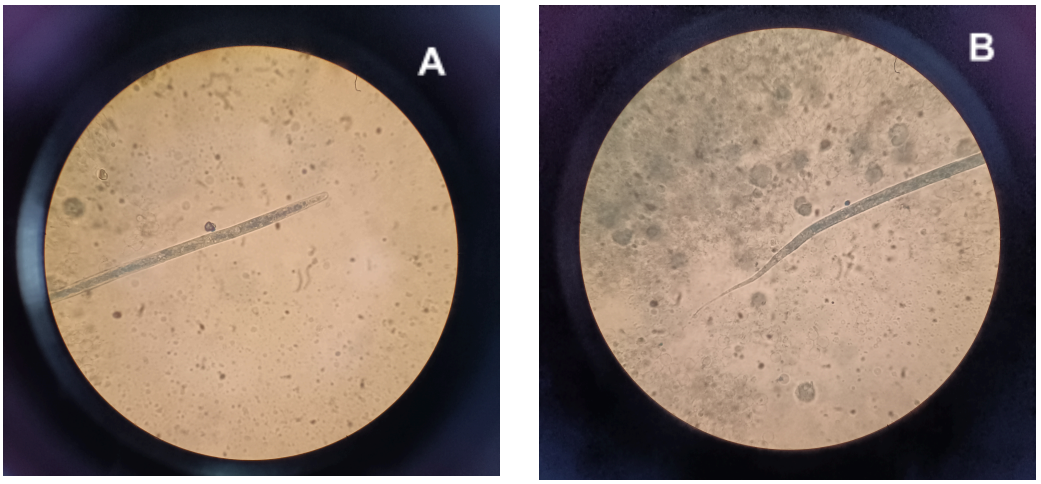

Fig 8: Microfilaires de *Dirofilaria immitis* au microscope optique, grossissement x100 (A: extrémité céphalique; B: extrémité caudale) - Source personnelle

2.3. Analyses statistiques

On a considéré qu'un chien était positif à *D. immitis* si au moins l'une des méthodes diagnostic, à savoir si le Snap Test 4Dx® , la PCR et la méthode de Knott Test modifié avait donné un résultat positif. Cette prévalence apparente de la dirofilariose a été calculée, ainsi que son intervalle de confiance à 95%, à l'aide du logiciel Epitools - Ausvet (https://epitools.ausvet.com.au).

De la même manière que pour l'étude 2022, une régression logistique a été réalisée pour identifier les facteurs de risque de dirofilariose. Les variables réponses de cette régression étaient les résultats du test (négatif ou positif). Les variables explicatives testées comprenaient le sexe (mâle ou femelle), le statut reproducteur (stérilisé ou entier), l'âge (moins de 2 ans, de 2 à 6 ans, plus de 6 ans), la zone du prélèvement (Est, Ouest, Nord, Sud et Inconu, correspondant respectivement aux intercommunalités CIREST, TCO, CINOR, CIVIS et à l'absence de réponse sur le questionnaire), le motif de consultation (stérilisation ou autres motifs comprenant vaccination, maladie infectieuse, autres), la présence ou non de tiques, la réalisation d'un traitement préventif pour la dirofilariose (régulier, irrégulier/jamais ou ne sait pas), la réalisation d'un traitement acaricide (régulier, irrégulier/jamais ou ne sait pas) et le mode de vie (population A: promené en laisse, confiné jardin et maison, confiné maison ; population B: divagant ; population C: errant, historique inconnu, non renseigné). Concernant la zone de provenance, il s'agit de différencier la variable "zone inconnue" de cette étude 2023 avec celle de l'étude 2022. En effet ici, l'absence de réponse sur la fiche commémorative peut être liée à la prise en charge du chien par une association, mais aussi à un oubli de renseignement auprès du propriétaire.

Les analyses statistiques ont ensuite été réalisées sur le logiciel R Studio (R Core Team, 2021). De la même manière que pour l'enquête rétrospective 2022 les facteurs de risque ont été identifiés à l'aide d'une analyse univariée puis d'une régression logistique multivariée.

III. Résultats

1. Etude rétrospective 2022

1.1. Analyse descriptive

Entre le 1er janvier 2022 et le 31 décembre 2022, 1265 chiens ont eu un test de diagnostic rapide Snap Test 4Dx® dans les huit cliniques vétérinaires et les trois associations interrogées. L'analyse descriptive de l'échantillon selon les variables d'intérêt sélectionnées est présentée dans le tableau 4.

Tab 4: Analyse descriptive de l'échantillon selon les variables d'intérêt - Etude 2022

Variable	Catégorie	Nombre de chiens	Proportion dans la population
Population totale	**-**	**1265**	**100%**
Sexe	Femelle	707	55,89%
	Mâle	558	44,11%
Statut de stérilisation	Stérilisé	292	23,08%
	Entier	973	76,92%
Secteurs	Nord	72	5,69%
	Sud	172	13,60%
	Est	101	7,98%
	Ouest	349	27,59%
	Inconnu	571	45,14%
Âge	< 2 ans	570	45,06%
	2 à 6 ans	338	26,72%
	> 6 ans	321	25,38%
Symptômes	Absence	767	60,63%
	Présence	498	39,37%

1.2. Estimation de la prévalence

La prévalence réelle de la dirofilariose cardiaque sur la population totale interrogée a été estimée à 13,55% (IC 95%: 11,76 - 15,57). Les séroprévalences de l'ehrlichiose et de l'anaplasmose étaient respectivement de 15,82% (IC 95%: 13,61 - 18,25) et de 3,91% (IC 95%: 2,73 - 5,39).

1.3. Facteurs de risques

a. Dirofilariose

Comme précisé dans le Tableau 5, l'analyse univariée a permis d'identifier deux variables présentant une p-value <0,2 : "Secteurs" et "Âge".

Tab 5: Proportions de chiens positifs selon les variables d'intérêt et p-value associée ; les p-value inférieures à 0,2 sont en gras - Etude 2022

		Dirofilariose		**Ehrlichiose**		**Anaplasmose**	
Variable	**Catégorie**	**Proportion de positifs**	**p-value**	**Proportion de positifs**	**p-value**	**Proportion de positifs**	**p-value**
Sexe	Femelle	13,72%	0,63	18,95%	**0,061**	5,23%	1
	Mâle	12,72%		15,59%		5,2%%	
Statut de stérilisation	Stérilisé	10,96%	0,35	26,37%	**1,728e-05**	5,14%	0,35
	Entier	13,28%		14,80%		5,24%	
Secteurs	Nord	8,33%	**0,016**	13,89%	**0,068**	1,39%	**0,07**
	Sud	8,72%		16,28%		1,16%	
	Est	17,82%		7,92%		2,97%	
	Ouest	10,60%		20,92%		5,16%	
	Inconnu	16,11%		17,86%		7,36 %	
Âge	< 2 ans	9,47%	**0,0054**	9,30%	**<2,2e-16**	4,56%	0,36
	2 à 6 ans	15,89%		18,05%		6,51%	
	> 6 ans	15,09%		30,22%		4,36%	
Symptômes	Absence	13,45%	0,91	14,73%	**0,0038**	5,74%	0,54
	Présence	13,17%		21,69%		4,42%	

L'établissement du modèle minimal adéquat (AIC le plus faible) lors de l'analyse multivariée par régression logistique a ensuite permis de retenir 2 variables explicatives qui constituent les facteurs de risque de dirofilariose : la zone géographique et l'âge. Ainsi, les chiens dont le lieu de vie ou de capture était inconnu ("Zone inconnue"), car prélevés dans le cadre de prise en charge par les associations qui ne relevaient pas cette information, avaient un risque de dirofilariose statistiquement significativement supérieur au risque des individus vivants dans le zone Nord (OR = 2,77, IC95% = 1,22 - 7,50) qui, eux mêmes, n'avaient pas un risque statistiquement significativement différents de ceux vivants dans les autres zones (Tableau 6). De plus, par rapport aux individus de moins de 2 ans, les chiens ayant entre 2 et 6 ans sont associés à un OR de 2,02 (IC95%: 1,33 - 3,08) et ceux de plus de 6 ans ont un risque encore plus élevé, associé à un OR de 2,73 (IC95%: 1,71 - 4,36).

Tab 6: Odds Ratio et intervalle de confiance 95% pour la dirofilariose, l'ehrlichiose et l'anaplasmose-Etude 2022

		Dirofilariose	**Ehrlichiose**	**Anaplasmose**
Variable	**Catégorie**	**Odds Ratio (IC 95%)**	**Odds Ratio (IC 95%)**	**Odds Ratio (IC 95%)**
Sexe	Femelle	Non significatif	*Référence*	Non significatif
	Mâle		0,82 (0,59 - 1,13)	
Statut de stérilisation	Stérilisé	Non significatif	*Référence*	Non significatif
	Entier		0,58 (0,40 - 0,85)	
Secteurs	Nord	*Référence*	*Référence*	*Référence*
	Sud	1,02 (0,39 - 2,98)	1,32 (0,58 - 3,22)	0,82 (0,07 - 17,33)
	Est	2,34 (0,91 - 6,79)	0,62 (0,21 - 1,77)	2,11 (0,01 - 43,19)
	Ouest	1,27 (0,54 - 3,47)	2,04 (0,97 - 4,72)	3,93 (0,79 - 71,31)
	Inconnu	2,77 (1,22 - 7,50)	5,08 (2,26 - 12,57)	6,04 (1,25 - 109,04)
Âge	< 2 ans	*Référence*	*Référence*	Non significatif
	2 à 6 ans	2,02 (1,33 - 3,08)	2,54 (1,68 - 3,87)	
	> 6 ans	2,73 (1,71 - 4,36)	5,37 (3,42 - 8,53)	
Symptômes	Absence	Non significatif	*Référence*	Non significatif
	Présence		1,72 (1,12 - 2,67)	

b. Ehrlichiose

L'analyse univariée a permis d'identifier cinq variables présentant une p-value <0,2 : "Sexe", "Statut de stérilisation", "Secteurs", "Âge" et "Symptômes" (Tableau 5). Les résultats, présentés dans le Tableau 6, suggèrent que les chiens entiers présentent un risque statistiquement significativement moins élevé d'être positif à *Ehrlichia canis* que les chiens stérilisés (OR = 0,58 ; IC 95%: 0,40 - 0,85). Comme pour la dirofilariose, l'absence d'information sur la zone de provenance du chien est associée à un OR de 5,08 (IC 95%: 2,26 - 12,57) tandis que les Odds-Ratio des autres catégories de la variable secteurs sont non significatifs. De plus, par rapport aux individus de moins de 2 ans, les chiens ayant entre 2 et 6 ans sont associés à un OR de 2,54 (IC 95%: 1,68 - 3,87) et ceux de plus de 6 ans ont un risque encore plus élevé, associé à un OR de 5,37 (IC 95%: 3,42 - 8,53). Enfin, par rapport aux chiens dont le Snap Test 4Dx® a été réalisé sans symptôme évocateur de la maladie, les chiens symptomatiques présentent un risque associé à un OR de 1,72 (IC 95%:1,12 - 2,67). En revanche, le sexe du chien ne constitue pas un facteur de risque significatif.

c. Anaplasmose

Etant donnée la faible quantité de chiens positifs à l'anaplasmose dans la population interrogée (n<5), la sélection des variables s'est faite manuellement en ascendant et elle a permis d'identifier le modèle minimal présentant l'AIC le plus faible : celui avec la variable "Secteurs" seule. Ainsi, les chiens dont le lieu de vie ou de capture était inconnu ("Zone inconnue"), car prélevés dans le cadre de prise en charge par les associations qui ne relevaient pas cette information, avaient un risque d'anaplasmose statistiquement significativement supérieur au risque des individus vivants dans le zone Nord (OR =

6,04, IC95% = 1,25 - 109,04) qui, eux mêmes, n'avaient pas un risque statistiquement significativement différents de ceux vivants dans les autres zones (Tableau 6).

2. Etude prospective 2023

2.1. Analyse descriptive de l'échantillon

Entre le 15 janvier 2023 et le 18 août 2023, 789 chiens et chats ont été prélevés (kit avec au moins l'un des prélèvements collecté) dans 18 cliniques et dispensaires vétérinaires partenaires. Parmi eux, 401 chiens ont eu un prélèvement sanguin, ils constituent notre échantillon d'intérêt. L'analyse descriptive de l'échantillon selon les variables d'intérêt sélectionnées est présentée dans le tableau 7.

Tab 7: Analyse descriptive de l'échantillon prélevé selon les variables d'intérêt - Etude 2023

Variable	Catégorie	Nombre de chiens	Proportion dans la population
Population totale	**-**	**401**	**-**
Sexe	Femelle	244	60,85%
	Mâle	157	39,15%
Statut de stérilisation	Stérilisé	33	8,23%
	Entier	368	91,78%
Secteurs	Nord	216	53,87%
	Est	3	0,75%
	Ouest	144	35,91%
	Sud	28	6,98%
	NA	10	2,49%
Âge	< 2 ans	135	33,67%
	2 à 6 ans	146	36,41%
	> 6 ans	97	24,1%
Raison d'admission	Stérilisation	320	79,80%
	Autre	81	20,20%
Présence de tiques	Oui	33	8,23%
	Non	368	91,77%
Traitement préventif dirofilariose	Régulier	79	19,70%
	Irrégulier/Jamais	207	51,62%
	Ne sait pas	115	28,67%
Traitement acaricide	Récent	139	34,66%
	Irrégulier/jamais	125	31,17%
	Ne sait pas	137	34,17%
Mode de vie	Population A	222	55,36%
	Population B	71	17,71%
	Population C	108	26,93%

2.2. Prévalences observées

Un certain nombre de prélèvements n'ont pas pu être analysés par chacun des tests du fait de la trop faible quantité de sang prélevé (variant entre 0,1 et 3 mL). Comme illustré dans le tableau 8, une majorité des prélèvements a été analysée par PCR et Knott Test : sur les 401 prélèvements sanguins, 59 ont été analysés avec un Snap Test 4Dx®, 366 avec un Knott Test et 347 par PCR.
Le nombre de chiens testés et positifs à *Dirofilaria immitis* par méthode de diagnostic est présenté dans le tableau 8. A noter que sur les 347 échantillons sanguins analysés par PCR, 31 ont été considérés comme douteux pour la détection de *D. immitis* et 16 comme positifs. La distinction s'est faite sur la valeur de Ct (cycle de seuil): une amplification au-delà de 30 cycles a été évaluée douteuse. Parmi les échantillons douteux, 21 étaient négatifs par Knott Test, un négatif par Snap Test non analysé par Knott et un positif par Snap Test, les huit autres n'ayant pas pu être analysés par d'autres méthodes. Pour l'analyse statistique, les échantillons douteux par PCR ont donc été considérés négatifs.

Tab 8: Nombre de chiens testés et positifs à *Dirofilaria immitis* pour chaque méthode diagnostic - Etude 2023

Méthode diagnostic	**Nombre de chiens testés**	**Nombre de chiens positifs à *Dirofilaria immitis***
qPCR uniquement	347	16 (31 douteux)
Knott Test uniquement	366	13
Snap Test 4Dx® uniquement	59	11
qPCR ET Knott Test	317	21
qPCR ET Snap Test 4Dx®	54	12
Knott Test ET Snap Test 4Dx®	52	12
qPCR ET Knott Test ET Snap Test 4Dx®	49	11
qPCR OU Knott Test OU Snap Test 4Dx®	401	25

En considérant qu'un chien est infecté par *D. immitis* si au moins l'une des méthodes de diagnostic s'est avérée positive, la combinaison de tous ces tests suggère que 25 chiens étaient positifs, conduisant à une prévalence apparente de 6,23% (IC 95%: 4,26 - 9,04) au sein de l'échantillon analysé.

Les résultats des méthodes d'analyse des 25 chiens ayant été testés positifs par au moins un des tests utilisés dans l'étude 2023 des facteurs de risque de dirofilariose sont détaillés dans le tableau 9 (NA: test non réalisé).

Tab 9: Résultats des trois méthodes de diagnostic de *Dirofilaria immitis* pour les 25 chiens considérés comme positifs pour l'étude des facteurs de risque - Etude 2023

Echantillon	qPCR	Knott Test	SNAP
ECH1	Pos	Pos	NA
ECH2	Pos	Neg	Pos
ECH3	Neg	Neg	Pos
ECH4	Pos	Pos	Pos
ECH5	Pos	Neg	Neg
ECH6	Neg	Pos	Neg
ECH7	Pos	Pos	Pos
ECH8	Pos	Neg	NA
ECH9	NA	Pos	NA
ECH10	Pos	Neg	NA
ECH11	Pos	Pos	NA
ECH12	Neg	Pos	NA
ECH13	Pos	Neg	NA
ECH14	Pos	Pos	NA
ECH15	Pos	Pos	NA
ECH16	Pos	Neg	Pos
ECH17	Pos	Pos	Pos
ECH18	Pos	Pos	Pos
ECH19	Neg	Pos	NA
ECH20	Neg	Neg	Pos
ECH21	Douteux	NA	Pos
ECH22	NA	Neg	Pos
ECH23	Neg	Neg	Pos
ECH24	Pos	Pos	NA
ECH25	Pos	NA	NA

2.3. Facteurs de risques

L'analyse univariée a permis d'identifier trois variables présentant une p-value <0,2 : "Âge", "Traitement préventif dirofilariose" et "Traitement acaricide" (tableau 10).
L'établissement du modèle minimal adéquat lors de l'analyse multivariée par régression logistique a ensuite permis de retenir deux variables explicatives "Âge" et "Traitement acaricide", présentant l'AIC le plus faible. Ainsi, les chiens de plus de 6 ans avaient un risque de dirofilariose statistiquement significativement supérieur au risque des individus de moins de 2 ans (OR = 5,41, IC95% = 1,61 - 24,67) qui, eux mêmes, n'avaient pas un risque statistiquement significativement différents de ceux ayant entre 2 et 6 ans. De plus, par rapport aux chiens régulièrement traités contre les tiques, ceux qui ne le sont jamais ou irrégulièrement n'ont pas un risque significativement différent.

Tab 10: Proportions de chiens positifs selon les variables d'intérêt et p-value associée; les p-value inférieures à 0,2 sont en gras - Etude 2023

Variable	Catégorie	Nombre de chiens positifs	Proportion dans la catégorie	p-value
Sexe	Femelle	14	5,96%	0,76
	Mâle	11	7,01%	
Statut de stérilisation	Stérilisé	1	30,30%	0,67
	Entier	24	6,68%	
Secteurs	Nord	14	6,48%	0,90
	Est	0	0%	
	Ouest	9	6,25%	
	Sud	1	3,57%	
	NA	1	10,0%	
Âge	< 2 ans	3	2,22%	**0,01**
	2 à 6 ans	11	7,53%	
	> 6 ans	11	11,34%	
Raison d'admission	Stérilisation	18	5,63%	0,46
	Autre	7	8,64%	
Présence de tiques	Oui	1	30,30%	0,68
	Non	24	6,52%	
Traitement préventif dirofilariose	Régulier	2	2,53%	**0,19**
	Irrégulier/Jamais	17	8,21%	
	Ne sait pas	6	5,21%	
Traitement acaricide	Récent	6	4,32%	**0,09**
	Irrégulier/jamais	13	2,40%	
	Ne sait pas	6	4,38%	
Mode de vie	Population A	13	5,86%	0,84
	Population B	4	5,64%	
	Population C	8	7,40%	

IV. Discussion

1. Facteurs de risque des maladies vectorielles étudiées

Grâce à l'étude rétrospective sur la dirofilariose et l'ehrlichiose, ainsi qu'à l'étude prospective sur la dirofilariose, nous avons pu montrer que l'âge était un facteur de risque constant d'infection. Ces résultats sont cohérents avec la littérature. Par exemple, Orr et al. (2020) et Khedri et al. (2014) ont montré que que les chiens de plus de 5 ans, en Australie et en Iran respectivement, avaient un risque significativement plus élevé d'être positifs à *D. immitis* que les chiens des autres catégories d'âge. Cela a également été mis en avant pour l'ehrlichiose dans plusieurs études (Pérez-Macchi et al., 2019; Piantedosi et al., 2017). Il est important de dire que notre étude rétrospective sur *E. canis* se base sur les résultats d'une méthode indirecte, à la recherche des anticorps dirigés contre le pathogène. Un résultat positif peut donc indiquer une infection passée, les anticorps pouvant persister plusieurs mois à plusieurs années dans le sang (Harrus et al., 1998). En prenant en compte ce facteur, il est donc logique d'avoir des prévalences plus élevées avec l'âge qui augmente puisqu'un chien âgé a plus de risque d'être exposé au moins une fois à *E. canis* qu'un chien jeune.

Ensuite, l'étude rétrospective met en lumière un facteur de risque inédit pour les trois maladies: la provenance ou le lieu de capture "inconnu". Cela va dans le sens de notre hypothèse initiale selon laquelle les chiens non médicalisés avec un mode de vie à l'extérieur subissent une exposition plus élevée aux vecteurs, et donc ont plus de risque d'être positifs à des pathogènes à transmission vectorielle, que les chiens de propriétaire. Les études des facteurs de risque pour chacun des pathogènes, mentionnées dans notre première partie bibliographique, montrent également que les chiens errants et non médicalisés sont plus à risque. Il est cependant compliqué d'attribuer une population (A, B ou C) aux chiens de l'étude 2022 à cause du manque d'informations dans les bases de données et donc de l'ignorance de l'historique de l'animal (né errant, abandonné etc.).

Pour l'ehrlichiose, on peut se questionner sur les autres facteurs de risques mis en avant. Les résultats suggèrent que les chiens stérilisés présentent un risque significativement plus élevé d'être positif à *Ehrlichia canis* que les chiens entiers. Ce risque n'a, jusqu'à présent, jamais été identifié dans la littérature. La fiabilité des informations concernant le statut de stérilisation peut donc être mise en question, car les chiens peuvent être stérilisés entre le moment où ils sont admis pour le test rapide et le moment où les données commémoratives sont récoltées. De plus, par rapport aux chiens dont le Snap Test 4Dx® a été réalisé sans symptôme évocateur de la maladie, les chiens symptomatiques présentaient un risque supplémentaire d'ehrlichiose. Les phases aiguë et chronique sévère présentent des symptômes assez évocateurs d'ehrlichiose. En réalité, ce sont principalement la pâleur des muqueuses, l'état fébrile et les saignements qui alertent les vétérinaires et les poussent à réaliser un test rapide. La probabilité d'avoir un résultat positif à *E. canis* sur un chien malade est donc augmentée.

Enfin, l'étude prospective 2023 a permis d'identifier un potentiel nouveau facteur de risque de dirofilariose: l'absence ou l'administration irrégulière de traitement acaricide sont associées à un Odds Ratio de 2,14 avec un intervalle de confiance cependant non significatif (IC 95%: 0,79 - 6,42). Même si la transmission de *Dirofilaria immitis* se fait par un vecteur moustique, on peut considérer que les chiens recevant régulièrement un traitement acaricide sont des chiens médicalisés et donc susceptibles de recevoir d'autres traitements, par exemple un traitement répulsif contre les moustiques ou un traitement préventif à base de lactones macrocycliques.

2. Implications pour la gestion

Ces résultats sont intéressants dans la mesure où ils permettent d'orienter les vétérinaires et les associations vers un discours de prévention et de diagnostic plus poussé pour lutter contre le portage et la transmission de ces maladies vectorielles.

D'une part, il est crucial que les propriétaires de chiens à La Réunion (et ceux de France métropolitaine ayant prévu de séjourner sur l'île avec leur chien) soient informés sur l'importance de l'administration de traitements préventifs réguliers. D'autre part, puisque l'âge est le facteur de risque prédominant de dirofilariose, dans les deux études, et d'ehrlichiose dans l'étude 2022, il peut être intéressant de conseiller aux vétérinaires de renforcer la surveillance et de proposer un test rapide aux chiens âgés. En effet, parmi la catégorie de chiens de plus de six ans, la proportion de positifs à *D. immitis* est de 15,09% dans l'étude rétrospective et de 11,34% dans la prospective. Pour *E. canis*, ce sont 18,05% des individus de 2 à 6 ans et 30,22% des plus de 6 ans qui sont positifs. Avec la forte pression parasitaire que subissent les animaux de l'île de la Réunion, il n'est pas étonnant de constater des infections chez des chiens correctement médicalisés et avec une interaction limitée avec leur environnement, même si elles sont plus rares. Déjà réalisé en routine par les associations qui prennent en charge les chiens errants (possiblement récemment abandonnés par leurs propriétaires) et qui les font adopter, le test rapide peut donc être également recommandé aux propriétaires de chiens confinés et/ou promenés en laisse.
Enfin, la connaissance des symptômes, même s'ils sont peu spécifiques, et leur considération par les professionnels vétérinaires permettent un diagnostic et une prise en charge précoces des maladies, augmentant les chances de réussite des traitements.

3. Limites de l'étude

3.1. Représentativité et biais de l'échantillon analysé pour l'étude 2022

Il est intéressant de comparer la population de 1265 chiens de l'étude 2022 avec la caractérisation générale des chiens de la Réunion, selon le rapport de Saint Paul (EPLEFPA-CFPPA, 2018). Même si ce rapport se veut représentatif de la population générale des chiens de l'île, il n'est pas à considérer comme une référence absolue car basé en partie sur des observations terrains des chiens (notamment errants, qui sont difficilement qualifiables) et des modèles mathématiques.

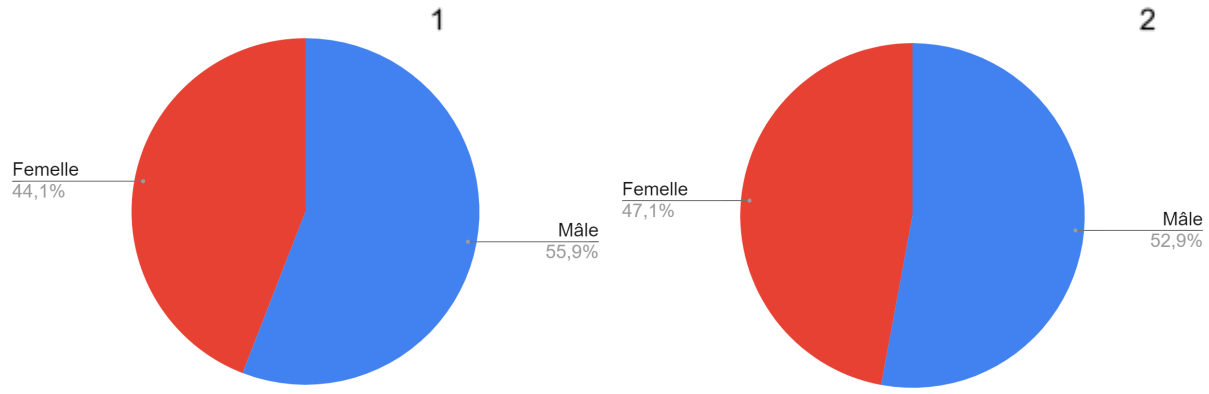

Fig 9: Répartition des chiens selon leur sexe (1: Echantillon étudié 2022; 2: Population générale)

Comme illustré en Figure 9, il semble que notre échantillon soit assez représentatif de la population générale en matière de répartition selon le sexe du chien. De plus, selon le rapport de l'EPL, le taux de stérilisation des populations confinées et divagantes est estimé à 32,2%. On peut estimer que ce taux est abaissé dans la population totale de chiens de l'île par les chiens errants, principalement entiers. Ainsi, notre échantillon, constitué à 23,08% de chiens stérilisés, pourrait être représentatif de la population générale.

Les caractéristiques de l'échantillon et la discussion autour des facteurs de risques permettent de mettre en lumière plusieurs biais statistiques.

Biais de sélection:

Même si certaines caractéristiques de la population échantillonnée peuvent être similaires à celles de la population générale, il existe un biais de sélection important. D'une part, la majorité des cliniques vétérinaires de l'île a été contactée mais une grande partie n'a pas pû être interrogée, par manque d'intérêt pour l'étude ou de par l'absence de réponse à nos sollicitations. Il manque notamment les bases de données de cliniques dans l'intercommunalité CASUD. D'autre part, l'échantillon analysé par le test rapide présente une proportion proche de 40% de chiens dont les symptômes étaient évocateurs d'une des maladies étudiées. Les résultats ont montré qu'un chien testé car symptomatique avait un risque significativement plus élevé de présenter un test positif qu'un chien dont le test aurait été réalisé en dépistage. Cette information est en faveur d'une surestimation possible de la prévalence réelle de chacune des trois maladies recherchées.

Biais d'information:

La grande variabilité de logiciels informatiques et de vétérinaires a conduit à une hétérogénéité dans les informations extraites. Certains logiciels sont mieux conçus que d'autres pour optimiser la transmission d'informations entre vétérinaires au sein d'une même clinique. Ainsi, pour certains logiciels, un fichier joint avec le résultat explicite du test rapide était lié à la fiche animal, tandis que pour d'autres, c'était le vétérinaire qui indiquait lui-même le résultat dans la partie "notes". De nombreuses fiches ne mentionnaient pas les résultats du test. Dans ce cas de figure, il a été considéré qu'il était négatif. Or, on peut légitimement se demander si certains résultats n'étaient tout simplement pas indiqués par le vétérinaire, par manque de temps ou par habitude, ce qui peut considérablement sous-estimer la prévalence observée, notamment pour l'ehrlichiose et l'anaplasmose. L'analyse des risques est par conséquent moins fiable : cela conduit à des intervalles de confiance très larges (par exemple, le nombre de chiens diagnostiqués positifs à *A. platys* par le test est très restreint).

3.2. Représentativité et biais de l'échantillon analysé pour l'étude 2023

De la même manière, notre échantillon de 401 chiens a été comparé avec la population générale des chiens de la Réunion, selon le rapport de Saint Paul (EPLEFPA-CFPPA, 2018).

Les proportions de chiens selon leurs modes de vie de notre échantillon sont assez représentatives de celles que l'on retrouve à la Réunion. La population A est légèrement sous-représentée dans notre échantillon (figure 10).

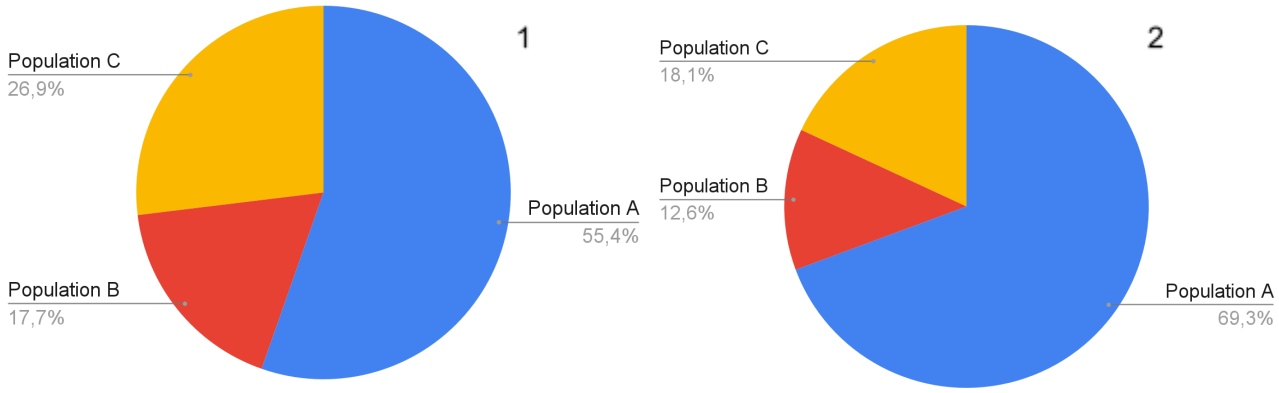

Fig 10: Répartition des chiens selon leur population (1: Échantillon étudié 2023; 2: Population générale)

Dans la population de notre échantillon, on peut noter une proportion plus importante de femelles (figure 11). Cette différence peut s'expliquer par le nombre important de chiens admis pour stérilisation dans notre échantillon, qui sont le plus souvent des femelles.

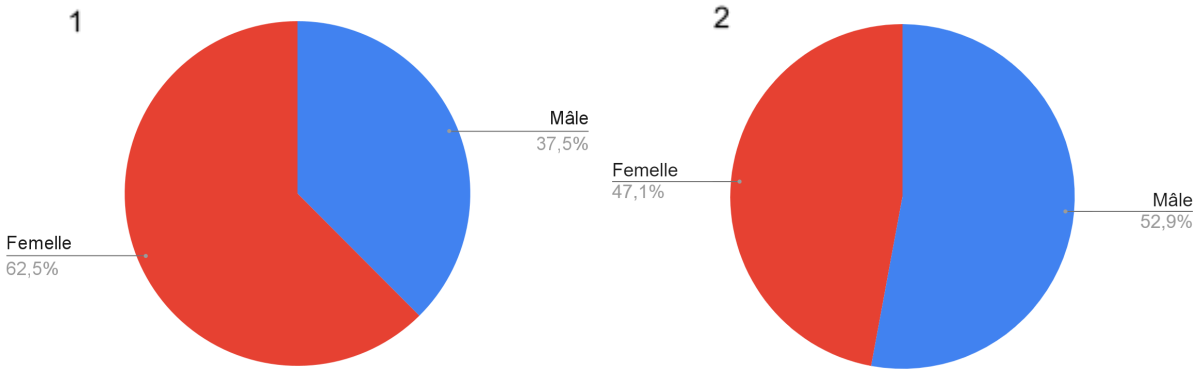

Fig 11: Répartition des chiens de la population selon leur sexe (1: Echantillon étudié 2023; 2: Population générale)

Enfin, selon le rapport de Saint-Paul, 32,2% de la population A + B de l'île serait stérilisée. Dans notre échantillon, seuls 9,5% des chiens de ces populations sont stérilisés. Cette différence est dûe à la forte proportion de chiens admis pour stérilisation dans notre échantillon, et donc considérés comme entiers.

De la même manière que pour l'étude 2022, il est possible de mettre en avant plusieurs biais statistiques.

Biais de sélection:

Il a été demandé aux vétérinaires partenaires de prélever aléatoirement les chiens qu'ils recevaient au cabinet. Cependant, les prélèvements sanguins étant plus faciles à réaliser sur animal anesthésié et la campagne de stérilisation REVEZ ayant contribué à augmenter la proportion d'animaux admis pour stérilisation, les chiens de cette catégorie étaient très majoritaires (79,8%) dans la population

échantillonnée. Étant donné que l'âge constitue un facteur de risque pour la dirofilariose, on pourrait s'attendre à ce que le biais de sélection provoque une sous-estimation de la prévalence, dû à une sur-représentation des animaux jeunes. En effet, au sein de l'échantillon de chiens admis pour stérilisation, la proportion de chiens âgés est plus faible (132 chiens de moins de 2 ans, 138 chiens entre 2 et 6 ans et 50 chiens de plus de 6 ans).

Biais géographique:

La population échantillonnée n'est pas répartie géographiquement de manière homogène: seuls 28 prélèvements proviennent de la zone Sud et trois de la zone Est. Or, l'est de l'Île est caractérisé par un climat plus humide avec de fortes précipitations, propice à la prolifération des moustiques vecteurs, ainsi qu'une proportion plus importante de chiens errants et donc non médicalisés, potentiellement réservoir de *Dirofilaria immitis*. On peut donc s'attendre à une sous-estimation de la prévalence observée.

Biais d'information:

Les données commémoratives dépendant du vétérinaire qui remplit la fiche, il est possible que les informations récoltées ne soient pas tout à fait représentatives de la réalité du terrain et homogènes entre cliniques. Le mode de vie du chien est compliqué à standardiser notamment lors d'adoption ou d'abandon récents. En cas d'absence de commémoratif, on s'attend également à ce que l'âge de certains chiens ait été estimé par les vétérinaires. De plus, le manque d'informations a conduit à considérer l'absence de réponse comme une variable à part entière "ne sait pas" pour le traitement acaricide et le traitement préventif contre la dirofilariose, ainsi que pour la zone de provenance. Cela a un impact certain sur la qualité des analyses statistiques.

3.3. Comparaison des trois méthodes de diagnostic

Comme le montre le tableau 8, la disparité entre les résultats des méthodes de diagnostic est assez marquante. Il est légitime d'émettre l'hypothèse de plusieurs erreurs lors de la notation des tubes: en effet, après centrifugation, de nouveaux tubes eppendorf sont annotés avec un code selon le modèle "X000", attribué à l'individu prélevé. La quantité importante d'échantillons manipulés ainsi qu'une mauvaise lecture de leur code lors de leur utilisation pour effectuer les manipulations en laboratoire peut causer une confusion.

La PCR est considérée comme la méthode de diagnostic avec la spécificité la plus importante comparée aux autres méthodes (Semat, 2016). De plus, l'identité de réplicons issus de trois des échantillons de notre étude 2023 a été confirmée *D. immitis* par séquençage génétique de Sanger.
Cependant, la manipulation des prélèvements sanguins lors de l'extraction de l'ADN peut être à l'origine d'une contamination entre un échantillon positif et les autres échantillons négatifs, ce qui entraîne des résultats faux positifs ou douteux. La sonde d'hydrolyse et les amorces utilisées dans le mélange pour la PCR, quand elles sont manipulées trop fréquemment, peuvent également être responsables d'un résultat faux positif. Enfin, les échantillons douteux pourraient provenir de chiens vraiment infectés mais avec une charge parasitaire très faible (animal en tout début d'infection ou en cours de traitement). La qualité de l'échantillon peut également être mise en cause (l'ADN se dégrade avec de mauvaises conditions de conservation).

Six chiens présentent un Knott Test négatif alors que la PCR associée est positive. Ce résultat discordant peut être justifié par la faible sensibilité du test Knott estimée autour de 85.71% par une étude (Ranjbar-Bahadori et al., 2007). Un biais d'observation est possible puisque les microfilaires peuvent ne pas être détectés au microscope par l'observateur. D'une part, la microfilarémie est périodique : maximale en fin de journée et minimale en début de journée. L'animal étant prélevé au

cours de la journée, on peut s'attendre à une microfilarémie moyenne, qui pourrait conduire à des faux négatifs (Ledesma and Harrington, 2011). D'autre part, il a été estimé que 20 à 30% des chiens infestés sont amicrofilarémiques (American Heartworm society, 2014), notamment lors de traitement avec des lactones macrocycliques ou encore lors d'infestations mono-parasitaires ou unisexes, plus rares. Cependant, même si les microfilaires sont éliminés, sans traitement adulticide les vers adultes peuvent rester dans l'organisme et perpétuer le cycle parasitaire, pouvant générer des résultats positifs par PCR.
De même, trois chiens ont été identifiés comme microfilarémiques par Knott Test alors que le résultat de la PCR était négatif. L'inconvénient de la technique de mise en évidence des microfilaires est son imprécision face au genre voire à l'espèce incriminée. Les microfilaires de *Dirofilaria immitis* peuvent être confondus avec d'autres espèces par l'observateur: *Acanthocheilonema reconditum* (250 à 288 µm) avec une queue en crochet, *Acanthocheilonema dracunculoides* (190 - 250 µm) qui présente une enveloppe, ou encore *Dirofilaria repens* dont l'extrémité caudale est filiforme incurvée et l'espace céphalique réduit et carré (Magnis et al., 2013). Une confusion avec des artefacts sur le frottis est également possible même si peu probable: la morphologie des microfilaires est assez claire. Une méthode de coloration histochimique, à des endroits spécifiques pour chaque espèce, permet de mettre en évidence les zones d'activité phosphatasique acide sur les microfilaires.

Un chien infesté par *Dirofilaria immitis* peut présenter un test rapide antigénique négatif (faux négatif) si les antigènes libérés par les vers adultes femelles ne sont pas détectés. Cela a été montré dans le cas de manque de maturité des femelles, avec un nombre restreint de vers adultes ou en présence de vers adultes mâles uniquement (Rishniw et al., 2012). Une mauvaise prise en compte des consignes par le manipulateur (temps d'attente, quantité de réactif) peut également être à l'origine d'un test faussé.
Une étude a démontré qu'il pouvait exister des réactions croisées avec *Angiostrongylus vasorum* et certains tests antigéniques à la recherche des antigènes de *D. immitis* qui conduiraient à des résultats faux positifs mais cela n'a pas été constaté pour le Snap Test 4Dx® (Schnyder and Deplazes, 2012). Enfin, il existerait également des réactions croisées entre les antigènes de *Spirocerca lupi* et le Snap Test Dirofilariose® seul (Aroch et al., 2015).

4. Perspectives

Evaluation de la spécificité du Snap Test 4Dx® en conditions de terrain

Dans le contexte de forte pression parasitaire qu'offre l'île de la Réunion, les vétérinaires disposant d'un endoscope observent très régulièrement des kystes oesophagiens, signes d'une infestation parasitaire par *Spirocerca lupi*. Sa prévalence sur l'île n'a jamais été évaluée mais elle est supposée très élevée. La littérature montre que ce nématode libère des antigènes proches de ceux de *Dirofilaria immitis*, pouvant conduire à des réactivités croisées à l'origine de résultats faux positifs chez certains tests antigéniques, mais cela n'a pas été objectivé chez le Snap Test 4Dx® (Aroch et al., 2015).
Le sondage auprès des cliniques vétérinaires de l'île de la Réunion a mis en avant que la très grande majorité des praticiens utilise ce Snap Test 4Dx® mais se questionne cependant sur sa sensibilité et sa spécificité. De plus, l'étude rétrospective 2022 a permis de constater que sur la patientèle canine totale de certaines cliniques interrogées, seuls 2 à 5% des chiens étaient diagnostiqués avec ce test rapide. Cela peut s'expliquer par le manque de moyen financier des propriétaires ou la méconnaissance des symptômes, peu spécifiques, des maladies.
Au vu du nombre insuffisant de Snap Test 4Dx® dont le résultat a été indiqué sur la fiche commémorative de l'étude 2023, il est difficile d'évaluer la sensibilité et la spécificité du test par rapport à d'autres méthodes de diagnostic en laboratoire. Dans ce contexte, un dialogue a été engagé avec le laboratoire pharmaceutique Idexx, un protocole d'étude a été proposé et une

demande d'appui financier a été demandé (annexe 3). L'objectif principal est de cibler une population de chiens positifs à *D. immitis* en systématisant l'utilisation du Snap Test 4Dx® (Lane et al., 2021), couplé avec un diagnostic de spirocercose par endoscopie à la recherche de kystes oesophagiens. Pour cela, les tests rapides seront distribués aux cliniques vétérinaires disposant d'un endoscope. Ainsi pour chaque test réalisé, le prélèvement sanguin sera conservé et analysé en qPCR et en Knott Test et le résultat de l'endoscopie sera connu. La spécificité du test rapide sera estimée par la méthode des classes latentes, précédemment décrite dans la littérature (Branscum et al., 2005). En l'absence de gold standard, la prévalence de *Dirofilaria immitis* sera estimée à l'aide d'une approche bayésienne décrite par (Joseph et al., 1995), en tenant compte du résultat des trois tests.
Le partenariat a été accepté en juillet 2023 et 300 Snap Test 4Dx® ont été offerts par le laboratoire. L'étude a déjà été amorcée en octobre 2023 et sera poursuivie sur l'année 2024.

Prévalence de Neospora caninum *et* Coxiella burnetii *chez les carnivores domestiques*

Une nouvelle perspective serait d'étudier le rôle des carnivores domestiques dans le portage et la transmission de deux agents infectieux d'intérêt en santé animale car impliqués dans des maladies abortives des ruminants: *Neospora caninum* et *Coxiella burnetii*. Après centrifugation du sang total des chiens et des chats de l'étude menée par le CIRAD, le plasma a été congelé et utilisé pour réaliser des tests ELISA de compétition à la recherche d'anticorps dirigés contre *N. caninum* (ID Screen® Neospora caninum Competition, IDVet) et ELISA indirect pour la détection des anticorps dirigés contre *C. burnetii* (ID Screen Q Fever Indirect Multispecies®, IDVet). Ainsi, 257 chiens ont été testés avec les deux kits et 136 chats ont été testés avec le kit fièvre Q. Les résultats n'ont malheureusement pas été concluants car les quelques prélèvements douteux ont été testés jusqu'à cinq fois avec un résultat différent à chaque fois. Plusieurs hypothèses ont été émises comprenant la qualité du prélèvement (plasma et non sérum, congelé puis décongelé) et la faisabilité du test de fièvre Q sur les chiens, car il est normalement destiné aux ruminants (bovins, ovins, caprins). Le laboratoire a été contacté et a affirmé que les deux tests peuvent être réalisés sur les chiens avec une bonne sensibilité et spécificité.
Dans ce cadre une perspective intéressante à explorer serait de réaliser des analyses PCR sur des écouvillons endométriaux ou sur des échantillons d'utérus (récolté lors d'ovario-hystérectomies), comme cela a été fait dans une autre étude (Anastácio et al., 2022).

Prévalence de Dirofilaria immitis *chez les chats*

Les chats sont de potentiels hôtes pour *D. immitis*, souvent asymptomatiques. Les stades larvaires ne se développent souvent pas jusqu'au stade adulte, et lorsque c'est le cas, le nombre d'adultes parasitant est faible (un à trois) (American Heartworm society, 2014). Cependant, une étude a montré que dans les zones d'enzootie où la prévalence canine est entre 5 et 10%, le risque que les chats soient infestés est présent (Litster and Atwell, 2008). Dans le cadre de notre étude 2023, plus de 300 chats ont été prélevés par les vétérinaires. Parmi eux, 201 prélèvements sanguins de chats ont d'ors et déjà été testés par la méthode de Knott à la recherche de microfilaires de *D. immitis*. Sur deux échantillons, des microfilaires ont été observés. Pour confirmer ou infirmer l'infestation de ces chats, il est prévu d'utiliser une autre méthode de diagnostic sur les culots de sang congelés: la PCR.

Investigation de présence d'autres espèces de filaires sur l'île

Les prélèvements visiblement positifs par Knott test devraient être testés par PCR ciblant d'autres espèces de filaires, notamment *Acanthocheilonema dracunculoides*, présente en Afrique de l'est (Lee et al., 2015; Noden and Soni, 2015; Szatmári et al., 2020).

Conclusion

Notre étude a permis de montrer que l'île de la Réunion abrite une population importante de chiens hôtes et réservoirs de trois pathogènes à transmission vectorielle : *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys*. Leur potentiel zoonotique avéré, ils constituent donc un risque non négligeable pour la santé animale et humaine sur lequel les vétérinaires et les propriétaires de chien se doivent d'être informés.

Des chiens divagants et errants, jusqu'à présent non étudiés à La Réunion, ont été ciblés par l'étude menée par le CIRAD grâce à la collaboration active des vétérinaires et des associations, notamment dans le cadre d'actions de soutien et de campagnes de stérilisation. L'hypothèse principale émise était que cette population avait un risque plus élevé d'être infectée par ces pathogènes. L'étude des facteurs de risque grâce aux données commémoratives de l'étude prospective a cependant infirmé cette hypothèse pour la dirofilariose. En revanche, l'étude rétrospective a montré que pour les trois pathogènes, le risque associé à la zone de vie "inconnue" est intimement lié à la prise en charge par une association et donc en faveur d'une considération des populations de chiens issus de la rue (abandonnés ou nés dans la rue) comme davantage à risque. Dans ce contexte et sans données plus précises, il est compliqué de conclure par rapport à ce facteur de risque. De plus, l'hypothèse d'un risque plus élevé augmentant avec l'âge a été confirmée pour *D. immitis* et *E. canis*. Enfin, un autre facteur de risque inédit a pû être mis en avant : le statut reproducteur "stérilisé" pour *E. canis*.

L'analyse descriptive des échantillons analysés met en lumière qu'un effectif plus important permettrait de s'affranchir de certains biais statistiques et conséquemment d'augmenter la puissance statistique de l'étude et d'avoir une meilleure modélisation du risque. Le modèle présente d'autres limites qui sont, entre autres, le manque d'information et la considération d'une non-réponse comme une variable à part entière.

Enfin, grâce à la banque de prélèvements encore disponible (plasma, culots sanguins de chats congelés), de nombreuses perspectives sont envisageables pour continuer à caractériser l'épidémiologie de nombreuses maladies (néosporose, fièvre Q, spirocercose) chez les carnivores domestiques de l'île de la Réunion et trouver des leviers de communication et de lutte, en partenariat avec les propriétaires, les vétérinaires et les services publics.

Bibliographie

Alhassan, A., Hove, P., Sharma, B., Matthew-Belmar, V., Karasek, I., Lanza-Perea, M., Werners, A.H., Wilkerson, M.J., Ganta, R.R., 2021. Molecular detection and characterization of Anaplasma platys and Ehrlichia canis in dogs from the Caribbean. Ticks Tick-Borne Dis. 12, 101727. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101727

American Heartworm society, 2014. Recommandations actuelles pour la prévention, le diagnostic et la gestion de la dirofilariose cardiaque (Dirofilaria immitis) chez le chien.

Anastácio, S., Anjos, S., Neves, S., Neves, T., Esteves, P., Craveiro, H., Madeira, B., Pires, M. dos A., Sousa, S., da Silva, G., Vilhena, H., 2022. Coxiella burnetii in Dogs and Cats from Portugal: Serological and Molecular Analysis. Pathogens 11, 1525. https://doi.org/10.3390/pathogens11121525

ANSES, 2018. Hiérarchisation des dangers sanitaires d'intérêt présents ou susceptibles d'être introduits à La Réunion chez les chiens et les chats ».

Aroch, I., Rojas, A., Slon, P., Lavy, E., Segev, G., Baneth, G., 2015. Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of Dirofilaria immitis antigens with Spirocerca lupi in dogs with benign esophageal spirocercosis. Vet. Parasitol. 211, 303–305. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.010

Arraga - Alvarado, C., 1992. Ehrlichiosis canina en Maracaibo, Estado Zulia—Venezuela: reporte de 55 casos 2: 41-52.

Arraga-Alvarado, C., Montero-Ojeda, M., Bernardoni, A., Anderson, B.E., Parra, O., 1996. [Human ehrlichiosis: report of the 1st case in Venezuela]. Invest. Clin. 37, 35–49.

Barrantes-Gonzalez, A.V., Jimenez-Rocha, A.E., Romero-Zuniga, J.J., Dolz, G., 2016. Serology, molecular detection and risk factors of *Ehrlichia canis* infection in dogs in Costa Rica. TICKS TICK-BORNE Dis. 7, 1245–1251. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.006

Beall, M.J., Alleman, A.R., Breitschwerdt, E.B., Cohn, L.A., Couto, C.G., Dryden, M.W., Guptill, L.C., Iazbik, C., Kania, S.A., Lathan, P., Little, S.E., Roy, A., Sayler, K.A., Stillman, B.A., Welles, E.G., Wolfson, W., Yabsley, M.J., 2012. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. Parasit. Vectors 5, 29. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-29

Beugnet, F., Bima Blum, S., Chardonnet, L., 1993. Etude épidémiologique de la dirofilariose cardiaque du chien en Nouvelle-Calédonie : choix d'une méthode diagnostique. Rev. Médecine Vét.

Beugnet, F., Latour, S., Chenal, L., Malivert, B., Viallard, J., 2002. Seroprevalence of canine monocytic ehrlichiosis on Réunion. Vet. Rec. 150, 636–637. https://doi.org/10.1136/vr.150.20.636

Bogicevic, N., Radovanovic, M.E., Vasic, A., Manic, M., Maric, J., Vojinovic, D., Rogozarski, D., Gligic, A., Valcic, M., 2017. Seroprevalence of Ehrlichia canis infection in stray dogs from Serbia. Maced. Vet. Rev. 40, 37–42. https://doi.org/10.1515/macvetrev-2016-0096

Borthakur, S.K., Deka, D.K., Islam, S., Sarma, D.K., Sarmah, P.C., 2015. Prevalence and molecular epidemiological data on Dirofilaria immitis in dogs from Northeastern States of India. ScientificWorldJournal 2015, 265385. https://doi.org/10.1155/2015/265385

Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. Prev. Vet. Med. 68, 145–163. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.12.005

Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Hancock, S.I., 1998. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia equi, Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. J. Clin. Microbiol. 36, 2645–2651. https://doi.org/10.1128/JCM.36.9.2645-2651.1998

Breitschwerdt, E.B., Hegarty, B.C., Qurollo, B.A., Saito, T.B., Maggi, R.G., Blanton, L.S., Bouyer, D.H., 2014. Intravascular persistence of Anaplasma platys, Ehrlichia chaffeensis, and Ehrlichia ewingii DNA in the blood of a dog and two family members. Parasit. Vectors 7, 298. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-298

Burnham, K.P., Anderson, D.R. (Eds.), 2004. Model Selection and Multimodel Inference. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/b97636

Chae, J.-S., Kim, C.-M., Kim, E.-H., Hur, E.-J., Klein, T.A., Kang, T.-K., Lee, H.-C., Song, J.-W., 2003. Molecular epidemiological study for tick-borne disease (Ehrlichia and Anaplasma spp.) surveillance at selected U.S. military training sites/installations in Korea. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 118–125. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07349.x

Costa-Junior, L.M., Rembeck, K., Passos, L.M.F., Ribeiro, M.F.B., 2013. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. Prev. Vet. Med. 109, 321–326. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.10.011

Davoust, B., Parzy, D., Pubert, D., 1994. Bilan de dix années de surveillance épidémiologique de l'ehrlichiose dans les chenils militaires corses. Rec.Med.Vet 531–537.

Dohoo, I. (Ed.), 2003. Veterinary epidemiologic research. Univ. of Prince Edward Island, Charlottetown, P.E.I.

EPLEFPA-CFPPA, 2018. Étude sur l'errance des carnivores domestiques à La Réunion - actualisation au 24/03/2021.

Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E., 2010. Experimental infection and co-infection of dogs with Anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings. Parasit. Vectors 3, 33. https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-33

Genchi, C., Kramer, L.H., 2020. The prevalence of Dirofilaria immitis and D. repens in the Old World. Vet. Parasitol. 280, 108995. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108995

Harrus, S., Waner, T., 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (Ehrlichia canis): An overview. Vet. J. 187, 292–296. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001

Harrus, S., Waner, T., Aizenberg, I., Foley, J.E., Poland, A.M., Bark, H., 1998. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with Ehrlichia canis. J. Clin. Microbiol. 36, 73–76. https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.73-76.1998

Harvey, J.W., Simpson, C.F., Gaskin, J.M., 1978. Cyclic thrombocytopenia induced by a Rickettsia-like agent in dogs. J. Infect. Dis. 137, 182–188. https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.182

Huang, H., Unver, A., Perez, M.J., Orellana, N.G., Rikihisa, Y., 2005. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. Braz. J. Microbiol. 36, 211–216. https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000300002

Huber, D., Reil, I., Duvnjak, S., Jurkovic, D., Lukacevic, D., Pilat, M., Beck, A., Mihaljevic, Z., Vojta, L., Polkinghorne, A., Beck, R., 2017. Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum and Wolbachia sp.* but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. Parasitol. Res. 116, 3019–3026. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5611-y

Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Ferguson, J.A., Walker, J.S., 1969. Ehrlichia canis--the causative agent of a haemorrhagic disease of dogs? Vet. Rec. 85, 587. https://doi.org/10.1136/vr.85.21.587

IDEXX Laboratories, Inc, 2022. SNAP 4Dx Plus Test - Test accuracy.

Inokuma, H., Raoult, D., Brouqui, P., 2000. Detection of Ehrlichia platys DNA in brown dog ticks (Rhipicephalus sanguineus) in Okinawa Island, Japan. J. Clin. Microbiol. 38, 4219–4221. https://doi.org/10.1128/JCM.38.11.4219-4221.2000

Ipek, N.D.S., Ozubek, S., Aktas, M., 2018. Molecular Evidence for Transstadial Transmission of Ehrlichia canis by *Rhipicephalus sanguineus sensu* lato Under Field Conditions. J. Med. Entomol. 55, 440–444. https://doi.org/10.1093/jme/tjx217

Jafari, S., Gaur, S.N.S., Hashemi, A., 1997. Prevalence of Ehrlichia canis in dog population of Shiraz, Fars Province of Iran. J. Appl. Anim. Res. 11, 19–23. https://doi.org/10.1080/09712119.1997.9706157

Joseph, L., Gyorkos, T.W., Coupal, L., 1995. Bayesian Estimation of Disease Prevalence and the Parameters of Diagnostic Tests in the Absence of a Gold Standard. Am. J. Epidemiol. 141, 263–272. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a117428

Khedri, J., RADFAR, M.H., BORJI, H., AZIZZADEH, M., AKHTARDANESH, B., 2014. Canine Heartworm in Southeastern of Iran with Review of disease distribution. Iran. J. Parasitol. 9, 560–567.

Lane, J.N., Litster, A., Little, S.E., Rodriguez, J.Y., Mwacalimba, K.K., Sundstrom, K.D., Amirian, E.S., Guerios, S.D., Serrano, M.A., Hays, K.M., Levy, J.K., 2021. Optimizing heartworm diagnosis in dogs using multiple test combinations. Parasit. Vectors 14, 224. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04715-4

Ledesma, N., Harrington, L., 2011. Mosquito vectors of dog heartworm in the United States: vector status and factors influencing transmission efficiency. Top. Companion Anim. Med. 26, 178–185. https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.09.005

Lee, G.K.C., Ignace, J.A.E., Robertson, I.D., Irwin, P.J., 2015. Canine vector-borne infections in Mauritius. Parasit. Vectors 8, 174. https://doi.org/10.1186/s13071-015-0790-9

Litster, A.L., Atwell, R.B., 2008. Feline heartworm disease: a clinical review. J. Feline Med. Surg. 10, 137–144. https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.09.007

Little, S.E., 2010. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 40, 1121–1140. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.004

Luo, H., Lan, Y., Gan, P., Zhou, W., Wang, M., Hu, B., Zhang, Z., Bai, Y., Li, K., 2021. Molecular Identification and Prevalence of *Ehrlichia canis* and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Infecting Pet Dogs in Wenzhou, China. Pak. J. Zool. 53, 2129–2134. https://doi.org/10.17582/journal.pjz/20191018021047

Maggi, R.G., Mascarelli, P.E., Havenga, L.N., Naidoo, V., Breitschwerdt, E.B., 2013. Co-infection with Anaplasma platys, Bartonella henselae and Candidatus Mycoplasma haematoparvum in a veterinarian. Parasit. Vectors 6, 103. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-103

Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J., Deplazes, P., 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables Dirofilaria immitis and D. repens species-specific and Acanthocheilonema (syn. Dipetalonema) genus-specific diagnosis. Parasit. Vectors 6, 48. https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-48

Mason, R., Lee, J., Curran, J., Moss, A., Heide, B., Daniels, P., 2001. Serological survey for Ehrlichia canis in urban dogs from the major population centres of northern Australia. Aust. Vet. J. 79, 559–562. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10749.x

Matei, I.A., D'Amico, G., Yao, P.K., Ionica, A.M., Kanyari, P.W.N., Daskalaki, A.A., Dumitrache, M.O., Sandor, A.D., Gherman, C.M., Qablan, M., Modry, D., Mihalca, A.D., 2016. Molecular detection of *Anaplasma platys* infection in free-roaming dogs and ticks from Kenya and Ivory Coast. Parasit. Vectors 9, 157. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1443-3

McBride, J.W., Corstvet, R.E., Gaunt, S.D., Chinsangaram, J., Akita, G.Y., Osburn, B.I., 1996. PCR detection of acute Ehrlichia canis infection in dogs. J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc 8, 441–447. https://doi.org/10.1177/104063879600800406

McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. Adv. Parasitol. 66, 193–285. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2

Montoya-Alonso, J.A., Carretón, E., Juste, M.C., Mellado, I., Morchón, R., Simón, F., 2010. Epidemiological survey of canine heartworm disease on the island of Gran Canaria (Canary Islands - Spain) between 2000 and 2008. Vet. Parasitol. 173, 165–168. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.008

Munhoz, T.D., Maia Faria, J.L., Vargas-Hernandez, G., Fagliari, J.J., Santana, A.E., Machado, R.Z., Tinucci-Costa, M., 2012. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21, 206–212. https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000300006

Muñoz, A.A.F., Martinez, A.R., Pinilla, J.C., 2020. Prevalence of Dirofilaria immitis in shelter dogs in Bucaramanga metropolitan area, Colombia. Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep. 22, 100489. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100489

Mylonakis, M.E., Harrus, S., Breitschwerdt, E.B., 2019. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). Vet. J. Lond. Engl. 1997 246, 45–53. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.01.015

Nambooppha, B., Rittipornlertrak, A., Muenthaisong, A., Koonyosying, P., Chomjit, P., Sangkakam, K., Tangtrongsup, S., Tiwananthagorn, S., Sthitmatee, N., 2022. Recombinant *Ehrlichia canis* GP19 Protein as a Promising Vaccine Prototype Providing a Protective Immune Response in a Mouse Model. Vet. Sci. 9, 386. https://doi.org/10.3390/vetsci9080386

Navarrete, M.G., Cordeiro, M.D., Silva, C.B., Massard, C.L., Lopez, E.R., Rodriguez, J.C.A., Ribeiro, C.C.D.U., Rodriguez, O.F., Fonseca, A.H., 2018. Serological and molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* and associated risk factors in dogs domiciled in western Cuba. Vet. Parasitol.-Reg. Stud. Rep. 14, 170–175. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.10.005

Negron, V., Saleh, M.N., Sobotyk, C., Luksovsky, J.L., Harvey, T.V., Verocai, G.G., 2022. Probe-based qPCR as an alternative to modified Knott's test when screening dogs for heartworm (Dirofilaria immitis) infection in combination with antigen detection tests. Parasit. Vectors 15, 306. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05372-x

Noden, B.H., Soni, M., 2015. Vector-borne diseases of small companion animals in Namibia: Literature review, knowledge gaps and opportunity for a One Health approach. J. S. Afr. Vet. Assoc. 86, 1307. https://doi.org/10.4102/jsava.v86i1.1307

Ojeda-Chi, M.M., Rodriguez-Vivas, R., Esteve-Gasent, M.D., Perez de Leon, A.A., Modarelli, J.J., Villegas-Perez, S.L., 2019. *Ehrlichia canis* in dogs of Mexico: Prevalence, incidence, co-infection and factors associated. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 67, 101351. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101351

Orr, B., Ma, G., Koh, W.L., Malik, R., Norris, J.M., Westman, M.E., Wigney, D., Brown, G., Ward, M.P., Šlapeta, J., 2020. Pig-hunting dogs are an at-risk population for canine heartworm (Dirofilaria immitis) infection in eastern Australia. Parasit. Vectors 13, 69. https://doi.org/10.1186/s13071-020-3943-4

Otto, G., 1975. Occurrence of heartworm in unusual location and unusual hosts. Vet. Med. Publ. Co Bonn. Springs Kans.

Paddock, C.D., Childs, J.E., 2003. Ehrlichia chaffeensis: a Prototypical Emerging Pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 16, 37–64. https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.37-64.2003

Parola, P., Cornet, J.-P., Sanogo, Y.O., Miller, R.S., Thien, H.V., Gonzalez, J.-P., Raoult, D., Telford III, S.R., Wongsrichanalai, C., 2003. Detection of Ehrlichia spp., Anaplasma spp., Rickettsia spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. J. Clin. Microbiol. 41, 1600–1608. https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1600-1608.2003

Perez, M., Bodor, M., Zhang, C., Xiong, Q., Rikihisa, Y., 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela, in: Hechemy, K.E., Oteo, J.A., Raoult, D.A., Silverman, D.J., Blanco, J.R. (Eds.), Century of Rickettsiology: Emerging, Reemerging Rickettsioses, Molecular Diagnostics, and Emerging Veterinary Rickettsioses. Presented at the 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Wiley-Blackwell, Malden, pp. 110–117. https://doi.org/10.1196/annals.1374.016

Perez, M., Rikihisa, Y., Wen, B., 1996. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J. Clin. Microbiol. 34, 2133–2139.

Pérez-Macchi, S., Pedrozo, R., Bittencourt, P., Müller, A., 2019. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of Ehrlichia canis and Anaplasma platys in domestic dogs from Paraguay. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 62, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.11.015

Piantedosi, D., Neola, B., D'Alessio, N., Di Prisco, F., Santoro, M., Pacifico, L., Sgroi, G., Auletta, L., Buch, J., Chandrashekar, R., Breitschwerdt, E.B., Veneziano, V., 2017. Seroprevalence and risk factors associated with Ehrlichia canis, Anaplasma spp., Borrelia burgdorferi sensu lato, and D. immitis in hunting dogs from southern Italy. Parasitol. Res. 116, 2651–2660. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5574-z

Piratae, S., Senawong, P., Chalermchat, P., Harnarsa, W., Sae-chue, B., 2019. Molecular evidence of Ehrlichia canis and Anaplasma platys and the association of infections with hematological responses in naturally infected dogs in Kalasin, Thailand. Vet. World 12, 131. https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.131-135

Ploneczka, K., Smielewska-Los, E., 2003. Prevalence of antibodies specific to Ehrlichia canis in dogs from south-west Poland. Med. Weter.-Vet. Med.-Sci. Pract. 59, 1005–1008.

R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing.

Ranjbar-Bahadori, S., Eslami, A., Bokaic, S., 2007. Evaluation of different methods for diagnosis of Dirofilaria immitis. Pak. J. Biol. Sci. PJBS 10, 1938–1940. https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1938.1940

Rishniw, M., Schukken, Y., Greiner, E., 2012. Sex ratios of Dirofilaria immitis in naturally infected dogs show female bias at low worm intensities. Res. Vet. Sci. 93, 1324–8. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.06.011

S Muller, 2004. Epidemiological survey of canine bartonellosis to Bartonella vinsonii subs. berkhoffii and canine monocytic ehrlichiosis in dogs on the Island of Reunion. Rev. Médecine Vét. 155, 377–380.

Sarker, B.R., Mitpasa, T., Macotpet, A., Bupata, P.-A., Sangmaneedet, S., Taweenan, W., 2021. First report on molecular prevalence and identification of *Anaplasma platys* in dogs in Khon Kaen, Thailand. Vet. WORLD 14, 2613–2619. https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2613-2619

Schnyder, M., Deplazes, P., 2012. Cross-reactions of sera from dogs infected with Angiostrongylus vasorum in commercially available Dirofilaria immitis test kits. Parasit. Vectors 5, 258. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-258

Selim, A., Abdelhady, A., Alahadeb, J., 2021a. Prevalence and First Molecular Characterization of *Ehrlichia canis* in Egyptian dogs. Pak. Vet. J. 41, 117–121. https://doi.org/10.29261/pakvetj/2020.061

Selim, A., Almohammed, H., Abdelhady, A., Alouffi, A., Alshammari, F.A., 2021b. Molecular detection and risk factors for Anaplasma platys infection in dogs from Egypt. Parasit. Vectors 14, 429. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04943-8

Semat, J., 2016. Mise en place d'une méthode de diagnostic moléculaire par PCR quantitative pour détecter et identifier les microfilaires sanguins de Dirofilaria immitis et de Dirofilaria repens chez le chien. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., 2012. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. Clin. Microbiol. Rev. 25, 507–544. https://doi.org/10.1128/CMR.00012-12

Slocombe, J., Surgeoner, G., Srivastava, 1989. Determination of the heartworm transmission period and its used in diagnosis and control. Vet. Nurs. J.

Sonnberger, K., Fuehrer, H.-P., Sonnberger, B.W., Leschnik, M., 2021. The Incidence of Dirofilaria immitis in Shelter Dogs and Mosquitoes in Austria. Pathog. Basel Switz. 10, 550. https://doi.org/10.3390/pathogens10050550

Szatmári, V., van Leeuwen, M.W., Piek, C.J., Venco, L., 2020. False positive antigen test for Dirofilaria immitis after heat treatment of the blood sample in a microfilaremic dog infected with Acanthocheilonema dracunculoides. Parasit. Vectors 13, 501. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04376-9

Tilley, L.P., W. K. Smith Jr., F., 2008. Manual of canine and feline cardiology, fourth edition. ed. Saunders-Elsevier, St Louis (Mo.).

Uzcategui, J., Forlano, M., Mujica, F., Orellana, N., 2019. *Rhipicephalus sanguineus* as biological vector of *Anaplasma platys* in dogs. Rev. Investig. Vet. PERU 30, 1216–1225. https://doi.org/10.15381/rivep.v30.i3.15076

Vrhovec, M.G., Pantchev, N., Failing, K., Bauer, C., Travers-Martin, N., Zahner, H., 2017. Retrospective Analysis of Canine Vector-borne Diseases (CVBD) in Germany with Emphasis on the Endemicity and Risk Factors of Leishmaniosis. Parasitol. Res. 116, 131–144. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5499-6

Waner, T., Rosner, M., Harrus, S., Naveh, A., Zass, R., Keysary, A., 1996. Detection of ehrlichial antigen in plasma of beagle dogs with experimental acute Ehrlichia canis infection. Vet. Parasitol. 63, 331–335. https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00902-7

WHO, 2020. Maladies à transmission vectorielle [WWW Document]. URL https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases

Yang, B., Ye, C., Sun, E., Wen, Y., Qian, D., Sun, H., 2020. First molecular evidence of *Anaplasma* spp. co-infection in stray dogs from Anhui, China. ACTA Trop. 206, 105453. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105453

Yuasa, Y., Tsai, Y.-L., Chang, C.-C., Hsu, T.-H., Chou, C.-C., 2017. The prevalence of *Anaplasma platys* and a potential novel *Anaplasma* species exceed that of *Ehrlichia canis* in asymptomatic dogs and *Rhipicephalus sanguineus* in Taiwan. J. Vet. Med. Sci. 79, 1494–1502. https://doi.org/10.1292/jvms.17-0224

Zohdy, S., Valenta, K., Rabaoarivola, B., Karanewsky, C.J., Zaky, W., Pilotte, N., Williams, S.A., Chapman, C.A., Farris, Z.J., 2019. Causative agent of canine heartworm (Dirofilaria immitis) detected in wild lemurs. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 9, 119–121. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.04.005

Annexes

OBJECTIF 2 :
L'ETAT DE LIEUX DES MALADIES MODÈLES DANS LA POPULATION DES CARNIVORES DOMESTIQUES À L'ILE DE LA RÉUNION

Pourquoi ?

Les chiens et les chats errants et divagants et de propriétaires, jouent un rôle important dans la dissémination des maladies infectieuses. Souvent, ces animaux se nourrissent dans les ordures, mais ils ont aussi des contacts proches avec les élevages et la population humaine. Ainsi, ils peuvent faire office de pont des pathogènes d'un écosystème ou un hôte vers un autre.

Tandis que certains pathogènes vont se manifester par des symptômes cliniques, d'autres vont coloniser les animaux et seront excrétés dans l'environnement par des animaux asymptomatiques. Plusieurs experts ont reconnu le rôle des chiens, mais aussi des chats, en tant que réservoirs, vecteurs ou sentinelles de plusieurs maladies infectieuses. Il est donc frequent que les populations des carnivores domestiques, surtout les animaux errants, soient étudiés a ce titre ; ces etudes permettent d'obtenir des résultats avec une grande pertinence dans le domaine de la santé publique.

L'étude que nous proposons vise à explorer l'importance des animaux errants et divagants en tant que réservoirs, vecteurs ou sentinelles dans les cycles de transmission des pathogènes et aussi des chiens de propriétaires "confinés". Cette étude, qui se déroulera en collaboration avec les vétérinaires privés, le GTV, le GDS, le CHU et le LVD, sera la première réalisée à cette échelle et aussi complète à La Réunion.

Cinq pathogènes modèles sont proposés en lien avec leur importance en santé publique et les filières d'élevage dans le contexte de La Réunion ; la leptospirose, la néosporose, la fièvre Q, la dirofilariose et la brucellose. En plus de ces maladies, le phénomène de la résistance antimicrobienne sera étudiée.

La neosporose et la fièvre Q sont parmi les causes majeures des pertes en reproduction dans les élevages du bétail. La présence des deux pathogènes (*Neospora caninum* et *Coxiella burnetti*) a été confirmée dans les élevages de La Réunion (résultats GDS). Tandis que Neosporose n'est pas considéré comme une zoonose, *Coxiella burnetti*, le pathogène entrainant la fièvre Q est supposé causer des complications chez les femmes enceintes, même si ce phénomène n'a pas encore été observé dans le contexte réunionnais. Le chien peut figurer comme vecteur des deux maladies, mais son importance varie selon le contexte ; elle n'a pas encore été quantifiée à La Réunion.

La **brucellose canine** connait actuellement une recrudescence en France métropolitaine, la plupart des cas étant tracé vers les élevages non-certifiés des chiens et les importations des animaux de l'Europe de l'est et des autres régions. *Brucella canis* peut causer des avortements, de la mortalité des chiots dans les élevages, les discospondylites « mystérieuses » et autres symptômes non spécifiques chez les chiens adultes. Plus important encore, il s'agit d'une zoonose majeure. Plusieurs cas des transmissions chien-homme ont été enregistrées au sein des ménages détenant un animal positif ; dans certains cas les manifestations cliniques étaient graves, menaçant la vie de la personne infectée. Brucella peut causer une infection à vie, qui peut resurgir n'importe quand, avec ou sans symptômes et avec ou sans excrétion de la bactérie.

Dirofilariose, est une zoonose se manifestant chez l'homme par des complications oculaires, causée par l'helminthe *Dirofilaria immitis*. Les SNAP tests (DiroCHECK) effectués en routine dans les cabinets vétérinaires à La Réunion indiquent que la prévalence pourrait être au delà de 50 %. Cependant, ces données préliminaires demandent une confirmation par diagnostic moléculaire (qPCR) ou microscopique (test de Knott modifié), avec une spécificité plus élevé et possibilité de préciser l'espèce de microfilaria (SNAP test ne permette pas une distinction entre *D. immitis* et *A. reconditum*). Davantage encore, les résultats obtenus dans les différentes cabinets devraient être centralisés et analysés de point de vue épidémiologique (identification des facteurs de risque; détermination du prévalence sur l'ile). Ce genre d'analyse permettrait, entre autres, à quantifier le risque pour l'homme.

Annexe 1a: Descriptif de l'étude globale - CIRAD UMR-ASTRE 2023

La **leptospirose** est une zoonose grave et parfois mortelle chez les chiens ainsi que chez l'homme. Très peu de données sont connues sur ses manifestations chez les chats, où la bactérie est aussi détectée. Les leptospires peuvent survivre pendant 6 mois dans l'environnement en zone humide et tiède. En 2019, l'incidence annuelle de la leptospirose humaine à La Réunion était 13 fois supérieure à celle de la France métropolitaine. Certaines professions (éleveurs, agriculteurs, vétérinaires...) et certaines activités (sports aquatiques, pêche...) représent les facteurs de risque pour la maladie.
Les chiens et les rongeurs jouent un rôle spécifique dans le cycle de *Leptospira*, qui a la capacité de coloniser leurs tubules rénaux et est donc excrétée pendant des périodes prolongées, souvent sans manifestation clinique.
Globalement, Leptospira existe en plusieurs génotypes, avec les cycles d'infection adaptées aux différents hôtes réservoirs. Les investigations menées à La Réunion indiquent que les rongeurs sont importants, mais ne sont pas les seuls réservoirs des génotypes responsables des pathologies chez l'homme. Les données indiquent la présence d'un deuxième réservoir ; le rôle du chien est très fortement probable mais reste à confirmer.

Le phénomène de **résistance antimicrobienne** (AMR), un enjeu transversal et d'importance globale, sera étudié chez les chiens et les chats en tant que sentinelles de la contamination environnementale. Les études précédentes effectuées à La Réunion ont démontré la présence des entérobactéries résistantes aux antibiotiques (y compris les céphalosporines de la 3eme génération) chez les animaux de rente et chez les animaux de compagnie. L'étude proposée va se focaliser sur la résistance aux beta-lactames jusqu'au carbapénèmes pour compléter et mettre à jour notre compréhension du rôle des carnivores domestiques dans la dissémination des bactéries hautement résistantes à La Réunion et notamment chez L'homme.

Comment ?

Les prélèvements seront réalisés en collaboration avec les cabinets vétérinaires impliqués dans le projet APEBA et autres actions de stérilisation (Intercommunalités et clientèle). L'étude du Cirad va inclure les animaux avec et sans propriétaire, les animaux errants, divagants et confinés chez propriétaire.
La logistique des échantillons (distribution des tubes de prélèvement/flacon/écouvillon, formulaires d'anamnèse, codes uniques pour identification des prélèvements et emballages, récupération des échantillons) sera assurée par le Cirad en collaboration avec le LVD.
Les échantillons seront analysés en collaboration avec l'Université de La Réunion et le Centre Hospitalier Universitaire de La Réunion, l'IRD, le Cirad et le LVD.

Chaque échantillon sera accompagné par une brève anamnèse de l'animal (age, sexe, animal errant / divagant / confiné chez propriétaire, stérilisé ou non, pour les chiennes nombre des portées, état symptomatique / asymptomatique). Le formulaire (électronique à https://ee.kobotoolbox.org/x/7lSl9Aey
ou papier) sera fourni par le Cirad (vétérinaires), qui sera en appui pour toute question technique.

Des échantillons seront collectés sur tous les animaux (sang, urines, écouvillon rectal), d'autres dépendront de l'anamnèse ou des liens épidémiologiques (p.ex. proximité d'élevages ou avortement). Le tableau suivant résume les échantillons à collecter, les conditions de conservation et la durée maximale de leur stockage. Le LVD assurera leur transfert.

Chaque propriétaire d'un animal échantillonné devrait signer le "Consentement éclairé" (voir l'annexe).

Pour tous questions, n'hésitez pas à nous contacter:

Cirad UMR ASTRE:
Cécile Squarzoni Diaw, vétérinaire épidémiologiste : cecile.squarzoni@cirad.fr, 0692377193
Katerina Albrechtova, VSC vétérinaire épidémiologiste : katerina.albrechtova@cirad.fr, 0692329662
LVD: 0262903030

Annexe 1b: Descriptif de l'étude globale - CIRAD UMR-ASTRE 2023

Étude des pathogènes chez les chiens et les chats à La Réunion
Fiche de prélèvements

INFORMATIONS GÉNÉRALES

Numéro identifiant l'animal (eg. A100) : *Coller l'étiquette*

Clinique Vétérinaire :

Date de prélèvement :

Domicile de l'animal : *(ou lieu de capture)*

ICAD : *(ou nom de l'animal)*

Espèce : ☐ Chien ☐ Chat

Âge : ☐ Moins de 2 mois ☐ 2 - 6 mois ☐ 7 mois - 1 an ☐ 2 - 5 ans ☐ 5 - 10 ans ☐ Plus de 10 ans

Sexe : ☐ Mâle entier ☐ Femelle entière ☐ Mâle castré ☐ Femelle stérilisée

Nombre de portées (avant stérilisation) :

INFORMATIONS VÉTÉRINAIRES ET ANTÉCÉDENTS

Raison de l'admission au cabinet :
- ☐ Vaccination ou traitement préventif
- ☐ Stérilisation
- ☐ Maladie infectieuse
- ☐ Autre, Préciser : *(Chirurgie, maladie non infectieuse, accident, trouvé…)*

Traitement antibiotique au cours des 6 derniers mois :
- ☐ Je n'ai pas l'information
- ☐ Non
- ☐ Oui : ☐ Amoxicilline / Acide Clavulanique ☐ Ciprofloxacine, Enrofloxacine, Marbofloxacine ou autre Quinolone ☐ Céphalosporine ☐ Je ne sais pas ☐ Autre :

Présence de tiques :
- ☐ Non
- ☐ Oui, de 1 à 5
- ☐ Oui, plus de 5

Dernière vaccination contre la Leptospirose :
- ☐ Moins de 21 jours
- ☐ 21 jours - 1 an
- ☐ Plus d'un an
- ☐ Jamais vacciné
- ☐ Je ne sais pas

Traitement acaricide :
- ☐ Non, jamais
- ☐ Oui, il y a plus de 3 mois
- ☐ Oui, il y a moins de 3 mois
- ☐ Je ne sais pas

Traitement préventif contre la Dirofilariose :
- ☐ Non, jamais fait
- ☐ Oui, mais irrégulier
- ☐ Oui, régulier
- ☐ Je ne sais pas

Résultat de SNAP test : *(si fait il y a 7 jours ou moins)*
- ☐ Non réalisé
- ☐ Négatif Dirofilariose
- ☐ Positif Dirofilariose
- ☐ Positif autre(s) agent(s) :

Endoscopie Spirocercose : (si réalisée récemment) ☐ Positive ☐ Négative

INFORMATIONS SUR LES CONDITIONS DE VIE DE L'ANIMAL

Pour les animaux sans propriétaire :
Ou enregistrés par une association
- ☐ Errant depuis 1 an ou plus
- ☐ Errant depuis 3 mois à 1 an
- ☐ Errant depuis moins de 3 mois
- ☐ Histoire inconnue

Pour les animaux de propriétaire :
Conditions d'habitation de l'animal
- ☐ Divagant (évolue sans surveillance)
- ☐ Promené en laisse ou sous surveillance
- ☐ Confiné dans le jardin
- ☐ Accès à la maison et au jardin
- ☐ Confiné dans l'habitation

Y a-t-il d'autres animaux dans le même ménage :
(animaux domestiques, d'élevage ou sauvages)
- ☐ Non
- ☐ Oui : ☐ Chien ☐ Chat ☐ Lapin ☐ Autre rongeur *(hamster, rat, tangue…)* ☐ Vache ☐ Chèvre ☐ Mouton ☐ Volaille ☐ Perroquet ou autre oiseau ☐ Autre :

Notes - Remarques diverses

Annexe 2: Fiche commémorative - CIRAD UMR-ASTRE 2023

Consentement éclairé

Pour prélèvements biologiques de l'animal

Dans le cadre de travaux de recherche sur les maladies infectieuses portées par les animaux de compagnie, nous avons besoin de réaliser sur les chiens et les chats, plusieurs prélèvements :

1) Écouvillon rectal
2) Prise de sang (3 ml)
3) Recueil d'urine

Ces prélèvements nous permettront de réaliser des analyses de laboratoire qui permettront de comprendre l'importance des animaux de compagnie dans la transmission de maladies infectieuses, y compris de maladies transmissibles à l'homme. Nous pourrons formuler des recommandations pour leur prévention et ainsi contribuer à améliorer la santé des animaux et de leurs propriétaires.

Tout prélèvement est effectué pendant l'anesthésie ou réalisé dans le cadre des prélèvements nécessaires au diagnostic et n'apporte donc pas à votre animal une gène ou inconfort additionnel aux procédures nécessaires à sa santé.

Les données liées aux propriétaires (nom, domicile etc) ne seront pas utilisées dans le cadre de l'étude et seront gardées en anonymat uniquement dans la base des données du vétérinaire.

Je soussigné(e) :

Domicilié(e) à :

accepte que le prélèvement soit réalisé, que les résultats soient exploités dans le cadre de ce projet et autorise l'équipe de recherche à utiliser les données concernant mon animal (âge, sexe et localité) de manière anonyme.

Date et signature:

Merci par avance pour votre aide précieuse.
L'équipe Cirad
Pour toute information, n'hésitez pas à contacter :
Katerina Albrechtova,+262692329662; katerina.albrechtova@cirad.fr

Annexe 3: Fiche de consentement - CIRAD UMR-ASTRE 2023

cirad

Echantillons, méthodes d'échantillonnage

Echantillon	Pathogène ciblé	Technique d"échantillonage	Conservation et délai de livraison au laboratoire	Animaux ciblés	Type d'analyse
Sang	*Neospora canis* *Coxiella burnetti* *Dirofilaria immitis* *Leptospira spp.*	Prise de sang sur EDTA (tube violet) pendant consultation ou anesthésie pour stérilisation / opération	4 - 8 °C max 1 semaine	chaque chien des différents compartiments	**sérologique** : Neospora, Coxiella, Dirofilaria, Leptospira **moléculaire** (PCR) : Dirofilaria
Urine	*Leptospira spp.*	Evacuation manuelle de la vessie pendant anesthésie pour stérilisation / opération ou Prélèvement diagnostic d'urine par cathéter ou collecte d'urine dans la cage d'hospitalisation (si non souillée par fèces)	30 ml dans tube FALCON et 0,5 ml transférer dans microtube 4 - 8 °C max 48h	chaque chien et chat	**microbiologique** (cultivation) **moléculaire** (PCR)
Fèces	AMR *E. coli* résistante aux céphalosporines et carbapénèmes	Ecouvillon rectal sur milieu Amies; pendant consultation /anesthésie ou dans les fèces en cage d'hospitalisation	4 - 8 °C max 3 semaines	chaque chien et chat	**microbiologique** (cultivation) **moléculaire** (PCR, séquençage)
Tiques	description des espèces importantes chez chien; éventuellement identification des arboviroses transmises	Tiques entières et gorgées, (environ 4 ou 5 par chien)	placées en tube à 96% éthanol, température ambiante, pas de délai	chien et chat infesté	**acarologique** (détermination d'espèces) **moléculaire** (PCR pour les arboviroses)
Microflora vaginale / préputiale	*C. burnetti* *Brucella canis*	Ecouvillon vaginal / préputial sur milieu Amies, pendant consultation si anamnèse	4 - 8 °C max 3 semaines	chien avec discospondylite aigue ou chienne avec anamnèse d'avortements	**microbiologique** (cultivation) **moléculaire** (PCR)
Fèces	*Neospora caninum*	environ 3 g fèces	dans un flacon sec 4 - 8 °C max 3 jours	chien si lien épidémiologique avec élevages	**coproscopique** (flotation) **moléculaire** (PCR)

SVP N'oubliez pas de remplir le petit questionnaire accessible via le QR-code
https://ee.kobotoolbox.org/x/7lSl9Aey

Annexe 4: Matériel de prélèvement - CIRAD UMR-ASTRE 2023

Protocole d'étude

Vers une meilleure compréhension de la circulation de *Dirofilaria immitis* à l'île de la Réunion : estimation de la prévalence observée et évaluation de la spécificité du test rapide

Contexte et justification

Dirofilaria immitis est un nématode filarioïde zoonotique à transmission vectorielle dont la répartition est mondiale (Simon et al, 2012). L'île de La Réunion (un des territoires français du sud) compte parmi les territoires hyper-endémiques de ce parasite, principalement pour deux raisons : (i) une forte densité de chiens (dont une grande proportion de chiens errants sans surveillance vétérinaire) et (ii) un climat tropical et une végétation abondante, favorisant la propagation des moustiques vecteurs. Outre les nombreux cas de dirofilariose canine (encore mal quantifiée à ce jour), des cas de dirofilariose humaine sont également observés chaque année (les chiffres officiels étant probablement très inférieurs à la réalité, en raison d'une méconnaissance de cette maladie par les professionnels de la santé).
La dirofilariose canine peut être traitée et l'administration systémique de médicaments antifilaroïdes aux chiens dans les zones hyperendémiques peut réduire les taux de transmission et donc protéger à la fois les animaux et les humains. Cependant, étant donné les coûts élevés du traitement et le manque de sensibilisation à la dirofilariose chez les propriétaires de chiens, la détection précoce et/ou le traitement préventif restent rares à La Réunion.
Plusieurs tests de diagnostic sont disponibles sur le marché, la plupart d'entre eux détectant les antigènes des vers adultes. S'ils sont bien utilisés dans les soins vétérinaires préventifs de routine, ces tests peuvent largement augmenter l'adhésion au traitement préventif et curatif des chiens.
A La Réunion, il y a des vétérinaires qui font la promotion de bonnes pratiques et d'un dépistage régulier et du traitement précoce, mais ils restent minoritaires. La plupart d'entre eux utilisent l'Idexx Snap 4dx, mais d'autres fabricants (qui proposent des tests similaires à un prix inférieur) sont également présents. Les vétérinaires qui utilisent l'Idexx et d'autres tests rapides font régulièrement part de leurs soupçons quant à leur spécificité insuffisante, qui serait due à une réactivité croisée avec un autre helminthe très répandu, *Spirocerca lupi*. Cette suspicion est souvent fondée sur la visualisation de *Spirocerca* par endoscopie et sur une "élimination" (test rapide négatif) après un traitement complet de l'animal contre la spirocercose. Ce type de réactivité croisée a déjà été décrit dans la littérature scientifique (Aroch et al., 2015).
Une étude récente visait à comparer trois tests de diagnostic différents pour *D. immitis* sur un échantillon de 300 chiens de refuge, en examinant le test antigénique DiroCHECK (Zoetis), la qPCR et la technique de Knott modifiée (Negron et al., 2022). Cependant, aucune comparaison de ce type n'a encore été réalisée pour les tests Snap, qui constituent l'option de choix pour la majorité des vétérinaires praticiens (à La Réunion et probablement dans le monde entier).

A partir de janvier 2023, le Cirad UMR ASTRE (Unité Mixte de Recherche Animaux-Santé-Territoires-Risques-Environnement) basé à La Réunion a lancé un grand projet collaboratif ('Risk evaluation and management of infectious diseases transmitted by domestic carnivores at La Réunion') qui étudie la dynamique de plusieurs maladies infectieuses des carnivores domestiques (dirofilariose, fièvre Q, leptospirose et néosporose, ainsi que la résistance aux antimicrobiens) ; dirofilariose, fièvre Q, leptospirose et néosporose, ainsi que la résistance aux antimicrobiens). Le projet est mis en œuvre en collaboration avec près de 16 cliniques vétérinaires privées réparties sur l'ensemble de l'île, des refuges et des associations de protection des animaux. À ce jour (30.3.2023), nous avons obtenu des échantillons de plus de 250 animaux répartis sur l'ensemble de l'île, y compris des chiens errants et des chiens divagants et de propriétaires. Le projet vise à prélever 1000 animaux avant la fin de l'année 2023 afin d'obtenir une large distribution des prélèvements.

Objectifs de l'étude

L'objectif global de l'étude est de sensibiliser les propriétaires d'animaux et les vétérinaires à l'importance de la dirofilariose canine, ce qui devrait augmenter la demande de tests rapides et de traitements de la maladie à l'échelle de la Réunion. Pour ce faire, l'étude vise à ;

- Estimer la prévalence de la *dirofilariose* due à *dirofilaria immitis* dans la population canine, afin d'informer les vétérinaires, les propriétaires et les autres parties prenantes et de les sensibiliser à la maladie.

Annexe 5a: Protocole d'étude partenariat Idexx- CIRAD UMR-ASTRE 2023

- Réévaluer la spécificité des tests rapides dans le contexte d'un environnement à forte pression d'infection par deux helminthes antigéniquement similaires (*D. immitis* et *S. lupi*), afin de restaurer la confiance des vétérinaires dans la précision du test rapide.

Enquêteurs

Cécile Squarzoni, vétérinaire épidémiologiste et chercheur senior au Cirad UMR Astre, St Denis La Réunion, coordinatrice du Partenariat régional de recherche One Health (DPOH ; https://www.onehealth-oi.org/)
Katerina Albrechtova, vétérinaire épidémiologiste, chercheur junior au Cirad UMR Astre, St Denis La Réunion
Timothée Vergne, Maître de conférences en santé publique vétérinaire, UMR INRAE-ENVT
Juliette Roger, étudiante en médecine vétérinaire (dernière année à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France), stagiaire au Cirad UMR Astre, St Denis, La Réunion
Marie Anais Etheves, technicienne de laboratoire - Cirad UMR Astre, St Denis, La Réunion

Financement

Le projet "Evaluation du risque et gestion des maladies infectieuses transmises par les carnivores domestiques à La Réunion" est financé par le projet FEADER (Fonds européen agricole pour le développement rural) et le projet EcoAntibio2 du ministère français de l'agriculture. Ces fonds couvrent l'ensemble des prélèvements, des analyses de laboratoire et des ressources humaines associées.

Afin d'intégrer le Snap Test 4Dx dans l'étude, un soutien supplémentaire équivalant à 300 Snap Tests est demandé au laboratoire producteur.

Méthodologie

Échantillonnage
Au moins 300 échantillons de sang veineux sur EDTA (système Vacuette) seront prélevés sur des chiens arrivant dans seize cliniques collaboratrices à La Réunion sur une période de trois mois (prévue de mai à août 2023). Les vétérinaires seront invités à prélever les animaux de manière aléatoire, sans privilégier les animaux malades ou sains, ni une tranche d'âge particulière. Chaque échantillon sera accompagné d'une fiche d'anamnèse indiquant l'âge, le sexe, le statut de propriété (errant/propriétaire/ errant), l'état de santé (observations de base) et l'anamnèse des traitements antiparasitaires, y compris les médicaments les plus fréquemment utilisés pour traiter la dirofilariose canine.

Analyse en laboratoire
300 échantillons de sang seront testés selon trois méthodes ;
- Idexx 4Dx Snap test
- la technique Knott modifiée d'observation directe des microfilaires
- qPCR ciblant le gène cox1, comme décrit par Laidoudi et al, 2020
-

Alors que le test rapide sera effectué directement par les vétérinaires, la technique de Knott modifiée et la qPCR seront effectuées (plus tard, mais en utilisant le même échantillon) dans le laboratoire de l'UMR ASTRE, à la plate-forme CYCLOTRON pour la recherche biomédicale à St Denis, La Réunion. La plateforme dispose de tout l'équipement et de l'expertise scientifique nécessaire pour effectuer les analyses (plus de 15 ans d'expérience de routine dans le diagnostic des maladies infectieuses au niveau régional).
Outre les 300 échantillons de sang évalués par les trois tests, l'étude continuera à analyser environ 500 autres échantillons par le test de Knott modifié et la qPCR, afin d'augmenter la précision de l'estimation de la prévalence.

Analyse statistique

La spécificité du test rapide sera estimée par la méthode des "classes latentes" décrite précédemment (Branscum et al. 2005 ; Enoe et al., 2000).

La prévalence sera estimée à l'aide d'une approche bayésienne décrite par Joseph et al. (1995) en tenant compte des résultats des trois tests, où le test Snap sera utilisé pour évaluer à minima sur 500 échantillons.

Avec la technique Knott modifiée et la PCR, au moins 300 échantillons supplémentaires dans lesquels le test Snap ne sera pas effectué, pourront également être comparés.

Résultats attendus

Les résultats de cette étude seront :

- Obtenir la prévalence observée de la *dirofilariose* due à *dirofilaria immitis* dans la population canine
- Réévaluer la spécificité des tests rapides dans le contexte d'un environnement à forte pression d'infection par deux helminthes antigéniquement similaires (*D. immitis* et *S. lupi*)
- Fournir un protocole de dépistage renforcé aux vétérinaires
- Optimiser la prise en charge de cette maladie

La publication pourra se faire dans une revue à comité de lecture sauf si le laboratoire Iddex participe à l'étude et demande une clause de confidentialité. A l'issue de l'étude, un document d'information adapté aux vétérinaires et au grand public sera rédigé et diffusé.

Les résultats seront également exploités dans le cadre d'une thèse de maîtrise vétérinaire qui porte ce travail. A la fin de l'étude, une réunion de restitution sera organisée pour tous les vétérinaires opérant sur l'île (55 cabinets privés) afin de communiquer les résultats de l'étude.

Il est attendu une estimation de la prévalence observée (supposée très élevée) de *Dirofilaria immitis*, associée à la confirmation de la précision du test rapide (et donc de sa capacité à détecter la maladie suffisamment tôt pour permettre un traitement efficace). Ces résultats devraient augmenter la demande globale de ce test, tant au niveau des clients vétérinaires que des vétérinaires praticiens.

Références

1. Aroch I, Rojas A, Slon P, Lavy E, Segev G, Baneth G, 2015 : Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of Dirofilaria immitis antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis.Veterinary Parasitology 211.
2. Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005. Estimation de la sensibilité des tests de diagnostic et specificity through Bayesian modeling. Prev. Vet. Med. 68, 145-163.
3. Joseph L, Gyorkos TW, Coupal L, 1995 : Bayesian estimation of disease prevalence and the parameters of diagnostic tests in the absence of a gold standard. American Journal of Epidemiology 141 (3).
4. Laidoudi Y, Davoust B, Varloud M, Niang EHA, Fenollar F, Mediannikov O, 2020 : Développement d'une approche multiplex basée sur la qPCR pour le diagnostic de Dirofilaria immitis D. repens et Acanthocheilonema reconditum. Parasites and Vectors. 13(319).
5. Negron V, Saleh MN, Sobotyk C, Luksovky JL, Harvey TV, Verocai GG, 2022 : Probe-based qPCR as an alternative to modified Knott's test when screening dogs for heartworm (Dirofilaria immitis) infection in combination with antigen detection tests. Parasites and Vectors 15(306).
6. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, 2012 : Dirofilariose humaine et animale : l'émergence d'une mosaïque zoonotique. Clinical Microbiol Review 25.

Annexe 5c: Protocole d'étude partenariat Idexx- CIRAD UMR-ASTRE 2023

Identification des facteurs de risque de dirofilariose, d'ehrlichiose et d'anaplasmose dans les populations de chiens de l'île de la Réunion

Nom et prénom : ROGER-CALLEWAERT Juliette

Résumé :

Dirofilaria immitis, *Ehrlichia canis* et *Anaplasma platys* sont des agents pathogènes à transmission vectorielle et au potentiel zoonotique, couramment diagnostiqués chez le chien par les vétérinaires de l'île de la Réunion. L'analyse d'une étude rétrospective des résultats des Snap Test 4Dx® réalisés en 2022 a permis d'estimer la prévalence à 13,55% (IC 95% 11,76 - 15,57) pour *D. immitis*, 15,82% (IC 95% 13,61 - 18,25) pour *E. canis* et 3,91% (IC 95% 2,73 - 5,39) pour *A. platys* et d'évaluer les facteurs de risque pour chacune des maladies qu'ils provoquent. Nous avons aussi conduit une étude prospective spécifiquement sur *D. immitis* en prélevant les chiens de populations confinées, divagantes et errantes. Les prélèvements sanguins collectés ont été utilisés pour diagnostiquer *D. immitis* par l'utilisation de trois tests diagnostiques (Snap Test 4Dx®, qPCR et Knott Test). La prévalence de D. immitis en 2023 a été estimée à 6,23% (IC 95%: 4,26 - 9,04) et était significativement plus élevée chez les chiens de plus de 6 ans que chez les chiens des autres catégories d'âge.

Mots-clés : Épidémiologie, *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, Île de la Réunion, Chiens

---

Identification of risk factors for dirofilariasis, ehrlichiosis and anaplasmosis in dog populations on Reunion Island

Abstract :

Dirofilaria immitis, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* are vector-borne pathogens with zoonotic potential, commonly diagnosed in dogs by veterinarians on Reunion Island. The analysis of a retrospective study of the results of the Snap Test 4Dx® carried out in 2022 made it possible to estimate the prevalence at 13.55% (95% CI 11.76 - 15.57) for *D. immitis*, 15.82 % (95% CI 13.61 - 18.25) for *E. canis* and 3.91% (95% CI 2.73 - 5.39) for *A. platys* and to evaluate the risk factors for each of the diseases that they cause. We also conducted a prospective study specifically on *D. immitis* by taking blood from dogs from confined, wandering and stray populations. The collected samples were used to diagnose *D. immitis* using three diagnostic tests (Snap Test 4Dx®, qPCR and Knott Test). The prevalence of *D. immitis* in 2023 was estimated at 6.23% (95% CI: 4.26 - 9.04) and was significantly higher in dogs older than 6 years than in dogs in other age categories.

Key-words : Epidemiology, *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, Reunion Island, Dogs