

## Communication

**Enquête séroépidémiologique sur la grippe et l'anémie infectieuse des équidés dans le nord-est tunisien**M. Boussetta<sup>1</sup>A. Chabchoub<sup>2</sup>A. Ghram<sup>1</sup>I. Jomaa<sup>3</sup>A. Ghorbel<sup>2</sup>T. Aouina<sup>4</sup>H. Ben Amor<sup>5</sup>

**BOUSSETTA (M.), CHABCHOUB (A.), GHGRAM (A.), JOMAA (I.), GHORBEL (A.), AOUINA (T.), BEN AMOR (H.).** Enquête séroépidémiologique sur la grippe et l'anémie infectieuse des équidés dans le nord-est tunisien. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1994, 47 (3) : 277-281

Dans le cadre d'une enquête épidémiologique nationale, les auteurs ont recherché, par le test d'inhibition de l'hémagglutination et par le test de Coggins (immunodiffusion double en gélose), les titres en anticorps envers le virus de la grippe équine (2 sous-types : A/equi/1/Prague 56 et A/equi/2/Miami 63) et l'anémie infectieuse, sur 433 et 533 équidés respectivement, vivant dans le nord-est de la Tunisie. 13,6 p. 100 des sérums des équidés sont positifs envers la grippe équine, alors que tous les sérums sont négatifs pour l'anémie infectieuse des équidés. Ces résultats sont discutés en les rapprochant de ceux déjà obtenus par d'autres auteurs en Tunisie et dans des pays voisins.

**Mots clés :** Âne - Cheval - Mulet - Anémie infectieuse du cheval - Grippe équine - Epidémiologie - Enquête - Sérologie - Technique d'immunodiffusion - Tunisie.

**Introduction**

La grippe équine et l'anémie infectieuse des équidés sont deux viroses dont l'incidence économique est importante dans le monde (1, 7, 8, 9, 10). En effet, l'anémie infectieuse, bien qu'elle possède un caractère insidieux, a une évolution souvent fatale (11). La grippe équine, par la brutalité des épizooties qu'elle peut entraîner, immobilise les effectifs atteints et perturbe les activités équestres (1). Ceci justifie le fait que ces deux affections soient parmi les maladies légalement contagieuses en Tunisie (2).

1. Laboratoire de Microbiologie vétérinaire, Institut Pasteur de Tunis, BP 74, 13, place Pasteur, 1002 Tunis Belvédère, Tunisie.

2. Service de Pathologie médicale des équidés et carnivores, École nationale de Médecine vétérinaire, 2020 Sidi-Thabet, Tunisie.

3. Laboratoire de Parasitologie, Institut Pasteur de Tunis, BP 74 13 Place Pasteur, 1002 Tunis Belvédère, Tunisie.

4. Institut de Recherche vétérinaire, La Rabta, Bab Saadoun, 1004 Tunis, Tunisie.

5. Vétérinaire libre praticien, Bir Ali Ben Kelifa, Gouvernorat de Sfax, Tunisie.

Reçu le 25.2.1994, accepté le 29.9.1994

Leur prévalence est fort mal connue puisque ces entités n'ont fait l'objet que de quelques études éparses et ponctuelles (3, 7, 10). Ce travail a été entrepris dans le but de préciser leur situation actuelle et constitue ainsi la première étape d'une approche nationale.

**Matériel et méthodes****Animaux**

L'enquête séroépidémiologique de la grippe a intéressé un effectif de 433 équidés comprenant des chevaux pur-sang arabes, des pur-sang anglais, des barbes, des arabes-barbes, des ânes et des mulets, âgés de 1 à 25 ans (tabl. I). Soixante-dix neuf animaux parmi ces 433 sont vaccinés avec un vaccin à virus inactivé comportant les deux valences (A/equi/1/Prague 56 et A/equi/2/Miami 63). Cinq cent trente-trois équidés ont été explorés pour l'anémie infectieuse (AIE). Tous ces animaux proviennent du nord-est de la Tunisie (Gouvernorats de Tunis, Ariana et Bizerte). La race, le sexe, l'âge, l'état vaccinal, le nombre ainsi que le type d'élevage figurent dans le tableau I pour la grippe. Dans le tableau II figure le signalement des animaux explorés pour l'anémie infectieuse. Les prélèvements ont été réalisés entre les mois de mars et juillet 1991.

**Méthodes***L'inhibition de l'hémagglutination grippale*

Le test d'inhibition de l'hémagglutination grippale (IHA) est effectué selon les recommandations de l'United-State Department of Health Education and Welfare de 1975 (5) pour la recherche des anticorps dirigés contre la grippe équine. Les souches du virus de la grippe équine A/equi/1/Prague 56 (H7N7) et A/equi/2/Miami 63 (H3N8) ont été aimablement fournies par l'Institut Pasteur de Paris. Elles ont été inoculées par la voie intra-allantoïdienne à des œufs de poules "Specific Pathogen Free" embryonnés de 11 jours et incubés trois jours à 35°C. Le liquide allantoïque est collecté, titré et utilisé dans la réaction IHA. Des sérums positifs témoins, reçus de l'Institut Pasteur de Paris ou provenant d'animaux étudiés et ayant un titre élevé d'anticorps anti-grippal, ont été employés. Les sérums positifs témoins, titrant 512, ont été utilisés à la dilution de 1/10e.

La technique en micro-méthode, sur plaque à fond rond, a été utilisée. Les sérums à tester sont inactivés à 56°C pendant 30 min puis sont mis en contact avec une suspension à 20 p. 100 d'hématies de poule pendant 30 min. Le mélange est ensuite centrifugé et le surnageant est de nouveau récupéré et traité avec une solution de kaolin à 25 p. 100 pendant 30 min. La suspension est centrifugée à 200 x g pendant 15 min et le surnageant est de nouveau prélevé pour titrage. Les sérums ainsi traités se trouvent dilués au 1/10e et sont prêts pour être testés en IHA.

## Communication

**TABLEAU I** Race, sexe, âge, état vaccinal des animaux explorés ainsi que les résultats de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination des virus grippaux.

Type d'élevage	Nombre d'équidés	Race	Sexe		Age (ans)	Etat vaccinal	Sérums positifs
			Mâles	Femelles			
Elevages collectifs (haras club)	202	P.S. Arabe	16	186	11,89 + 6,25	non vaccinés	11
	8	P.S. Anglais	1	7	10,2 + 3,1	non vaccinés	0
	12	Barbe	0	12	13,58 + 4,07	non vaccinés	1
	79	Arabe-Barbe	79	0	7,41 + 4,61	vaccinés	23
	23	P.S. Arabe	10	13	11,42 + 4,7	non vaccinés	9
Elevages individuels	57	Barbe	36	21	10,3 + 4,8	non vaccinés	12
	11	Arabe-Barbe	11	0	11,9 + 4,9	non vaccinés	3
	26	Mulet	11	15	9,6 + 2,7	non vaccinés	0
	15	Ane	5	10	7,09 + 3,12	non vaccinés	0
Total	433		169 (39 p. 100)	264 (61 p. 100)	11,64 + 5,84		59 (13,6 p. 100)

**TABLEAU II** Présentation de la race et du sexe des animaux explorés pour l'anémie infectieuse des équidés.

Type d'élevage	Nombre	Race	Sexe	
			Mâles	Femelles
Elevages collectifs (haras club...)	300	P.S. Arabe	16	284
	8	P.S. Anglais	1	7
	12	Barbe	0	12
	80	Arabe-Barbe	80	0
23	P.S. Arabe	10	13	
Elevages individuels	57	Barbe	36	21
	11	Arabe-Barbe	11	0
	26	Mulet	11	15
	16	Ane	5	11
Total	533		170 (32 p. 100)	363 (68 p. 100)

Des dilutions du sérum en série, en progression géométrique à raison 2, sont réalisés dans les cupules d'une plaque à 96 puits. Une dilution d'antigène titrant 4 HA est ajoutée dans chaque puits. Le mélange est incubé 30 min à la température du laboratoire avant de recevoir une suspension d'hématies ( $75 \text{ à } 80 \times 10^6$  hématies/ml) à 0,5 p. 100 dans du PBS (Phosphate Buffered Solution) à pH 7,2.

La lecture s'effectue après 30 min et le titre des anticorps IHA est déterminé par la dilution la plus élevée qui présente 100 p. 100 d'inhibition ; le titre étant exprimé par l'inverse de cette dilution. La réaction est considérée positive si le titre des anticorps inhibant l'hémagglutination est supérieur ou égal à 20 (5, 8).

\* Breakspear Road South Harefield Uxbridge Middlesex UB 96 LS, Royaume Uni.

#### L'immunodiffusion double en gélose

L'immunodiffusion double en gélose (IDG), décrite par COGGINS *et al.* (4), est utilisée pour rechercher les anticorps anti-virus AIE dans le sérum des chevaux prélevés. Le test IDG permet de détecter la protéine majeure p26 de l'antigène. Le kit "EIA antibodies test" commercialisé par Pitman-Moore\* a été utilisé.

#### Analyses statistiques des résultats

Les différences entre les groupes ont été établies par un test paramétrique (test de Student) et par un test non paramétrique (test du  $\chi^2$ ). La différence a été considérée comme significative au risque d'erreur de 5 p. 100.

## Résultats

### Grippe équine

Les résultats obtenus pour la grippe sont exposés dans les tableaux I, III, IV. Cinquante-neuf des 433 équidés testés, soit 13,6 p. 100, possèdent dans leur sérum des anticorps anti-grippaux à un taux décelable (titre  $\geq 20$ ). Le pourcentage des chevaux infectés atteint 15 p. 100 si on les sépare des ânes et des mulets. Sur les 433 équidés explorés, 354 ne sont pas vaccinés. Parmi ces derniers, 222 appartiennent à des haras ou clubs et 132 proviennent d'élevages individuels traditionnels. Il s'avère que les animaux séropositifs des haras et clubs ne représentent que 5 p. 100 de l'effectif (12/222) alors que ceux qui proviennent d'élevages traditionnels sont au nombre de 24 parmi les 132 explorés, soit 18 p. 100 (la différence est statistiquement significative). Les équidés présentant une sérologie anti-grippale positive ont un âge moyen de  $11,87 \pm 8,39$  ans, statistiquement comparable à celui des équidés ayant une sérologie antigrippale négative. Notons

**TABLEAU III** Résultats de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination grippale en fonction de la race des animaux non vaccinés prélevés.

Equidés		Titre anti-A/equi 1/Pr. 56		Titre anti-A/equi 2/Mi. 63		Sérums positifs
Race	Nombre	20	40	20	40	
Pur-Sang	233	13 (5,6)	8 (3,4)	19 (8,2)	6 (2,6)	20 (8,6)
Barbe	80	13 (16,3)	6 (7,5)	8 (10)	4 (5)	16 (20)
Arabe-Barbe						
Mulet	41	0	0	0		0
Ane						
Total	354	26 (7,3)	14 (4)	27 (7,6)	10 (2,8)	36 (10,2)

( ) : p. 100.

**TABLEAU IV** Résultats de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination grippale en fonction de l'état vaccinal et du sexe des animaux prélevés.

Equidés		Titre anti-A/equi 1/Pr. 56		Titre anti-A/equi 2/Mi. 63		Sérums positifs
Sexe	Nombre	20	40	20	40	
Mâles non vaccinés	90	11 (12,2)	4 (4,4)	8 (8,9)	2 (2,2)	15 (16,7)
Femelles non vaccinées	264	15 (5,7)	10 (3,8)	19 (7,2)	8 (3)	21 (8)
Mâles vaccinés	79	20 (25,3)	10 (12,7)	21 (26,6)	11 (13,9)	23 (29,1)
Total chevaux non vaccinés	354	26 (7,3)	14 (4)	27 (7,6)	10 (2,8)	36 (10,2)
Total	433	46 (10,6)	24 (5,5)	48 (11,1)	21 (4,8)	59 (13,6)

( ) : p. 100.

tout de même que l'écart type chez les chevaux à sérologie positive est plus important, témoignant une plus grande hétérogénéité de l'âge des animaux séropositifs envers la grippe.

Ne considérant que les animaux non vaccinés, les résultats de l'IHA en fonction de la race figurent dans le tableau III. Pour la commodité de l'interprétation, on a regroupé ensemble les chevaux pur-sang, les barbes et arabes-barbes et enfin les mulets et les ânes. Il en ressort que ces derniers ne présentent pas dans leurs sérums d'anticorps anti-grippaux à un taux décelable. Les chevaux pur-sang présentent un taux de séropositivité envers la grippe équine d'environ 8,6 p. 100 ; taux statistiquement inférieur ( $p < 0,05$ ) à celui obtenu par les chevaux barbes et des arabes-barbes (20 p. 100).

Si l'on considère uniquement les réponses positives pour le sous-type A/equi/1/Prague 56 (H7N7) (tab. IV), les proportions respectives obtenues chez des animaux vaccinés et non vaccinés sont d'environ 25 et 7 p. 100. La différence, en fonction de l'état vaccinal pour ce sous-type, est significative ( $p < 0,05$ ). De même, pour le sous-type A/equi/2/Miami 63, les proportions des réponses positives des équidés vaccinés et non vaccinés sont respectivement d'environ 27 et 7,6 p. 100. La différence en fonction de l'état vaccinal (tab. IV) est significative.

Si l'on considère le sexe des équidés non vaccinés, on remarque qu'environ 17 p. 100 des équidés mâles sont positifs envers la grippe alors qu'uniquement 8 p. 100 des femelles le sont. La différence est significative. Seuls 13 p. 100 des animaux vaccinés sont effectivement protégés contre A/equi/1/Prague 56 (titre  $\geq 40$ ) et presque autant contre A/equi/2/Miami 63 (tab. IV). Chez les animaux non vaccinés, 4 p. 100 possèdent des anticorps anti-A/equi/1/Prague 56 à un titre protecteur et seulement 2,8 p. 100 envers A/equi/2/Miami 63. La différence est significative ( $p < 0,05$ ).

### Anémie infectieuse des équidés

Les sérums appartenant aux 533 équidés explorés pour l'AIE se sont révélés tous négatifs. Aucun ligne de précipitation n'est apparue entre l'antigène et tous les sérums des équidés testés. Seules les deux lignes de précipitation formées entre les sérums positifs témoins et l'antigène sont observées.

## Discussion

### Grippe équine

Le choix de la technique d'inhibition de l'hémagglutination est lié au fait que les anticorps IHA persistent dans le sérum plus longtemps que les autres anticorps (tels ceux

## Communication

fixant le complément) (8, 14). Elle est de ce fait plus adaptée à une enquête sérologique (1, 13). De plus, l'IHA permet d'identifier le sous-type grippal en cause (8) et de tester l'efficacité vaccinale (1, 6).

L'enquête a porté sur 433 équidés dont 354 sont non vaccinés contre la grippe équine. Trente-six parmi ces derniers (soit 10 p. 100) possèdent des titres en anticorps IHA envers H7N7 et/ou H3N8 supérieurs ou égaux à 20 et sont de ce fait considérés comme positifs (1, 5, 12). Cette proportion de 10 p. 100 est largement inférieure à celle retrouvée par ELLOUZE (7) en 1979 qui, travaillant sur 500 sérums, révèle des taux d'infection de 65 p. 100. Signalons tout de même que son enquête (7) s'est déroulée quelques mois après l'épidémie de grippe qui a sévi en 1978-1979 en Tunisie, en même temps d'ailleurs que dans d'autres pays tels que la France (8).

On a noté que les équidés vivant dans des élevages individuels traditionnels présentent des fréquences de séropositivité supérieures à ceux observés chez des chevaux vivant en collectivité (haras, clubs,...). Ceci semble en contradiction avec ce qui a été rapporté par d'autres auteurs (7) qui remarquent que les animaux vivant en collectivité sont plus touchés que les animaux vivant isolés dans la campagne, ce qui serait lié à la très grande contagiosité de la grippe équine (1, 5, 8, 12, 13).

Chez les mulets et les ânes, aucune trace sérologique du virus grippal n'a été trouvée ; ce qui est en accord avec les conclusions d'ELLOUZE (7) qui trouve, lors de son enquête, que les titres sériques varient avec l'espèce ; ils étaient en général élevés chez les chevaux (titres compris entre 160 et 320) et relativement bas chez les mulets et les ânes (titre inférieur ou égal à 80). En plus, les chevaux étaient beaucoup plus atteints (85 p. 100) que les mulets (36 p. 100) et les ânes (44 p. 100). Ceci pourrait s'expliquer par la grande sensibilité du cheval au virus de la grippe équine (5).

Si l'on considère la race des chevaux étudiés, il s'avère que les barbes et arabes-barbes sont plus touchés que les chevaux pur-sang. Une corrélation entre la race et l'atteinte par le virus grippal semble exister. Mais le fait que les animaux ne vivent pas dans les mêmes conditions constitue une réserve à cette constatation puisque la quasi-totalité des chevaux pur-sang vivent dans des haras et clubs où les conditions d'hygiène sont bonnes, ce qui n'est pas toujours le cas des barbes et des arabes-barbes. Ces résultats sont compatibles avec ceux retrouvés par ailleurs (7).

Les équidés explorés lors de l'enquête ont réagi d'une manière comparable pour les deux sous-types du virus grippal (A/equi/1/Prague 56 et A/equi/2/Miami 63). ELLOUZE (7) démontre que l'épizootie de 1978-1979 était l'œuvre de A/equi/1/Prague 56. Le sous-type A/equi/2/Miami 63 ne fut rencontré que chez 10 p. 100 des animaux testés. PLATEAU *et al.* (12, 14) rapportent qu'en France et depuis 1979, tous les virus isolés dans leurs laboratoires sont du sous-type A/equi/2/Miami 63.

Si l'on considère les animaux ayant un taux protecteur envers la grippe équine (titre en IHA  $\geq$  40) (6), il s'avère que sur le total des animaux non vaccinés, 4 p. 100 sont protégés envers A/equi/1 et seulement 2,8 p. 100 le sont envers A/equi/2. Cette constatation est en accord avec les conclusions de plusieurs auteurs (6, 12, 14) concernant le pouvoir immunogène moindre de A/equi/2/Miami 63 par rapport à A/equi/1/Prague 56.

### Anémie infectieuse des équidés

Comme c'est le cas dans la présente enquête, CHELLI (3) et ELLOUZE (7) en 1980 ne trouvent aucun sérum positif envers l'AIE, respectivement sur 132 et 578 sérums de chevaux. Les résultats obtenus ici ne font donc que confirmer l'absence de l'AIE en Tunisie. Ceci doit être considéré avec prudence car cette maladie est connue pour être cosmopolite (4, 11). D'autre part, des prévalences extrêmement faibles ont été rencontrées au Maroc en 1978 (11), pays dont la population équine est comparable à celle de la Tunisie. D'autres enquêtes sont donc nécessaires pour déterminer avec certitude l'absence ou la présence de l'anémie infectieuse des équidés. Son absence doit renforcer la vigilance aux frontières, surtout lors d'introduction d'animaux en provenance de pays infectés.

### Conclusion

Les résultats préliminaires de cette enquête plaident en faveur d'une circulation très modérée dans le nord-est de la Tunisie de la grippe équine sur le mode sub-clinique, et plaident également en faveur de l'absence de l'anémie infectieuse dans cette même région. Il serait judicieux d'étendre l'enquête sérologique et épidémiologique à un effectif plus important pour un meilleur reflet de l'état sanitaire de la population équine tunisienne.

### Remerciements

Les auteurs remercient le Secrétariat d'Etat à la Recherche scientifique (SERST) pour son aide qui a permis le financement d'une partie de ces travaux (convention entre SERST et Ecole vétérinaire de Sidi-Thabet).

### Bibliographie

1. ALZIEU (J.P.), BICHET (H.). Réflexions sur la grippe équine et la rhinopneumonie équine. Moyens de contrôle. *Revue Méd. vét.*, 1989, **140** : 1097-1107.
2. CHABCHOUB (A.). Contribution à l'étude la législation tunisienne en matière de vente du cheval. *Maghreb Vét.*, 1988, **14** (3) : 46-49.
3. CHELLI (A.). Contribution à l'étude épidémiologique de l'anémie infectieuse et de la leptospirose équines en Tunisie. Thèse Doc. vét., Sidi-Thabet, Tunisie, 1980.

4. COGGINS (L.), NORCROSS (N.L.). Immunodiffusion reaction in equine infection anemia. *Cornell Vet.*, 1990, **60** (2) : 330-335.
5. CRUCIERE (C.), GUILLEMIN (M.C), ROSETTO (A.), WIRBEL (A.), PLATEAU (E.). Production of monoclonal antibodies against influenza: application to a comparative study of various strains of the virus. *Annls Rech. vét.*, 1989, **20** : 243-250.
6. DANNACHER (G.), COUDERT (M.), FEDIDA (M.), PERRIN (M.). La grippe équine : étude quantitative de l'état immunitaire post-vaccinal et des corrélations entre ses différents aspects. *Revue Méd. vét.*, 1977, **128** (3) : 323-341.
7. ELLOUZE (M.R.). Contribution à l'étude épidémiologique de l'anémie infectieuse, de l'artérite à virus, de la rhinopneumonie et de la grippe équine en Tunisie. Thèse Doc. vét., Sidi-Thabet, Tunisie, 1980.
8. FONTAINE (M.), MORAILLON (A.). Considérations sur l'épizootie de grippe 1978-79 en France. *Recl Méd. vét.*, 1980, **156** (2) : 139-145.
9. HANNANT (D.), MUMFORD (J.A.), JESSET (D.M.). Duration of circulating antibody and immunity following infection with influenza virus. *Vet. Rec.* 1988, **122** : 125-128.
10. JOMAA (I.). Contribution à l'étude séro-épidémiologique de la grippe équine et de l'anémie infectieuse dans une région de nord de la Tunisie. Thèse Doct. Méd. vét. Sidi-Thabet, Tunisie, 1993.
11. MORAILLON (A.), MORAILLON (R.), TOMA (B.), SEDRATI (A.), LAHLOU-KASSI (S.). Enquête épidémiologique sur l'anémie infectieuse, la rhinopneumonie et l'artérite à virus au Maroc. *Recl Méd. vét.*, 1978, **154** (11) : 921-928.
12. PLATEAU (E.), CRUCIERE (C.), JACQUET (A.), CHEYROUX (M.). Mise au point et recherche en cours sur l'évolution épidémiologique et antigénique de la grippe équine en France. *Bull. mens. Soc. vét. prat. Fr.*, 1984, **68** (2) : 6-10.
13. ZIENTARA (S.), PLATEAU (E.). Les vaccinations chez le cheval à l'entraînement et au haras. *Bull. mens. Soc. vét. prat. Fr.*, 1992, **76** (2) : 85-100.
14. ZIENTARA (S.), PLATEAU (E.). Vaccins et vaccinations chez le cheval. *Point Vét.*, 1993, **24** (149) : 601-610.
- BOUSSETTA (M.), CHABCHOUB (A.), GHAM (A.), JOMAA (I.), GHORBEL (A.), AOUINA (T.), BEN AMOR (H.).** A seroepidemiological survey of equine influenza and equine infectious anaemia in northeastern Tunisia. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1994, **47** (3) : 277-281
- Using the haemagglutination inhibition and immunodiffusion tests, a national serological survey was carried out to detect antibodies to equine influenza (EI) (A/equi/1/Prague 56 and A/equi/2/Miami 63) and equine infectious anaemia (EIA) in horse sera collected in northeastern Tunisia. 533 samples were analysed for EIA antibodies. All were negative. 13.6 % of 433 equine sera tested for EI antibodies were positive. These results are discussed and compared with others obtained in Tunisia and bordering countries.
- Key words* : Ass - Horse - Mule - Equine infectious anaemia - Equine influenza - Epidemiology - Survey - Serology - Immunodiffusion test - Antibody - Tunisia.