

2M11.2818.9

Université de Montréal

ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES INFECTIONS À *NEOSPORA CANINUM*
CHEZ LES BOVINS LAITIERS DU QUÉBEC.

par

Nadia BERGERON

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option sciences cliniques

Avril, 2000

©Nadia Bergeron, 2000



9.2126.1145

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as a faint watermark or bleed-through.

ETUDE ENTRAÎNÉE DES PÉRIODES A RÉGULARITÉ CARRÉE
CITEZ LES BONNES RAISONS ET LE CAS

SF
607
U54
2000
N. 007

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as a faint watermark or bleed-through.

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as a faint watermark or bleed-through.

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as a faint watermark or bleed-through.

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as a faint watermark or bleed-through.

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as a faint watermark or bleed-through.



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire est intitulé

ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DES INFECTIONS À *NEOSPORA CANINUM*
CHEZ LES BOVINS LAITIERS DU QUÉBEC.

présenté par :

Nadia BERGERON

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gaétan FAUBERT, président du jury

Gilles FECTEAU, directeur de recherche

Alain VILLENEUVE, codirecteur de recherche

Monique DORÉ, membre du jury

Mémoire accepté le :

Sommaire

Neospora caninum est un protozoaire connu depuis la fin des années 80. Cet agent pathogène est considéré maintenant comme une cause importante d'avortements chez les bovins laitiers. Le seul mode de transmission accepté est la transmission transplacentaire (verticale) et il semble le plus important. Jusqu'à récemment, les seuls stades connus du parasite étaient les tachyzoïtes et les kystes contenant des bradyzoïtes. Depuis 1998, des oocystes ont pu être identifiés dans des fèces de chiens. Ceux-ci avaient ingéré des souris infectées expérimentalement par *N. caninum*. Le chien serait donc un hôte définitif de *N. caninum*. Ce parasite pourrait être transmis aux vaches par les chiens, le seul hôte définitif connu. Les fœtus bovins et les placentas pourraient être une source d'infection pour les chiens.

Les buts de cette étude étaient d'évaluer la transmission verticale dans les troupeaux laitiers du Québec et d'identifier la présence de transmission horizontale dans ces mêmes troupeaux. Cette étude voulait aussi vérifier la possibilité que les placentas de veaux nés à terme provenant de vaches séropositives soient une source de matériel infectieux pour les chiens et finalement, vérifier le rôle du chien dans l'infection à *N. caninum*.

La généalogie des vaches de 23 troupeaux laitiers du Québec a été examinée pour permettre d'évaluer la transmission verticale et horizontale. Par la suite, 16 placentas, dont 11 provenant de mères séropositives à *N. caninum* ont été examinés à l'histologie, à l'immunoperoxydase et par la méthode PCR pour identifier la présence de *N. caninum*. Finalement, 9 chiots ont été inoculés avec des fœtus bovins infectés

de *N. caninum*. Les chiots ont été suivis sur une période de 6 semaines. Les données recueillies au cours de l'étude étaient la température rectale, le pouls, la fréquence respiratoire, l'état d'éveil du chiot, la formule hématologique, l'analyse sérologique et coprologique.

La transmission verticale a été estimée à 44,4%, variant de 0% à 85,7% et la séroprévalence variait de 4,3% à 61,8% (moyenne = 21,9%). La transmission horizontale a été identifiée 7 fois dans 6 troupeaux différents. Une placentite légère a été observée chez tous les placentas étudiés. *N. caninum* n'a pas été identifié par la méthode d'immunoperoxydase, mais 2 placentas de mères séropositives ont eu un résultat positif par la méthode PCR. Aucun des chiots ayant ingéré des fœtus positifs à *N. caninum* n'a excrété le parasite, séroconverti, démontré des signes cliniques ou développé des lésions à l'autopsie.

Le pourcentage de transmission verticale varie d'un troupeau à un autre, mais semble plus élevé dans les troupeaux à prévalence élevée. La transmission horizontale ne semble pas être la route d'infection majeure pour *N. caninum*. Les résultats obtenus des placentas de veaux nés à terme de mères séropositives indiquent que les placentas pourraient être une source potentielle d'infection pour les chiens. Cependant, le fait que des chiens ne soient pas devenus infectés après avoir ingéré des fœtus suggère que d'autres études seraient nécessaires pour établir le rôle exact du chien dans l'infection à *N. caninum* et déterminer l'hôte définitif de cette infection.

Table des matières

Page titre	i
Identification du jury	ii
Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	x
Dédicace	xi
Introduction	1
Première partie : Les infections à <i>Neospora caninum</i>. Revue de littérature	4
Nomenclature et description du parasite.....	5
Historique	8
Hôtes.....	9
Prévalence	10
Distribution géographique	12
Cycle de transmission.....	14
Cycle entéroépithélial de <i>Toxoplasma gondii</i>	14
Cycle extraintestinal de <i>Toxoplasma gondii</i>	16
Niche	16

Épidémiologie	18
Transmission verticale.....	18
Transmission horizontale	19
Le rôle du chien dans la transmission	20
La néosporose chez le chien et la toxoplasmose chez le chat	21
L'infection chez le chien	22
Pathogénie	25
Chez le veau	25
Chez le chien	26
Signes cliniques	27
L'avortement chez la vache	27
La néosporose chez le veau	29
La néosporose canine	29
La toxoplasmose canine	30
Diagnostic	30
Présence de lésions caractéristiques ou de l'agent étiologique.....	30
Présence d'anticorps dans le sérum	32
Traitements	34
Essais <i>in vitro</i>	34
Chez le chien	35
Chez la vache	35
Vaccination	36
Impact économique	37

Contrôle	38
Objectifs de l'étude	40
Deuxième partie : <i>Neospora caninum</i> : épidémiologie de l'infestation	41
Article 1 : Vertical and horizontal transmission of <i>Neospora caninum</i> in dairy herds in Québec	42
Article 2 : Rare detection of <i>Neospora caninum</i> in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves	61
Article 3 : Infections expérimentales de chiots avec des fœtus bovins infectés par <i>Neospora caninum</i>	78
Discussion	111
Conclusion	117
Bibliographie	119
Remerciements	xii

Liste des tableaux

Revue de littérature

I- Dimension et forme des différentes structures de <i>Neospora caninum</i>	6
II- Dimension et forme des différentes structures de <i>Toxoplasma gondii</i> ...	7
III- Prévalence de <i>Neospora caninum</i> dans les troupeaux laitiers dans différents endroits	10
IV- Prévalence chez les vaches suite à un problème d'avortements à <i>Neospora caninum</i> dans le troupeau	11
V- Prévalence de <i>Neospora caninum</i> chez les vaches laitières dans la population en général	11
VI- Prévalence des diagnostics de <i>Neospora caninum</i> chez les avortons bovins soumis aux laboratoires de diagnostic	12
VII- Présence de <i>Neospora caninum</i> comme cause d'avortements chez les bovins laitiers	13

Article 1

1- Herd size, % of cows tested, % prevalence, % vertical transmission rate, presence of horizontal transmission, and the number of dogs during the 3 y prior to test date for each herd studied	56
---	----

Article 2

1- Demographic information concerning placentas examined	76
--	----

Article 3

1- Données démographiques, ratio ELISA et résultats de coprologie des chiots des 3 expériences à T0	107
2- Ratio ELISA des vaches lors de l'avortement et lésions retrouvées dans le cerveau des fœtus ingérés par les chiots des 3 expériences	108
3- Changements macroscopiques et microscopiques chez les chiots de l'expérience 3	110

Liste des figures

Revue de littérature

- 1- Phylum des *Apicomplexa* 5
- 2- Cycle hypothétique de la transmission de *Neospora caninum* 15

Article 1

- 1- Prevalence and vertical transmission for each herd studied 59
- 2- Genealogy of the 6 families in which horizontal transmission was
identified 60

À Roger,
Qui m'a soutenue et encouragée
pendant ce travail.

Introduction

Neospora sp est un protozoaire connu depuis seulement une dizaine d'années. *Neospora* sp fut identifié en premier chez le chien (57) et par la suite chez les bovins laitiers (169). Ce parasite est nommé *Neospora caninum*, en 1988, parce qu'on peut distinguer structurellement cet organisme des autres parasites coccidiens connus (57).

N. caninum est l'espèce la plus souvent rencontrée. Cette espèce a été isolée chez plusieurs hôtes intermédiaires ainsi que chez un hôte définitif, le chien. Les principaux hôtes intermédiaires naturels sont : les chiens, les bovins, les moutons, les chèvres, les chevaux et les chevreuils (50).

N. caninum cause principalement des avortements chez les bovins laitiers (3, 51, 71, 171). Au Québec, en 1999, les Laboratoires du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) ont isolé *N. caninum* chez 11,6% des avortons bovins (MAPAQ). De plus en plus, les laboratoires identifient le parasite comme cause d'avortements chez les bovins partout dans le monde (50). Dix-neuf à 43% des avortements sont dus à *N. caninum* en Californie, en Argentine et en Australie (3, 4, 24, 181).

Il est important de connaître l'épidémiologie de l'agent infectieux qui est en cause lors d'avortements pour recommander les mesures préventives adéquates.

Peu de choses sont présentement connues sur l'épidémiologie de la néosporose. Les scientifiques s'appuient sur le cycle de vie de *Toxoplasma gondii* pour identifier celui de *N. caninum*. En effet, ces 2 parasites sont des coccidies faisant parties du phylum des *Apicomplexa* (57). Les 2 maladies cliniques, la toxoplasmose

et la néosporose, ont longtemps été confondues chez le chien à cause de la similarité des signes cliniques (57).

Le seul mode de transmission accepté est la transmission verticale (transplacentaire) et ce mode semble être le moyen de transmission le plus important (38, 61, 71, 146). Dans des troupeaux avec des problèmes d'avortements à *N. caninum*, la transmission verticale a été évaluée entre 72% et 95,2% (40, 101, 145, 162, 187). Des études séroépidémiologiques supportent le rôle du chien dans l'infection à *N. caninum* (143, 161, 185) et récemment, le chien a été identifié comme étant un hôte définitif de *N. caninum* (116, 125).

Il reste encore beaucoup d'études à réaliser pour comprendre le cycle de vie de ce parasite. Il faudrait aussi arriver à connaître tous les hôtes définitifs possibles, les sources d'infection probables et les modes de transmission de *N. caninum* pour mieux contrôler la maladie.

Ce parasite prend de l'importance au Québec : *N. caninum* est diagnostiqué de plus en plus dans les laboratoires du MAPAQ et les avortements sont, de plus, une perte économique importante pour l'éleveur. Toutes ces questions nous ont amené à établir les buts de notre étude. Ceux-ci sont :

- 1- D'estimer le pourcentage de transmission verticale chez les bovins laitiers du Québec et de le comparer aux pourcentages des autres études.
- 2- D'évaluer la présence de transmission horizontale dans les troupeaux laitiers du Québec.
- 3- De déterminer la présence de *N. caninum* dans des placentas provenant de mères séropositives à *N. caninum* et vêlant à terme.

- 4- De vérifier si le chien est un hôte définitif de *N. caninum* en l'infectant expérimentalement avec des tissus provenant d'avortements à *N. caninum*.

Première partie :

Les infections à *Neospora caninum*.

Revue de littérature

Les infections à *Neospora caninum*

Nomenclature et description du parasite :

Neospora caninum est un parasite coccidien, classé dans le phylum des *Apicomplexa* (57) (Figure 1, page 5).

Figure 1. Phylum des *Apicomplexa*.

Phylum	→	<i>Apicomplexa</i>		
Classe	→	<i>Sporozoa</i>		
Ordre	→	<i>Eucoccidiorida</i>		
Familles	→	<i>Eimeriidae</i> ,	<i>Cryptosporidiidae</i> ,	<i>Sarcocystidae</i>
Genres	→	<i>Eimeria</i>	<i>Isospora</i>	<i>Toxoplasma</i> , <i>Hammondia</i> , <i>Neospora</i> , <i>Sarcocystis</i>

Les stades connus du parasite sont les tachyzoïtes, les kystes contenant des bradyzoïtes (33, 65, 119, 166) et les sporozoïtes dans les oocystes (116, 125) (Tableau I, page 6). Les tachyzoïtes et les kystes sont des stades de la reproduction asexuée du parasite et sont retrouvés à l'intérieur des cellules chez les hôtes

Tableau I. Dimension et forme des différentes structures de *Neospora caninum*.

Structure	Dimension	Forme	Localisation	Références
Kyste	jusqu'à 107 µm de long	rond à ovale	SNC, rétine, muscles oculaires, nerfs périphériques	37, 57, 65, 71, 120
Capsule du kyste	jusqu'à 4 µm d'épaisseur	lisse	SNC, rétine, muscles oculaires, nerfs périphériques	71
Tachyzoïte	3 à 7 X 1 à 1,5 µm	ovulaire, croissant de lune	plusieurs cellules de l'hôte	70, 71
Bradyzoïte	6 à 8 X 1 à 1,8 µm	mince	SNC, rétine, muscles oculaires, nerfs périphériques	71
Oocyste	10 X 11 µm	rond à ovale	fèces des chiens, non-sporulés	125, 121
Oocyste sporulé	11,7 X 11,3 µm	rond à ovale	fèces des chiens	121
Sporocyste	8,4 X 6,1 µm	ellipse	sporulation dans les oocystes	121
Sporozoïte	6,5 X 2,0 µm	allongée	dans les oocystes	121

Tableau II. Dimension et forme des différentes structures de *Toxoplasma gondii*.

Structure	Dimension	Forme	Localisation	Références
Kyste	5 à 60 µm	variable selon la cellule infectée	SNC, muscles et organes viscéraux	54, 59, 66
Capsule du kyste	0,5 µm d'épaisseur	élastique	SNC, muscles et organes viscéraux	54
Tachyzoïte	6 X 2 µm	croissant de lune	plusieurs cellules	54, 59, 66
Bradyzoïte	plus mince que tachyzoïte	croissant de lune	SNC, muscles et organes viscéraux	59, 66
Oocyste	10 X 12 µm	rond à ovale	fèces des chats, non-sporulés	54, 59, 66
Oocyste sporulé	11 X 13 µm	ellipse	fèces des chats	54
Sporocyste	6 X 8 µm	ellipse	sporulation dans les oocystes	54
Sporozoïte	2 X 8 µm	forme de banane	dans les oocystes	54, 59, 66

intermédiaires (51). Les oocystes font partie du stade sexué du parasite chez l'hôte définitif.

Tout au long de la revue de littérature, une comparaison sera faite avec le parasite *Toxoplasma gondii*. Il existe trois stades infectieux chez le chat pour *T. gondii* : tachyzoïtes, bradyzoïtes (contenus dans les kystes) et sporozoïtes (stade résistant contenus dans les oocystes) (45, 54, 59, 66) (Tableau II, page 7).

Historique :

La néosporose est identifiée pour la première fois en Norvège en 1984 chez des chiots de race Boxer, mais l'agent infectieux n'est pas identifié (18). Les auteurs ont conclu qu'il s'agissait d'un sporozoaire formant des kystes, probablement une coccidie au cycle de vie inconnu retrouvée dans le système nerveux central et les muscles des chiens (18). Jusqu'au milieu des années 80, étant donné la similarité des signes cliniques chez le chien pour la néosporose et la toxoplasmose, ces 2 maladies étaient confondues (57). De plus, dans la plupart des cas de toxoplasmose, le diagnostic est fait par un examen histologique et il est rarement confirmé par l'isolement de *T. gondii* dans les tissus infectés ou par une technique immunologique (57). Le protozoaire *N. caninum* fut identifié en 1988 chez le chien (57). On l'identifie comme une coccidie formant des kystes dans le phylum des *Apicomplexa* (57). *N. caninum* et *T. gondii* sont similaires structurellement (57, 62). Dubey *et al* ont documenté, dans une étude rétrospective américaine, des cas de néosporose canine aussi tôt qu'en 1957 (57, 65).

Les premiers cas d'avortements à *N. caninum* chez les bovins ont été diagnostiqués en 1989 au Nouveau-Mexique dans un troupeau laitier où 29 vaches d'un troupeau de 240 ont avorté sur une période de 5 mois (169). Par la suite, plusieurs cas d'avortements à *N. caninum* ont été rapportés (3, 4, 12, 13, 17, 98, 136, 174, 187). À l'échelle mondiale, l'infection à *N. caninum* est considérée comme une cause importante d'avortements chez les bovins (50).

Une étude rétrospective, faite par Thurmond *et al* en Californie, rapporte que la proportion annuelle de foetus infectés par *N. caninum* est demeurée constante de 1985 à 1990, suggérant que l'avortement à *N. caninum* n'est pas une nouvelle maladie, mais plutôt une maladie nouvellement diagnostiquée (172). Au Québec, les premiers cas d'avortements à *N. caninum* ont été diagnostiqués en 1993 (Laboratoires du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ)).

Hôtes :

Le chien serait un hôte définitif, mais il peut aussi servir d'hôte intermédiaire. Les bovins, les moutons, les chèvres, les chevaux et les chevreuils sont des hôtes intermédiaires naturels pour *N. caninum* (50). On retrouve des anticorps contre *N. caninum* chez des buffles, des coyotes, des renards roux, des cerfs à queue blanche et des chameaux suggérant que ces hôtes sont aussi des hôtes naturels pour *N. caninum* (28, 63, 79, 92, 97, 117, 165). Les chats, les souris, les porcs, les rats, les gerboises, les renards et les singes sont des hôtes intermédiaires expérimentaux (51).

Pour la toxoplasmose, tous les animaux non-félins sont des hôtes intermédiaires, incluant l'humain (66). Les félins, domestiques et sauvages, sont les

hôtes définitifs connus pour *T. gondii* (45, 59, 66). Ils peuvent aussi servir d'hôtes intermédiaires et ils constituent le réservoir principal de l'infection (45, 66).

Prévalence :

La prévalence dans différents endroits dans le monde et calculée selon certaines conditions est présentée dans les tableaux suivants (Tableaux III, IV, V et VI, pages 10 à 12).

Tableau III. Prévalence de *Neospora caninum* dans les troupeaux laitiers dans différents endroits.

Endroit	Prévalence (%) ^a	Références
Québec	73 ^b	143
Brésil	93 ^c	84
Espagne	83 ^c	155
Danemark	74 ^d	100

^aUn troupeau est considéré positif quand au moins une vache est séropositive.

^bTroupeaux sans problème d'avortement.

^cTroupeaux choisis au hasard.

^dTroupeaux avec ou sans problème d'avortements.

Tableau IV. Prévalence chez les vaches suite à un problème d'avortements à *Neospora caninum* dans le troupeau.

Endroit	Prévalence (%)	Références
Québec	22,5	143
Angleterre	9,0 à 64,5	38, 39, 179, 181
Hongrie	9,0	96
Ouest de la France	26,0	151
Irlande du Nord	12,6	131

Tableau V. Prévalence de *Neospora caninum* chez les vaches laitières dans la population en générale.

Endroit	Prévalence (%)	Références
Québec	7,5	143
Brésil	14,1	84
Angleterre	6,0	39
Espagne	35,9	155
Danemark	16,0	15
Sud du Viêt-nam	5,5	97
Nouvelle-Zélande	6,8	157

Tableau VI. Prévalence des diagnostics de *Neospora caninum* chez les avortons bovins soumis aux laboratoires de diagnostic.

Endroit	Prévalence (%)	Références
Québec	11,6	MAPAQ
Californie	19,0 à 43,0	3, 4
Argentine	24,4	181
Angleterre	12,5	39
Australie	21,0	24

Distribution géographique :

On a signalé la présence de ce parasite comme cause d'avortements chez les bovins dans plusieurs pays. Ce parasite a une distribution mondiale. Ces pays sont répertoriés par continent dans le tableau VII à la page 13.

Tableau VII. Présence de *Neospora caninum* comme cause d'avortements chez les bovins laitiers.

Continent	Pays	Références
Amérique	Canada	17, 26, 80, 104, 129, 143
	États-Unis	3, 4, 13, 78, 84, 133, 146, 159, 164, 169, 176, 190
	Mexique	1
	Brésil	84
	Argentine	29
Europe	Espagne	82
	France	101, 151
	Hongrie	96
	Hollande	189
	Allemagne	162
	Danemark	2
	Angleterre	46, 137, 138, 139, 140, 179
	Irlande	85, 130, 131
	Écosse	27
	Suède	19, 94
Asie	Israël	88
	Viêt-nam	97
	Japon	136, 193
Afrique	Zimbabwe	99
	Afrique du sud	98
Océanie	Australie	24
	Nouvelle-Zélande	35, 156, 171
	Tasmanie	134

Cycle de transmission :

Le cycle de transmission de *N. caninum* n'est pas complètement connu. On croit que son cycle ressemblerait à celui de *T. gondii* à cause des similarités taxonomiques (95) et morphologiques entre les 2 parasites. Un cycle hypothétique de transmission a été fait pour *N. caninum* (Figure 2, page 15).

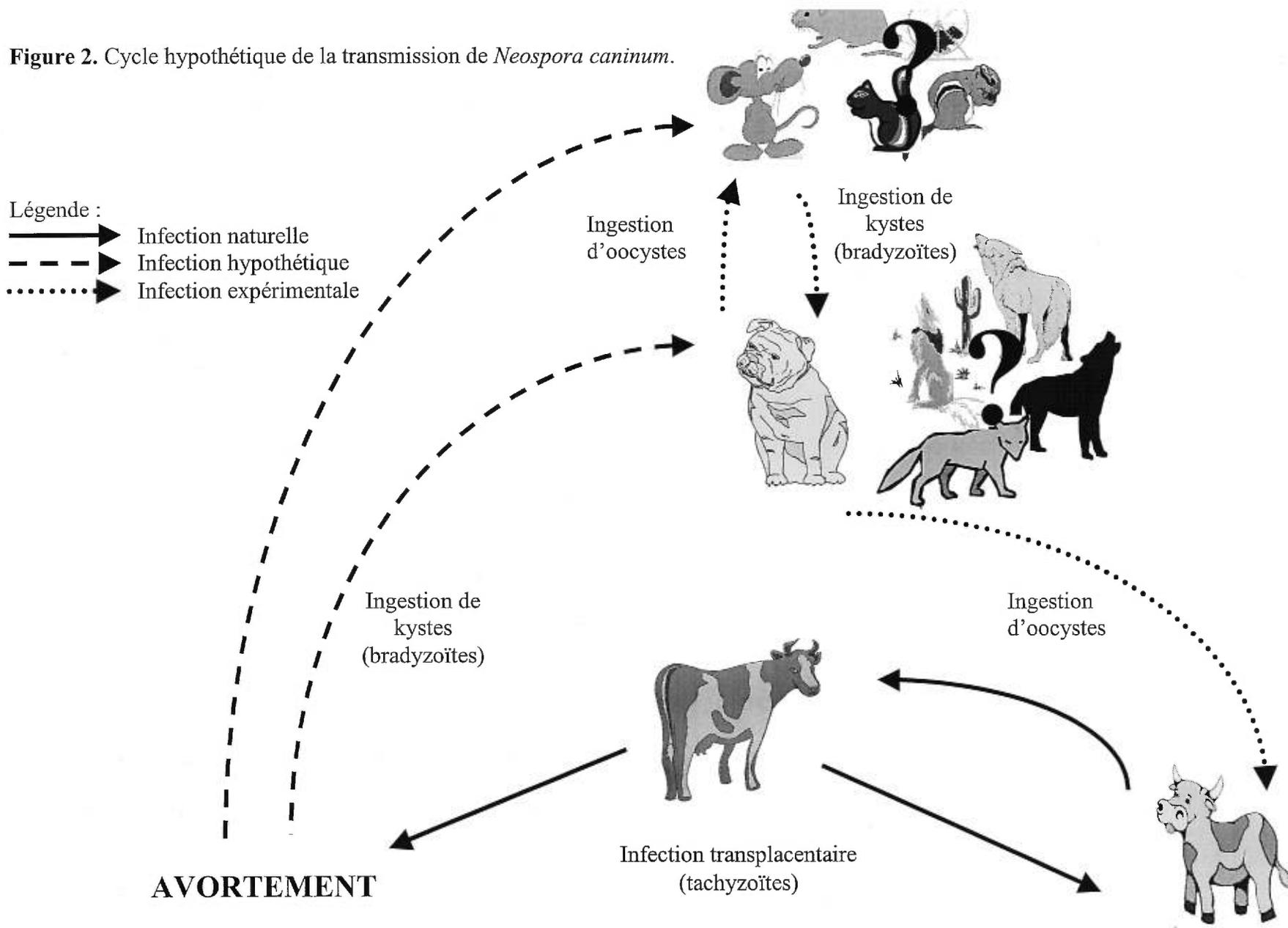
Le chien serait l'hôte définitif pour le parasite *N. caninum*. Il excréterait des oocystes dans ces fèces pour ainsi contaminer les hôtes intermédiaires. Une étude a démontré que les oocystes pouvaient être infectieux chez les veaux (41), ce qui va permettre d'étudier davantage la transmission horizontale. Les veaux morts, les avortons et les placentas contenant des kystes de *N. caninum* pourraient être une source d'infection pour les hôtes intermédiaires et/ou définitif. Le chien pourrait aussi s'infecter par ingestion de souris infectées de kystes comme dans l'étude expérimentale (125). Il reste encore beaucoup d'études à faire.

Donc, *N. caninum* aurait un stade sexué chez l'hôte définitif suivi par un stade asexué chez l'hôte intermédiaire. On suppose que les cycles entéroépithélial et extraintestinal seraient similaires à ceux de *T. gondii*.

Cycle entéroépithélial de *Toxoplasma gondii*

La plupart des chats s'infectent en ingérant des hôtes intermédiaires infectés par des kystes de *T. gondii*. Les bradyzoïtes sont relâchés des kystes dans l'estomac et l'intestin. Ils pénètrent les cellules épithéliales du petit intestin et initient les phases de reproduction asexuées et sexuées. Après quelques générations, un macrogamète fertilisé par un microgamète forment un oocyste (54, 59, 66, 77). Les oocystes non-sporulés sont excrétés dans les fèces des chats (150).

Figure 2. Cycle hypothétique de la transmission de *Neospora caninum*.



Cycle extraintestinal de *Toxoplasma gondii*

Le développement extraintestinal de *T. gondii* est le même pour tous les hôtes et il n'est pas dépendant de la forme ingérée. Après l'ingestion d'oocystes, les sporozoïtes libérés de l'œuf pénètrent les cellules intestinales. Ils se divisent par un processus asexué, appelé endodyogénie, et forment des tachyzoïtes (54, 59, 66). Si la cellule infectée rompt, les tachyzoïtes infectent une nouvelle cellule, sinon ils se multiplient dans la cellule pour une période indéterminée et forment éventuellement des kystes. Ceux-ci grandissent dans la cellule et contiennent plusieurs bradyzoïtes (54, 59, 66).

Niche :

Il y a différents isolats reconnus de *N. caninum* chez les chiens et chez les bovins, dont voici les principaux : NC-1, NC-2, NC-3, NC-Liv, NC-SweB1, NC-JPA1, BPA-1, BPA-2, BPA-3 et BPA-4 (8, 11, 14, 34, 36, 62, 89, 122, 167, 192).

Les tachyzoïtes de *N. caninum* se divisent rapidement par endodyogénie (57, 70, 71, 114) et ils sont détruits par l'acidité gastrique et la pepsine (114). Les tachyzoïtes peuvent pénétrer par voie orale lors d'un trauma buccal ce qui leur permet d'éviter l'estomac (71, 114). On les retrouve habituellement à l'intérieur d'une vacuole parasitophore dans le cytoplasme (71) de plusieurs cellules de l'hôte incluant: cellules nerveuses, macrophages, fibroblastes, cellules épendymales, cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, cellules polymorphonucléaires, myocytes, hépatocytes, neutrophiles et cellules mononucléaires du liquide céphalo-rachidien (47, 57, 166). Les cellules infectées de l'hôte peuvent contenir jusqu'à 100 tachyzoïtes dans une section de plan (71).

Les bradyzoïtes se retrouvent par centaine dans les kystes et ceux-ci ont été observés dans le système nerveux central, les nerfs périphériques, la rétine et les muscles oculaires (3, 12, 13, 37, 57, 78, 120, 133, 166). Les bradyzoïtes se multiplient lentement, par endodyogénie, ils ne sont pas détruits par l'activité gastrique et la pepsine et peuvent infecter par voie orale (114). Pour *T. gondii*, les bradyzoïtes diffèrent aussi des tachyzoïtes du fait qu'ils peuvent survivre au processus de digestion de l'estomac (59).

Récemment, McAllister *et al* (125) ont identifié des oocystes dans les fèces de chiots infectés expérimentalement. Les oocystes sont excrétés non-sporulés et non-infectieux. La sporulation survient en 3 jours et l'oocyste contient 2 sporocystes chacun contenant 4 sporozoïtes (116, 125). Lindsay *et al* (116) ont observé des oocystes qui avaient un sporocyste contenant 8 sporozoïtes et quelques oocystes ont sporulé en 24 heures à 37° C ou à la température de la pièce. Les oocystes de *N. caninum* ont une morphologie similaire à celle de *T. gondii* et *Hammondia hammondi* dans les fèces de chats et de *Hammondia heydorni* dans les fèces de chiens (125, 121). On sait aussi que les kystes de souris infectées expérimentalement ne sont pas infectieux pour les chats quand ils sont donnés oralement (127). Le chat ne serait donc pas un hôte définitif pour *N. caninum*.

Pour ce qui est de *T. gondii*, les oocystes sont excrétés dans les fèces des félins et les tachyzoïtes sont retrouvés à l'intérieur de plusieurs cellules des hôtes intermédiaires (59, 66). Les kystes sont retrouvés dans le système nerveux central, les muscles et les organes viscéraux des hôtes intermédiaires et ils persistent probablement pour toute la vie de l'hôte (59). Une fois infectés, les chats ont des kystes de *T. gondii* pour la vie. Les kystes peuvent rupturer de temps en temps et

libérer des bradyzoïtes qui peuvent initier une maladie clinique durant un état d'immunosuppression (66). Une excrétion d'oocystes pour la deuxième fois sera donc observée (45, 66).

Épidémiologie :

Transmission verticale

Le seul mode de transmission connu et accepté est la transmission verticale et il semble le plus important (5, 14, 19, 38, 40, 61, 71, 73, 101, 144, 145, 146). Cette transmission peut se faire sur plusieurs générations (5, 19, 162). Des études ont été faites dans des troupeaux laitiers ayant des problèmes d'avortements à *N. caninum*. Après avoir formé les liens familiaux dans les troupeaux, les différentes études rapportent une transmission verticale variant de 72% à 95,2% des cas (40, 101, 145, 162, 187). Les infections congénitales répétées chez les vaches seraient plutôt dues à une réactivation qu'à une réinfection du parasite en milieu de gestation (168). Cette conclusion provient d'une étude réalisée par Stenlund *et al* où ils ont remarqué un schéma constant chez toutes les vaches de l'étude (168). Ce patron consiste en une augmentation du titre des anticorps pendant les 2 gestations étudiées (168). L'augmentation des anticorps a lieu jusqu'au 5^{ème} et 6^{ème} mois de gestation pour atteindre ensuite un plateau (168). Ce patron a été observé autant chez les vaches qui n'avaient pas avorté que chez celles qui avaient avorté (168). *N. caninum* a été démontré dans des cerveaux de fœtus bovins 31 jours post-inoculation de la mère par des tachyzoïtes (15, 73). Ce résultat indique que *N. caninum* peut être transmis de façon transplacentaire, résultant en une infection fœtale (15). Les tachyzoïtes seraient le stade infectieux pour les fœtus (15).

Pour la toxoplasmose, la transmission congénitale survient habituellement si la brebis a été infectée pendant la gestation (25, 55, 59, 182) et < 1% des brebis avortent à cause de la toxoplasmose dans les gestations suivantes (182). Les avortements à *N. caninum* chez les vaches ont un patron différent de celui de *T. gondii* chez les brebis. En effet, les vaches peuvent transmettre l'infection plus d'une fois (5, 19, 162) et l'immunité ne semble pas protéger contre les avortements. La présence d'anticorps ne fait qu'identifier les animaux ayant eu un contact avec *N. caninum* (23).

Transmission horizontale

La transmission horizontale n'est pas encore acceptée unanimement par les scientifiques même si elle semble être nécessaire à l'introduction de nouvelles infections dans un troupeau (145, 146, 162, 176, 187) si on ne considère pas l'achat de vaches infectées. Jusqu'à présent, il n'y a pas de transmission horizontale directe de vache à vache qui a été démontrée (50, 51). Des études rapportent des évidences de transmission horizontale, cependant, il n'y a aucun cas qui a été rapporté dont l'agent de dispersion du parasite a été formellement identifié. Schares *et al* ont démontré dans un troupeau la probabilité d'une transmission horizontale par l'étude de la généalogie (162). Les critères utilisés étaient les suivants : une vache séropositive venant d'une mère séronégative et ayant 2 sœurs séronégatives (162). Davidson *et al* rapportent un taux d'incidence postnatale de 1,9/100 taures/an (40). Ils concluent également qu'il n'y a qu'un faible taux de transmission horizontale détectable (40). Hietala *et al*, dans une autre étude, ont trouvé que le taux d'infection postnatale est de moins de 1% par année (91). Ce faible taux d'infection postnatale confirme que la transmission verticale est le mode de transmission primaire qui

maintient l'infection chez les vaches (91). Une étude d'un épisode d'avortements dans un troupeau laitier réalisé par McAllister *et al* concluait que les avortements étaient dus à une exposition commune à une source, ce qui renchérit l'hypothèse que *N. caninum* peut être dispersé par un hôte définitif (126). Une étude a montré que les veaux pouvaient s'infecter suite à une inoculation orale par des oocystes de *N. caninum* provenant de fèces de chiots (41).

Le rôle du chien dans la transmission

Des études séroépidémiologiques supportent le rôle du chien dans le cycle de vie de *N. caninum* (143, 161). Sawada *et al* rapportent une prévalence plus élevée (31%) des infections à *N. caninum* chez des chiens vivant sur une ferme laitière avec des avortements à *N. caninum* que chez les chiens vivant en milieu urbain (7%) (161). L'étude réalisée au Québec en 1996 portait sur l'identification des facteurs de risque associés à la présence de *N. caninum* dans les troupeaux laitiers québécois (143). Cette étude suggère que *N. caninum* est une cause importante d'avortements que l'on retrouve dans la majorité des troupeaux laitiers du Québec. Les auteurs avaient identifié une forte association entre les troupeaux cas, la séroprévalence à *N. caninum*, la présence et le nombre de chiens, suggérant que les chiens puissent être impliqués dans la transmission de *N. caninum* aux vaches comme hôte définitif ou vecteur (143).

Une étude rapporte que 23,6% des chiens vivant sur une ferme étaient séropositifs à *N. caninum*, cette proportion était significativement plus élevée que la prévalence provenant d'une population de chiens vus en clinique (5,5%) (185). La séropositivité à *N. caninum* chez les chiens de ferme était fortement reliée avec une prévalence élevée d'anticorps à *N. caninum* chez les vaches (185). Dans les fermes,

où il n'y avait pas de chien, la séroprévalence à *N. caninum* des vaches était significativement plus basse que celle des fermes où les chiens étaient présents. Ces observations suggèrent une relation entre les infections à *N. caninum* chez les chiens et les vaches (185). Les hôtes susceptibles pourraient devenir infectés en ingérant de l'eau ou de la nourriture contaminées avec des oocystes de *N. caninum* provenant des fèces de chiens (125).

La néosporose chez le chien et la toxoplasmose chez le chat

La prévalence sérologique de la néosporose chez le chien varie d'un pays à l'autre. La prévalence varie de 0,2% à 20% en Angleterre, en Suède, aux États-Unis, en Australie, en Afrique, en Amérique du Sud, au Japon, en Belgique et au Danemark (7, 21, 30, 105, 180). Dans l'étude de Wouda *et al*, la séroprévalence des chiens augmentait avec l'âge indiquant une infection postnatale (185).

La prévalence chez le chat augmente avec l'âge pour la toxoplasmose (59). Dubey rapporte les prévalences suivantes pour différents groupes d'âge : de 4,5 à 10 semaines, la prévalence est de 8,6%, et elle passe à 16,2% pour le groupe d'âge de 11 à 26 semaines. La prévalence était plus élevée chez les chats errants (57,9%) que chez les chats domestiques (37,5%) de plus de 6 mois (42).

N. caninum se transmet de façon transplacentaire chez les chiens, il s'agit d'un passage de tachyzoïtes de la mère au fœtus (32, 65, 68). L'avortement chez la chienne peut survenir sur plusieurs gestations consécutives (62, 65).

La transmission transplacentaire arrive rarement chez les chats avec *T. gondii* (42, 43, 59) et les chatons infectés de façon transplacentaire meurent tôt dans la vie (42). En effet, l'infection est plus commune chez les chatons et elle arrive peu de temps après le sevrage soit par carnivores de vermines ou en partageant la

nourriture amenée par la mère (42, 45). Le transfert passif d'anticorps de la mère aux chatons n'affecte pas l'excrétion d'oocystes et les signes cliniques de la toxoplasmose chez les chats (45). Une infection congénitale répétée peut avoir lieu chez les souris, les rats, les cochons d'Inde, les hamsters et les chiens avec *T. gondii* (44, 102, 158). L'infection se fait par les tachyzoïtes.

L'infection chez le chien

McAllister *et al* ont démontré que le chien est un hôte définitif de *N. caninum* où la reproduction sexuée du protozoaire est possible (125). Ils ont montré que les chiens pouvaient s'infecter en consommant des tissus de souris contenant des kystes. Ainsi le cycle pourrait se résumer par un stade sexué chez le chien suivi par un stade asexué chez la vache qui se contaminerait en ingérant des aliments contaminés par des fèces de chiens excréteurs.

Le chien peut servir d'hôte intermédiaire et d'hôte définitif (51). McAllister *et al* ont inoculé 4 chiens avec des tissus de souris infectées avec des kystes pendant 3 jours consécutifs (125). Deux chiens ont servi de contrôle et ils ont reçu des tissus non-infectés de souris. Les chiens avaient 8 semaines d'âge. Un échantillon sanguin a été prélevé avant l'inoculation et 37 jours plus tard. Les fèces étaient recueillies et examinées quotidiennement pendant 30 jours par une technique de flottation au sucrose. Parmi les 4 chiens inoculés, 3 ont eu une réponse d'anticorps contre *N. caninum* 37 jours post-inoculation (125). Sur les 4 chiens inoculés, 3 ont excrété des oocystes dans les fèces. L'excrétion des oocystes s'est fait 8 à 13 jours post-infection et ce sur une période variant de 7 à 20 jours (125). La concentration d'oocystes dans les fèces était faible et semblait à peu près en proportion avec le nombre de kystes ingérés par les chiens (125). Cependant, 1 des 3 chiens qui a excrété des oocystes n'a

pas séroconverti. Aucun des chiens n'a démontré de signes cliniques. Des souris ont été inoculées *per os* et sous-cutané avec des fèces de chiens contenant des oocystes et chacune d'entre elles a développé des lésions de néosporose (125).

Une expérience similaire a été reprise par Lindsay *et al* (116). Deux chiens croisés de 14 semaines d'âge ont ingéré des cerveaux de souris contenant des kystes de *N. caninum*. Les 2 chiens ont excrété des oocystes dans leurs fèces. Un des chiens a reçu 100 mg d'acétate de méthylprednisone (AMP) par voie intramusculaire avant l'ingestion de kystes et il a excrété des oocystes les jours 5 à 10 post-ingestion (116). Un des chiens n'a pas reçu d'AMP et il a excrété des oocystes les jours 6 et 9 post-ingestion. Le chien immunosupprimé a excrété plus d'oocystes et il est le seul à avoir développé des anticorps contre *N. caninum* 35 jours post-ingestion (116). Aucun des 2 chiens n'a développé de signes cliniques. Aucun parasite n'a été vu chez les 2 chiens à l'examen histopathologique et immunohistochimique 42 jours post-ingestion. Cependant, des microgranulomes ont été observés dans le parenchyme du foie des 2 chiens et dans le cœur d'un des chiens (116). Ces lésions suggèrent une néosporose (71). L'identification des oocystes a été confirmée par l'inoculation de souris et la formation de kystes chez ces dernières (116). Il n'y a pas encore eu d'identification suite à une infection naturelle.

La faible quantité d'oocystes excrétés par les chiots de ces 2 expériences et le fait que le chien qui a excrété le plus d'oocystes est celui qui a reçu de l'AMP met en doute que le chien serait un hôte définitif. Le chien est peut-être un hôte accidentel ou le cycle de vie de *N. caninum* ne passe pas par l'ingestion de souris.

Par contre, l'excrétion des oocystes de *T. gondii* par les chats est mieux connue. Les chats peuvent excréter des oocystes après l'ingestion de kystes provenant

d'un hôte intermédiaire ou l'ingestion d'oocystes sporulés venant de l'environnement. La durée de l'excrétion est de 1 à 3 semaines (45, 59, 66, 76, 103). Généralement, les chats qui ont excrété des oocystes de *T. gondii* n'excréteront pas une deuxième fois (48). Chez les chats, l'immunité à *T. gondii* peut se mesurer par la suppression d'excrétion des oocystes (58). L'immunité dépend probablement de plusieurs facteurs comme la souche d'infection (les souches rencontrées peuvent être M-7741, ME-49, P-89, TS-2, RH, S-6, Beverly, 113-CE), l'âge du chat à la première infection et l'intervalle entre la première infection et une réinfection (48, 58). S'il y a une deuxième excrétion d'oocystes chez le chat, le nombre d'oocystes excrétés est moins important comparé à la première infection (45, 58) et la période d'excrétion est plus courte (58). Toutefois, il peut y avoir une recrudescence de la maladie et réexcrétion d'oocystes à la suite d'une réinfection par *T. gondii*, *Isospora felis* et *Isospora rivolta* (31, 58) ou suite à l'administration de corticostéroïdes (58).

La prévalence d'oocystes de *T. gondii* dans les fèces est faible (59). Les chats excrètent des oocystes sur une courte période de temps avant de démontrer des signes cliniques (56) suite à une première exposition à *T. gondii*. Par conséquent, des oocystes sont rarement vus lors d'un examen fécal de routine (45). De plus, les chats ne sont pas souvent malades cliniquement pendant la période d'excrétion des oocystes (59). Les oocystes de *T. gondii* sont indistincts morphologiquement des oocystes de *H. hammondi* et de *Besnoitia darlingi* retrouvés dans les fèces de chats (59, 103).

Le nombre d'oocystes excrétés dans les fèces des chats est élevé et il peut excéder plus de 100 000 oocystes/g de fèces (45, 48). Les chats de n'importe quel âge n'ayant jamais été exposés à *T. gondii* peuvent excréter des oocystes lors d'une

première infection (45). La formation d'oocystes est plus importante chez les chats de 6 à 14 semaines d'âge (45). La proportion de chats qui excrètent des oocystes est faible et atteint < 1% des chats en même temps (45).

Pathogénie :

Chez le veau

Il n'y a pas de lésions macroscopiques pathognomoniques lors de l'examen des fœtus infectés par *N. caninum*. Ceux-ci sont souvent autolysés et à l'occasion momifiés (12, 133, 169, 171, 186). Des foyers de nécrose peuvent être présents dans les muscles squelettiques, le cœur et le cerveau (71). On rapporte également de la malacie (137), une déviation de la colonne vertébrale (26) et une asymétrie du cordon médullaire (60).

Il n'y a pas de lésions macroscopiques pathognomoniques pour les placentas des avortons bovins à *N. caninum*. Deux études rapportent que 10 placentas sur 19 et 11 placentas sur 19 avaient des lésions de placentites lors de l'examen histologique (12, 133). Cependant, des organismes ressemblant à *N. caninum* n'ont été trouvés à l'histologie que dans un placenta (12). Dans une autre étude, un placenta d'un fœtus avorté avait des zoïtes de *N. caninum* (164).

Des lésions dégénératives ou de l'inflammation peuvent être observées dans tous les tissus du fœtus, mais elles sont plus communes dans le système nerveux central, les muscles squelettiques, le cœur et le foie (3, 12, 50, 51, 71, 133, 188). Les lésions seraient causées par la multiplication rapide des tachyzoïtes entraînant une lyse cellulaire (71). Les lésions microscopiques les plus fréquentes sont des encéphalites caractérisées par de la nécrose multifocale non-suppurative et de l'inflammation, des myocardites non-suppuratives, des myosites et des hépatites (3,

12, 13, 50, 60, 71, 78, 133, 136, 169, 171). Une étude rapporte que les lésions hépatiques sont plus sévères et que des tachyzoïtes de *N. caninum* sont observés plus souvent et en plus grand nombre dans les cas d'avortements épizootiques (188). Lors d'avortements, on remet en doute la seule présence de *N. caninum* comme diagnostic parce que beaucoup de veaux naissent infectés (177). Les auteurs recommandent d'accorder une attention particulière aux lésions associées (177).

Il est possible de voir des kystes dans le système nerveux des avortons, la rétine, les muscles oculaires et les nerfs périphériques (3, 12, 13, 37, 57, 71, 78, 120, 133, 166). Une étude rapporte un cas d'un veau de 3 jours d'âge avec plus de kystes dans la moelle épinière que dans le cerveau (13). On observe toutefois chez tous les fœtus infectés congénitalement que *N. caninum* est confiné dans le cerveau et la moelle épinière (71). Aucune étude jusqu'à maintenant n'a comparé la proportion de *N. caninum* dans le cerveau et la moelle épinière. La seule étude faite sur la distribution des lésions n'incluait pas la moelle épinière dans son étude (90). La formation de granulomes autour des kystes et des bradyzoïtes dégénérés (53, 61, 123) suggère que certains kystes rupturent et la réaction de l'hôte cause des inflammations focales (71).

Chez le chien

Il n'y a pas de lésions macroscopiques pathognomoniques chez les chiens atteints de néosporose. Les lésions prédominantes sont une encéphalomyélite, une polyradiculonévrite, une myocardite et une myosite (9, 36, 62, 65, 123, 154). Des parasites (tachyzoïtes ou kystes) sont observés dans le cerveau et ils sont vus plus souvent dans la matière grise que dans la matière blanche (9), on en rencontre aussi dans la moelle épinière (154). La variation dans la distribution et le nombre de

parasite reflète les différences dans la réponse immunitaire individuelle, la voie d'infection ou la souche de *N. caninum* qui est impliquée (9). Le diagnostic *post-mortem* est basé sur la présence de parasites dans les lésions et un test d'immunohistochimie confirme le diagnostic (71).

La biopsie musculaire évaluée par un test d'immunohistochimie (89) ou une aspiration de liquide pulmonaire ou de l'exsudat des pustules dermiques (57, 75, 87) sont des tests *ante-mortem* valables pour confirmer un diagnostic de néosporose chez le chien (10, 71).

L'immunohistochimie est nécessaire pour exclure la toxoplasmose parce que les tachyzoïtes de *N. caninum* ne sont pas différents de ceux de *T. gondii* à l'examen microscopique (71). La détection d'anticorps est possible dans le liquide céphalo-rachidien (71).

Signes cliniques :

L'avortement chez la vache

Les vaches n'ont pas d'autres signes cliniques que l'avortement (3, 12, 51, 71, 73, 169) et les vaches de tous âges peuvent avorter (50, 51, 71). Les avortements à *N. caninum* peuvent être sporadiques ou épidémiques (3, 4, 71, 126, 132, 133, 169, 170, 176, 179, 190) et jusqu'à 30% des animaux peuvent avorter dans un troupeau (50). Une même vache peut avorter à répétition (4, 14, 134). Par contre, *T. gondii* ne cause pas d'avortement chez les vaches (49). Il faut être prudent de ne pas incriminer automatiquement *N. caninum* lors d'avortements épidémiques (71). Les vaches séropositives sont 2 à 3,5 fois plus à risque d'avorter, lors d'avortements endémiques (39, 100, 132, 146, 174, 187). La prévalence des anticorps contre *N. caninum* est plus

élevée chez les vaches avec une histoire d'avortement (9% à 12,6%) que chez celles sans problème (1% à 3%) (131, 179). Une étude a montré que les vaches de troupeaux avec des avortements endémiques à *N. caninum* ont des résultats ELISA plus élevés que les animaux de troupeaux ayant des avortements épidémiques associés à *N. caninum* (163).

Les infections à *N. caninum* sont plus fréquemment rapportées chez les bovins laitiers, mais les bovins de boucherie peuvent aussi être affectés (12, 26, 71, 93, 133, 155, 183, 184). Les avortements peuvent arriver à n'importe quel temps de l'année (3, 12, 51, 172), cependant, en Californie, il semble-y en avoir moins au printemps (3, 12, 172). Les avortements à *N. caninum* peuvent arriver entre le 3^{ème} mois et la fin de la gestation (3, 12, 51, 71, 133, 169). La plupart des avortements surviennent entre le 5^{ème} et le 6^{ème} mois de gestation (3, 51). Il n'y a pas de cas d'avortement rapporté chez des fœtus de moins de 3 mois d'âge peut-être parce qu'ils ne sont pas diagnostiqués. Probablement que les fœtus de 1 à 2 mois d'âge sont résorbés *in utero* et on constate qu'il y a eu une mortalité fœtale lors du retour en chaleur de la vache (71).

Des parasites sont vus plus souvent chez les fœtus plus jeunes (12). Cette association entre l'âge du fœtus, le nombre d'organismes visibles et l'inflammation tissulaire reflète la maturation du système immunitaire (12, 136). Ainsi probablement qu'une infection transplacentaire en début de gestation entraîne un avortement alors qu'une infection en fin de gestation amènerait la naissance d'un veau infecté *in utero*.

Les fœtus provenant d'une mère positive à *N. caninum* peuvent mourir *in utero*, être résorbés, momifiés ou autolysés. S'ils se rendent à terme, les veaux

peuvent être mort-nés, naître vivants et malades ou naître cliniquement normaux et infectés chroniquement (50, 51, 71).

La néosporose chez le veau

Chez des veaux infectés congénitalement et né vivants, la maladie est normalement confinée au système nerveux central (71) mais, on a pu voir à l'occasion des signes neuromusculaires (13, 14, 26, 46, 51, 60, 64, 67, 115, 137, 147). Dans certains cas, les veaux peuvent naître plus petits, faibles et incapables de se lever (13, 26, 39, 51, 137, 147). Les membres antérieurs ou les membres postérieurs peuvent être fléchis ou en hyperextension (50, 51, 71). L'examen neurologique peut révéler de l'ataxie, une diminution des réflexes patellaires et une perte de proprioception consciente (14, 147). Les veaux peuvent aussi avoir de l'exophtalmie ou une apparence asymétrique des yeux (26, 137). Les signes cliniques n'ont été rapportés que chez des veaux de moins de 2 mois d'âge (50, 51). Cependant, la majorité des veaux qui ont des anticorps contre *N. caninum* ne démontrent pas de signe clinique (145).

La néosporose canine

La néosporose canine est une maladie neuromusculaire qui peut affecter les chiens de tous âges (10). Par contre, la plupart des cas sont des jeunes chiens infectés congénitalement (9, 10, 62, 71, 148, 154, 157). Les signes cliniques commencent par une parésie des membres postérieurs ou de l'ataxie qui évolue vers une paralysie progressive (71). L'atrophie musculaire est souvent présente (10, 36). Les membres postérieurs sont plus sévèrement affectés que les membres antérieurs et de l'hyperextension rigide peut aussi se développer (9, 10, 36, 89). Les chiens demeurent alertes et survivent plusieurs mois (71). Une paralysie ascendante chez des jeunes

chiens, particulièrement s'il y a plus d'un chiot de la même portée atteint, devrait évoquer une suspicion de néosporose (71).

D'autres signes cliniques incluent : un trémulus de la tête, un collapsus soudain due à la myocardite (10, 135), des difficultés à avaler et de la paralysie de la mâchoire (89). Une présentation inhabituelle de la néosporose est une dermatite pyogranulomateuse ulcéraire généralement retrouvée chez des chiens adultes (57, 75, 83, 149, 152). Les lésions peuvent être étendues et associées à du prurit (57, 75, 83, 149, 152).

La toxoplasmose canine

Les signes cliniques chez les chiens atteints de toxoplasmose sont localisés au niveau des systèmes respiratoire, neuromusculaire ou gastro-intestinal ou reliés à une infection généralisée. La forme nerveuse peut durer plusieurs semaines sans affecter d'autres systèmes, tandis qu'une maladie sévère impliquant les poumons et le foie peut tuer les chiens en 1 semaine. Une toxoplasmose généralisée est vue plus souvent chez des chiens de moins d'un an et est caractérisée par de la fièvre, de la dyspnée, de la diarrhée et des vomissements. L'ictère résulte d'une nécrose hépatique étendue (59).

Diagnostic :

Présence de lésions caractéristiques ou de l'agent étiologique

La meilleure façon d'avoir un diagnostic individuel lors d'avortement est l'examen du fœtus (50, 51). Idéalement, il faut soumettre au laboratoire de diagnostic le fœtus en entier et le placenta ainsi qu'un sérum maternel (71). Si le fœtus ne peut être soumis, il faut envoyer un échantillon de cerveau, de cœur et de foie pour un

examen histopathologique et des liquides fœtaux ou du sérum maternel et/ou fœtal (50, 71) pour un test sérologique (51).

Le diagnostic de néosporose chez des fœtus avortés ou des veaux infectés congénitalement s'appuie sur la présence de lésions microscopiques suggestives d'une infection à *N. caninum*. Ce diagnostic est provisoire (50, 51). Le test d'immunohistochimie a été développé en 1989 pour identifier *Neospora* dans les tissus (109). L'examen du cerveau à l'immunohistochimie est nécessaire pour un diagnostic définitif parce que, généralement, seulement quelques organismes viables de *N. caninum* peuvent être vus dans des tissus autolysés (52, 71, 133). Les tachyzoïtes de *N. caninum* dans les cerveaux de fœtus sont peu nombreux et souvent morts (71). Conrad *et al* rapportent qu'il est très difficile de cultiver des parasites provenant des cerveaux des fœtus, les auteurs suggèrent aussi que les parasites présents dans les fœtus avortés sont souvent morts (33). Ils ont réussi à isoler *N. caninum* de seulement 2 fœtus bovins sur 100 fœtus suspectés d'avoir avorté à cause de *N. caninum* (33). Ceci illustre la difficulté de diagnostiquer les avortements à *N. caninum*. Une étude indique que le succès pour isoler le parasite dépend du nombre d'organismes présents et de l'état d'autolyse (71). Les organismes sont dispersés dans les cerveaux des fœtus même chez ceux qui sont bien préservés (133).

Le diagnostic de toxoplasmose se fait aussi principalement par l'identification de lésions caractéristiques tout comme *N. caninum*. *T. gondii* produit de la nécrose caractéristique dans les cotylédons des placentas. Il est donc plus important de reconnaître le type de lésions que d'identifier l'organisme parce que l'organisme peut-être difficile à observer dans les placentas, particulièrement quand seulement des tachyzoïtes sont présents (55). Des kystes peuvent être vus quelques fois dans les

tissus. Il y a des lésions caractéristiques chez 90% des fœtus infectés congénitalement (55).

L'utilisation d'un outil moléculaire peut contribuer à simplifier l'identification du parasite *N. caninum*. La sonde PCR (Polymerase Chain Reaction) identifie un fragment d'ADN du parasite pour aider à différencier *N. caninum* de *T. gondii* (191). Yamage *et al* ont trouvé que la sonde PCR est un bon instrument pour le diagnostic de *N. caninum* (191). La sonde PCR peut être utilisée sur des tissus formolés, des tissus fixés à la paraffine ou des tissus frais provenant de chiens ou de vaches (16, 81). Une étude montre l'utilité de la méthode PCR pour identifier une infection à *N. caninum* lors d'avortements spontanés chez les bovins (16). Les auteurs ont utilisé des tissus formolés et fixés et des tissus frais ou congelés provenant de 61 avortons bovins où un examen avec la sonde PCR était réalisé (16). Le vrai statut de ces tissus était déterminé par des examens histologiques et d'immunoperoxydase. La méthode PCR a une meilleure sensibilité dans les tissus formolés et fixés à la paraffine (100%) que pour les tissus frais ou congelés (77%) (16). Les auteurs pensent que cette différence pourrait être due en partie à une plus grande précision des tissus sélectionnés suite à l'examen histologique (16).

Présence d'anticorps dans le sérum

Plusieurs tests sérologiques ont été développés depuis la découverte du parasite *N. caninum*. Les tests sérologiques incluent : le test IFA (Indirect Fluorescent Antibody), différents tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) et le test DAT (Direct Agglutination Test). L'IFA a été le premier test mis au point pour déterminer la présence d'anticorps contre *N. caninum* chez le chien (62) et ensuite chez les bovins (33). Des tachyzoïtes intacts sont utilisés comme antigènes pour

l'IFA. Le test détecte les anticorps qui sont dirigés contre les antigènes qui sont présents à la surface de la cellule du parasite (23). Cependant, l'IFA présente des problèmes de réactions croisées avec d'autres coccidies apparentées comme : *Sarcocystis*, *Cryptosporidium* ou *Eimeria* et probablement *T. gondii* et *H. hammondi* (13, 33, 34, 144, 179).

Le test ELISA a été décrit en 1994 pour la première fois (20) et par la suite il y a eu une expansion rapide des recherches sur ce test et beaucoup de développements pour différentes applications du test (23). Le test ELISA permet de mettre en évidence la présence d'anticorps contre un agent infectieux (23). Le test ELISA a plusieurs avantages sur le test IFA : le résultat de la réaction est un processus objectif (23) et le test est plus rapide et moins coûteux. Plusieurs variantes du test ELISA ont été développées pour évaluer la présence d'anticorps contre *N. caninum*. Le test ELISA est celui qui est le plus utilisé chez les bovins (23).

Récemment, un test DAT a été développé (141, 160). Ce test a l'avantage de ne pas avoir besoin d'un deuxième anticorps spécifique d'espèce (23). Le principe de ce test est que des tachyzoïtes intacts sont traités à la formaline et ceux-ci s'agglutinent en présence d'anticorps spécifiques. Ce test ne détecte que les IgG (23).

La chance de trouver des anticorps contre *N. caninum* chez les fœtus augmente avec le temps de gestation (71) parce que l'immunité fœtale est de plus en plus importante à mesure que le temps de gestation avance. La présence d'anticorps chez les fœtus avortés n'est probablement pas seulement due au passage passif des anticorps maternels provenant du placenta endommagé par d'autres microbes (71). Si on ne trouve pas d'anticorps chez des fœtus, il ne faut pas exclure un diagnostic de néosporose (71, 186). En effet, les fœtus pourraient être immunocompétents ou ne pas

avoir eu le temps de développer des anticorps entre le moment de l'infection et l'avortement (71, 186).

Récemment, Björkman *et al* ont décrit un test ELISA avec un IgG modifié qui a le potentiel de faire une différence entre une infection récente et chronique de *N. caninum* chez les vaches (22). Ce test ELISA est basé sur le fait que les premiers anticorps synthétisés après une stimulation antigénique ou une infection primaire ont une affinité plus faible que les antigènes qui sont produits plus tard (22). Les résultats de cette étude sont préliminaires et le test n'a pas été étudié sur des vaches infectées congénitalement (22).

Chez le chien, la sérologie, est un test utile pour une identification initiale des cas possibles de néosporose canine, cependant, la présence d'anticorps contre *N. caninum* n'est pas diagnostic pour la maladie car plusieurs chiens séropositifs sont en santé (10). Le test IFA est un des plus utilisé (71) et les réactifs sont disponibles commercialement (Veterinary Medical Research and Development Inc. (VMRD), P.O. Box 502, NW 115 State Street, Pullman, WA 99163) (71). Un test ELISA est aussi disponible chez le chien (20).

Traitements :

Essais *in vitro*

Des études *in vitro* ont été réalisées avec des médicaments qui sont utilisés pour le traitement de la toxoplasmose. Les sulfamides, les macrolides, les tétracyclines, les ionophores, les lincosamides, la pentamidine et les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase (ex : pyriméthamine) ont diminué la croissance du parasite en culture cellulaire (111, 118). La sulfadiazine prévient les signes cliniques et la

mortalité chez les souris (113). Cependant, les anti-inflammatoires stéroïdiens exarcèbent les signes cliniques (74, 110, 112) et réactivent les infections latentes (69).

Chez le chien

On suggère la sulfadiazine en combinaison au triméthoprime (Tribrissen®, Janssen Pharmaceutica Inc., 6705 Millcreek Drive, Mississauga, Ontario L5N 5R9) et la pyriméthamine (Daraprim®, Burroughs Wellcome Inc., 16751, route Transcanadienne, Kirkland, Québec H9H 4J4) pour 2 à 4 semaines afin d'atténuer les signes cliniques de *N. caninum* (123, 128). La clindamycine (Antirobe^{MD} capsules & liquide, Upjohn Santé Animale, 40, Centennial Road, Orangeville, Ontario L9W 3T3) a été utilisée dans les cas de myosite chez les chiens (86) et aussi dans des cas de dermatite (75, 152) suite à une infection à *N. caninum*. On suggère aussi le sulfamide et/ou la pyriméthamine et/ou la clindamycine pour traiter la néosporose canine (10). Un anticoccidien, le Décoquinate (Deccox®, Rhone-Poulenc Canada Inc., 1225 Volta, suite 200, Boucherville, Québec H4R 2B7), tue les tachyzoïtes de *N. caninum* en culture cellulaire (108). À présent, il n'y a aucune drogue efficace contre la forme kystique (51). Il y a des cas de rémissions spontanées possibles chez les chiots (153). La réponse au traitement dépend du stade de la maladie chez le chien lors du début du traitement (71). Présentement, il n'y a pas de traitement qui prévient la transmission de *N. caninum* aux rejetons chez les chiens (71).

Chez la vache

Chez les vaches laitières, il y a 2 problèmes associés aux traitements. Le premier est la difficulté de tuer les bradyzoïtes dans les kystes. Le deuxième est les résidus dans le lait chez les vaches en lactation. Pour les veaux infectés *in utero* et

présentant des signes neurologiques, il est possible d'utiliser une combinaison de triméthoprime, sulfadiazine et pyriméthamine (142). Pour le moment, il est difficile d'émettre une bonne stratégie de traitement puisque les vaches n'ont que des avortements comme signe clinique et qu'on ne sait pas quand a lieu la recrudescence du parasite. Il faudrait un traitement périodique efficace pour diminuer le pourcentage d'avortements et de transmission verticale chez les vaches laitières.

La vaccination

Une étude a utilisé des souris comme modèle dans une évaluation préliminaire de vaccination dans le but de prévenir la transmission verticale de *N. caninum* (106). La vaccination de souris femelles avec une seule dose semble amener une protection complète contre la transmission verticale lorsque les souris sont infectées post-vaccinales (106). Le potentiel de ce vaccin n'a pas encore été évalué chez les bovins (106). Les auteurs suggèrent qu'il serait intéressant de connaître l'efficacité du vaccin pour la prévention de la transmission verticale chez des animaux infectés chroniquement par *N. caninum* (106). Dans une autre étude, des tachyzoïtes de *N. caninum* sont préparés avec différents adjuvants et testés pour leur immunogénicité chez la vache (6). La réponse immunitaire chez les vaches immunisées se comparait à celle des vaches infectées expérimentalement avec des tachyzoïtes de *N. caninum* provenant de culture cellulaire (6). La réponse immunitaire chez les vaches immunisées était comparable avec les vaches infectées expérimentalement (6). Le vaccin (*Neospora caninum* vaccine (killed protozoa)) de la compagnie Bayer (Bayer Corporation, Agriculture Division, Animal Health, P.O. Box 390, Shawnee Mission, Kansas 66201) montre que tous les animaux ont eu un taux d'anticorps spécifiques à

N. caninum détectable et plus spécialement après la deuxième dose (Bayer). Il n'y a pas de vaccin pour prévenir l'excrétion d'oocystes chez les chiens (51).

Impact économique :

L'impact économique des avortements à *N. caninum* dépend des coûts indirects et de la valeur des fœtus perdus (50, 51). Les coûts indirects incluent ceux associés à l'aide professionnelle, au diagnostic, à remettre gravide les vaches qui ont avorté, à la diminution de la production laitière, à la perte d'un veau (résorption fœtale, mortalité fœtale, mortalité néonatale ou mort-né), à l'augmentation de l'intervalle de vêlage, à la diminution de la valeur marchande et au coût de remplacement des vaches qui sont réformées (173, 174, 175, 178).

Au Québec, la population des vaches laitières est estimée à 634 382 vaches (Direction de l'épidémiologie et de la santé animale, 200 chemin Ste-Foy, 11^{ème} étage, Québec, Québec G1R 4X6). On accepte que le taux d'avortements est d'environ 10%, que 11,6% des avortements ont un diagnostic de *N. caninum* (MAPAQ) et qu'un avortement en milieu de gestation peut coûter à l'éleveur 600\$ (50). On estime donc les pertes économiques reliées aux avortements à *N. caninum* à 4,4 millions \$ par année au Québec.

Les vaches séropositives produisent moins de lait (1 kg/vache/jour) que les vaches séronégatives pour la première lactation (175), au total 305 kg de lait/lactation de moins chez les vaches séronégatives (175). On ne sait pas encore si c'est le cas pour les autres lactations.

Une étude rapporte que les vaches séropositives à *N. caninum* sont réformées 6,3 mois plus tôt que les vaches séronégatives (173). De plus, les vaches séropositives

ont 1,6 fois plus de risque d'être envoyées à l'abattoir comparées aux vaches séronégatives (173).

Contrôle :

Un moyen de prévenir la transmission verticale est d'éliminer les vaches séropositives (50, 51, 91). Cependant, cette méthode est peu utilisable dans les troupeaux à prévalence élevée parce qu'un trop grand nombre de sujets devraient être éliminés (51). Une étude a démontré que l'analyse sérologique est un moyen efficace d'identifier les animaux infectés à *N. caninum*, particulièrement dans les premiers 3 à 6 mois de vie quand une élimination tôt aide à diminuer les coûts associés à la réforme (91). Il serait aussi possible de sélectionner les veaux provenant d'une mère séronégative et de vérifier l'utilisation du transfert embryonnaire chez des vaches séropositives ayant un bon pedigree. Une étude a fait des observations concernant le transfert embryonnaire. L'embryon de 7 jours ne transmettrait pas *N. caninum* aux vaches receveuses (101). Le transfert embryonnaire pourrait être utilisé pour garder des vaches séropositives à fort potentiel génétique (101). La mère porteuse transmettrait *N. caninum* à sa descendance (101). En effet, si la mère est une vache séropositive, celle-ci pourrait transmettre *N. caninum* au fœtus pendant la gestation. Il est donc important d'utiliser des mères porteuses séronégatives pour ainsi avoir plus de chance d'obtenir un veau séronégatif.

On ne connaît pas la fréquence d'excrétion des oocystes de *N. caninum* par les chiens et le temps de survie des oocystes dans l'environnement (50, 51). Il est donc prudent de protéger la nourriture et l'eau de la contamination par les fèces de chiens (50, 51). Puisque le chien est le seul hôte définitif connu pour ce parasite, il est

recommandé qu'il n'ait pas accès aux avortons, aux membranes fœtales et aux veaux morts (50, 51) puisqu'ils sont une source potentielle d'infection (185).

Les bradyzoïtes contenus dans les kystes de *N. caninum* peuvent survivre jusqu'à 14 jours à 4° C dans un cerveau homogénéisé, mais ils deviennent non-infectieux à -20° C pour au moins 7 jours (107). Les bradyzoïtes dans les kystes ont également survécu dans le cerveau intact d'une carcasse de souris à 4° C pour 7 jours (107). Cependant, des kystes provenant d'un cerveau de veau ont survécu à -52° C pendant 4 mois (26). Il semble que les bradyzoïtes dans les kystes conservés à une température de réfrigération peuvent survivent quelque temps, alors qu'à une température de congélation leur survie est moins bonne. Cependant, il semble qu'à très basse température (- 52° C), les bradyzoïtes dans les kystes peuvent survivre un certain temps.

Il n'y a qu'une étude qui a été faite sur la viabilité des oocystes de *N. caninum*. Les résultats de cette étude montre que les oocystes de *N. caninum* demeurent viables au moins 14 jours après un traitement avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5,25% (v/v) (72). Des études supplémentaires sont à effectuer sur les oocystes de *N. caninum* pour évaluer leur résistance sous différentes conditions environnementales. Cependant, on connaît la résistance des oocystes sporulés de *T. gondii* sous différentes conditions environnementales (59, 76, 103).

Objectifs de l'étude :

Il serait intéressant d'estimer la transmission verticale dans les troupeaux laitiers du Québec et de vérifier l'importance de la transmission horizontale comme moyen de transmission du parasite. Pour ce qui est de la transmission verticale, celle-ci pourrait être estimée en utilisant des troupeaux avec ou sans problème d'avortements à *N. caninum*. Suite à des expériences (116, 125), le chien est reconnu comme étant un hôte définitif. Le chien agit-il comme hôte définitif ou comme un hôte accidentel possible ? Une limite de ces 2 expériences est qu'elles ont été réalisées avec des souris infectées de façon expérimentale. Il serait intéressant d'inoculer l'hôte définitif avec du matériel infecté de façon naturelle. Il semble aussi peu probable que les chiens s'infectent avec des souris sur les fermes. Le comportement des chiens les attire plutôt vers les fœtus, les placentas et les veaux morts. Ces matériaux infectieux ont été mentionnés comme étant une source potentielle d'infection pour le chien, il faudrait les utiliser pour infecter des chiens.

Deuxième partie :

***Neospora caninum* : épidémiologie de l'infestation**

Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec

Nadia Bergeron, Gilles Fecteau, Julie Paré, Roger Martineau, Alain Villeneuve

Département de sciences cliniques (Bergeron, Fecteau), Département de pathologie et microbiologie (Villeneuve), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6 ; Biovet, 2900 rue Vanier, St-Hyacinthe, Québec J2S 6M2 (Paré) ; Clinique Vétérinaire de Coaticook, 490 rue Main Ouest, Coaticook, Québec J1A 2S8 (Martineau).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Nadia Bergeron.

Cet article a été accepté en novembre 1999 par le Canadian Veterinary Journal.

Abstract

Neospora caninum is an important cause of abortion in dairy cattle. The objective of this observational study was to estimate the rate of vertical transmission of *N. caninum* in dairy herds in Québec and to investigate horizontal transmission in the same herds. The genealogy of cows from 23 dairy herds were examined. Prevalence of seropositive animals in herds studied varied from 4.3% to 61.8% (average, 21.9%). The overall rate of vertical transmission was estimated to be 44.4%, varying from 0% to 85.7%. Seven cases of horizontal transmission were identified in 6 of the 23 herds studied. Estimated vertical transmission rate varied from herd to herd, but appeared to be higher in herds with a high prevalence of seropositive animals. Although horizontal transmission was identified in 6 herds, it does not appear to be the major route of infection for *N. caninum*.

Résumé

Neospora caninum est une cause d'avortement importante chez les vaches laitières. Les objectifs de cette étude sont d'estimer la prévalence de transmission verticale de *N. caninum* dans les troupeaux laitiers du Québec et d'examiner la possibilité de transmission horizontale dans les mêmes troupeaux. La généalogie des vaches de 23 troupeaux a été étudiée. La prévalence des animaux séropositifs varie de 4,3% à 61,8% (moyenne, 21,9%). La transmission verticale a été estimée à 44,4% pour l'ensemble des 23 troupeaux, variant de 0% à 85,7%. L'évidence de transmission horizontale a été identifiée 7 fois dans 6 troupeaux différents. La transmission verticale estimée varie d'un troupeau à un autre, mais elle semble plus élevée chez les troupeaux où la prévalence des animaux positifs est plus élevée. La

transmission horizontale, étant identifiée que dans 6 troupeaux, ne semble pas être la voie d'infection la plus importante pour *N. caninum*.

Introduction

Since the early 1990s, *Neospora caninum* has been considered, worldwide, as an important cause of abortion in cattle (1,2). Abortions are costly to the dairy industry with an estimated annual lost of 35 billion dollars in the United States (3,4).

Currently, vertical transmission of *N. caninum* is the only proven route of transmission and appears to be the main means of transmission in dairy herds. In previous studies of a limited number of herds, rate of vertical transmission varied from 72% to 93% (5-7). The similarities between *N. caninum* and *Toxoplasma gondii* suggest the existence of horizontal transmission via a definitive host. Dogs are identified as a definitive host for *N. caninum* (8), and a significant association between the presence and number of dogs on a farm and the prevalences of seropositive animals in a herd has been reported (9).

The protozoan was reported for the first time in Québec in 1993 (Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, (MAPAQ)). In 1996, 11.4% of aborted fetuses submitted to the provincial Québec veterinary diagnostic laboratory were infected with *N. caninum* (MAPAQ). Results of a case-control study indicates that *N. caninum* is present in the majority of dairy herds in Québec (9).

The primary objective of this observational study was to estimate the rate of vertical transmission of *N. caninum* in dairy herds in Québec and to compare these results with those of previous studies (5-7). A secondary objective was to investigate horizontal transmission of this protozoan in dairy herds in Québec.

Materials and methods

Herd selection and data collection

A letter was sent to all veterinarians who are members of the Québec Association of Large Animal Practitioners requesting their collaboration in finding herds that met the following criteria : 1) The serological status to *N. caninum* of a majority (more than 50 %) of animals over 6 mo of age was available, and 2) the herd records allowed the study of genealogy (dam identification, birthdates).

Each herd provided, for each subject tested, the *N. caninum* ELISA ratios, the birthdate, and the dam's identification and birthdate. Based on this information, the genealogy was built for each family in each herd. Information on the presence of dogs on the farms was recorded for the 3 y prior to the test date.

Serology

Determination of the status of the animal was based on the ELISA ratio results. Two different laboratories were used to obtain the ELISA results. Reported sensitivities and specificities varied from 88.4% to 99%, and 92.9% to 98.4%, respectively (Biovet, St-Hyacinthe, Québec, and MAPAQ, St-Hyacinthe, Québec) (9).

Genealogy study

The pedigree of each cow tested was traced on the dam's side by using diagrams. Similar to the definition proposed by Shares *et al* (7), horizontal transmission was considered to have occurred if a seropositive cow was born to a seronegative dam and was known to have a minimum of 2 seronegative sisters.

Statistical analysis

The prevalence of seropositive animals in each herd was computed as the number of seropositive cows divided by the total number of animals tested within that herd. The rate of vertical transmission was calculated within each herd and for all herds combined. The rate of vertical transmission was computed as the proportion of seropositive heifers born to seropositive dams. To ensure independence, when a dam had more than one heifer tested, one dam/heifer pair was selected randomly. The overall rate of vertical transmission was compared with that of 3 previous studies (5-7) by use of a chi-squared test (10). A correlation coefficient between vertical transmission and prevalence of seropositive animals was also computed (10). A Mann-Whitney test was used to test the association between the number of dogs on the farms and presence of horizontal transmission (10).

Results

Eleven veterinarians responded to the letter and provided a total of 23 dairy herds. Study herds were located in 5 different geographical regions of Québec. Herd size, as evaluated by the number of animals over 6 mo of age, varied from 36 to 205 (average, 90) (Table 1). In each herd, 52% to 100% of animals over 6 mo of age had been sampled and, in 16 of the 23 herds studied, the proportion of animals sampled was above 90% (Table 1). For computation of vertical transmission, the number of dam/heifer pairs studied per herd varied from 1 to 15, for a total number of 144 dam/heifer pairs. The number of families studied per herd varied from 13 to 110, for a total number of 832 families. The number of generations per family varied from 2 to 5.

The herd prevalence of seropositive animals varied from 4.3% to 61.8% with an overall prevalence of seropositive animals of 21.9% (447/2037) (Table 1, Figure 1). The vertical transmission rate varied from 0% to 85.7% with an overall rate of 44.4% (64/144) (Table 1, Figure 1). The correlation coefficient between vertical transmission rate and prevalence of seropositive animals was 0.74 ($P < 0.0001$). No association was identified between the number of dogs on farm and identification of horizontal transmission ($P = 0.63$).

Overall, 33 families were eligible for study of horizontal transmission by presence of 3 tested siblings. Seven horizontal transmissions were identified in 6 different herds (Figure 2). Two horizontal transmissions were observed within the same family.

Discussion

A high degree of variability in the rate of vertical transmission of *N. caninum*, from 0% to 85.7%, was noticed among the 23 herds studied. Compared with other studies (5-7), where 1 to 4 high prevalence herds (average, 42.4%) were examined, the overall estimated rate of vertical transmission in this study was significantly lower (average, 44.4%) than estimates reported previously (81% (93/115), $P < 0.0001$; 92% (46/50), $P < 0.0001$; 72% (76/105), $P < 0.0001$; and 93% (14/15), $P = 0.0003$) (5-7). In the present study, multiple herds with various proportions of seropositive animals were examined cross-sectionally. Results from this study may, therefore, be representative of what one might encounter when examining the genealogy of a herd tested for *N. caninum* in the field.

Disparities between rates of vertical transmission reported previously (5-7) and that estimated in this study may be explained by the variability in prevalence of seropositive animals. In fact, the high degree of correlation between rate of vertical transmission and prevalence of seropositive animals suggests that only in high prevalence herds are high levels of vertical transmission observed. Two explanations for this correlation are worth examining. First, high herd prevalence of seropositive animals may reflect a high proportion of active versus latent infections. One would expect higher rates of vertical transmission due to reactivation of infection in pregnant cows in these herds. Second, positive predictive value of the ELISA result must be considered in interpreting herd results. In low prevalence herds, the predictive value of a positive test is low, because of the high proportion of noninfected animals. Therefore, low prevalence herds may expect a higher proportion of false positive results, relative to high prevalence herds. When examining the

daughters of false positive dams, the vertical transmission rate would be decreased. It appears that estimated vertical transmission rates are more reliable in high prevalence herds than in low prevalence herds.

Study design of the various reports of vertical transmission may also account for the differences in estimated rates of vertical transmission. A study by Paré *et al* (5) and one by Wouda *et al* (6) were prospective, whereby all calves born were sampled prior to receiving colostrum. In the present study, only cows and heifers that were currently in the herd were sampled. A higher rate of culling of seropositive animals due to poor reproductive performance and low milk production has been reported (11,12). It can be hypothesized that selective culling of infected cattle would reduce the observed rate of vertical transmission when examining only contemporary animals. In fact, in the study by Wouda *et al* (6), the rate of vertical transmission was lower in the retrospective part compared to the prospective part of the study. The study by Schares *et al* (7) reported results from cows and heifers that were currently in the herd, which might have inflated the estimated rate of vertical transmission by colostral transfer of passive immunity. The rate of vertical transmission of *N. caninum* may also be lower in dairy herds in Québec because of differences in management and environmental factors in the other countries. Herd size, climate, and production level may alter the level of stress, thereby influencing recrudescence of latent infections and affecting rate of vertical transmission of *N. caninum*.

The presence of horizontal transmission through a definitive host was suspected in 6 of the 23 herds studied. In 2 families studied (herds 13 and 19), the presence of seropositive daughters born to the cow suspected of having been infected through horizontal transmission provided confirmation of her infected status. In one

family (herd 2), lack of transmission from a seropositive dam to her descendants suggested the possibility of a false positive result. In fact, herd 2 had a low prevalence of seropositive animals and, therefore, a low positive predictive value, which contribute to an increased likelihood of a false positive result. Use of strict criteria to define horizontal transmission, similar to those used by Schares *et al* (7), limited the number of families in which it was possible to identify horizontal transmission. Therefore, occurrence of horizontal transmission may be more frequent than that estimated. However, prevalence of seropositive animals should be taken into account when interpreting the presence of horizontal transmission. No association between farms with horizontal transmission and the presence of dogs was identified in this study. This could be the consequence of the small number of farms with horizontal transmission ; one other explanation could be that exposure to an unidentified risk factor is necessary to have horizontal transmission.

Because the present study was an observational study, efforts were made to reduce the influence of biases on the results presented. A convenience sample was used to allow inclusion of as many herds as possible. This resulted in 2 different ELISAs being used. However, among herds, high proportions of cows were studied (16 herds had more than 90% cows sampled), reducing the possibility of biasing the estimates of prevalence of seropositive animals. Multiple generations were used to estimate the rate of vertical transmission. Also, to minimize impact of a false positive or false negative result on estimates of rate of vertical transmission, a random selection of dam/heifer pairs was used in computations, when a cow had more than one daughter tested.

Results from this study confirm the importance of vertical transmission in the epidemiology of *N. caninum*, particularly when there is a high prevalence of seropositive animals in a herd. The variability observed among herds in the rates of vertical transmission warrants testing of offspring for *N. caninum*, ideally on precolostral samples. Although horizontal transmission was identified in a 6 herds, it does not appear to be the major route of infection for *N. caninum*. The study of risk factors in these herds may contribute to better understand the epidemiology of horizontal transmission of *N. caninum* in cattle.

Acknowledgments

We thank the veterinarians who responded to our request, namely Drs. Paul Baillargeon, Richard Bourassa, Lucien Chagnon, Fernand Dubé, Louise Julien, Linda Lallier, Roger Nault, James Porter, Bertrand Tremblay, and Walter Verhoef.

References

- 1-Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1991;198: 241-244.
- 2- Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol 1996;67:1-59.
- 3-Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol 1999;84: 349-367.
- 4- Dubey JP. Neosporosis in cattle : biology and economic impact. J Am Vet Med Assoc 1999;214:1160-1163.
- 5- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. Can J Vet Res 1996; 60:133-139.
- 6- Wouda W, Moen AR, Schukken YH. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. Theriogenology 1998; 49:1311-1316.
- 7- Schares G, Peters M, Wurm R, Bärwald A, Conraths FJ. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. Vet Parasitol 1998; 80:87-98.
- 8- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 1998; 28:1473-1478.
- 9- Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. J Am Vet Med Assoc 1998; 213:1595-1598.
- 10- Daniels WW. Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences. 5th ed. NewYork: John Wiley, 1991: 399-407, 551-556, 592-595.

11- Thurmond MC, Hietala SK. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. Am J Vet Res 1996; 57:1559-1562.

12- Thurmond MC, Hietala SK. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. J Am Vet Med Assoc 1997; 210:672-674.

Table 1. Herd size, % of cows tested, % prevalence, % vertical transmission rate, presence of horizontal transmission, and the number of dogs during the 3 y prior to test date for each herd studied.

Herd	Herd size	% cows tested	% prevalence^a	% VT	Presence of HT	No. of dogs^b
1	205	100	4.3	20.0	No	2
2	100	100	4.8	0.0	Yes	1
3	48	81	5.1	0.0	No	1
4	156	100	9.6	25.0	No	2
5	54	100	10.0	0.0	No	1
6	120	86	14.6	12.5	No	2
7	122	85	16.3	57.1	No	1
8	100	96	17.7	20.0	No	NA
9	61	100	17.9	50.0	No	2
10	63	100	19.4	20.0	No	0
11	117	71	20.5	60.0	No	3
12	167	100	22.4	35.7	Yes	1
13	90	91	25.6	60.0	Yes	1
14	78	100	28.3	33.3	No	2
15	64	92	30.5	28.6	No	1
16	36	100	35.6	0.0	No	1
17	93	99	40.2	53.3	No	1

18	78	65	41.2	71.4	Yes	2
19	51	100	41.2	85.7	Yes	2
20	69	100	42.5	53.8	Yes	1
21	53	92	44.9	80.0	No	2
22	50	64	46.9	66.7	No	1
23	105	52	61.8	83.3	No	2

HT- horizontal transmission ; NA- not applicable ; VT-vertical transmission

^a % prevalence of seropositive animals

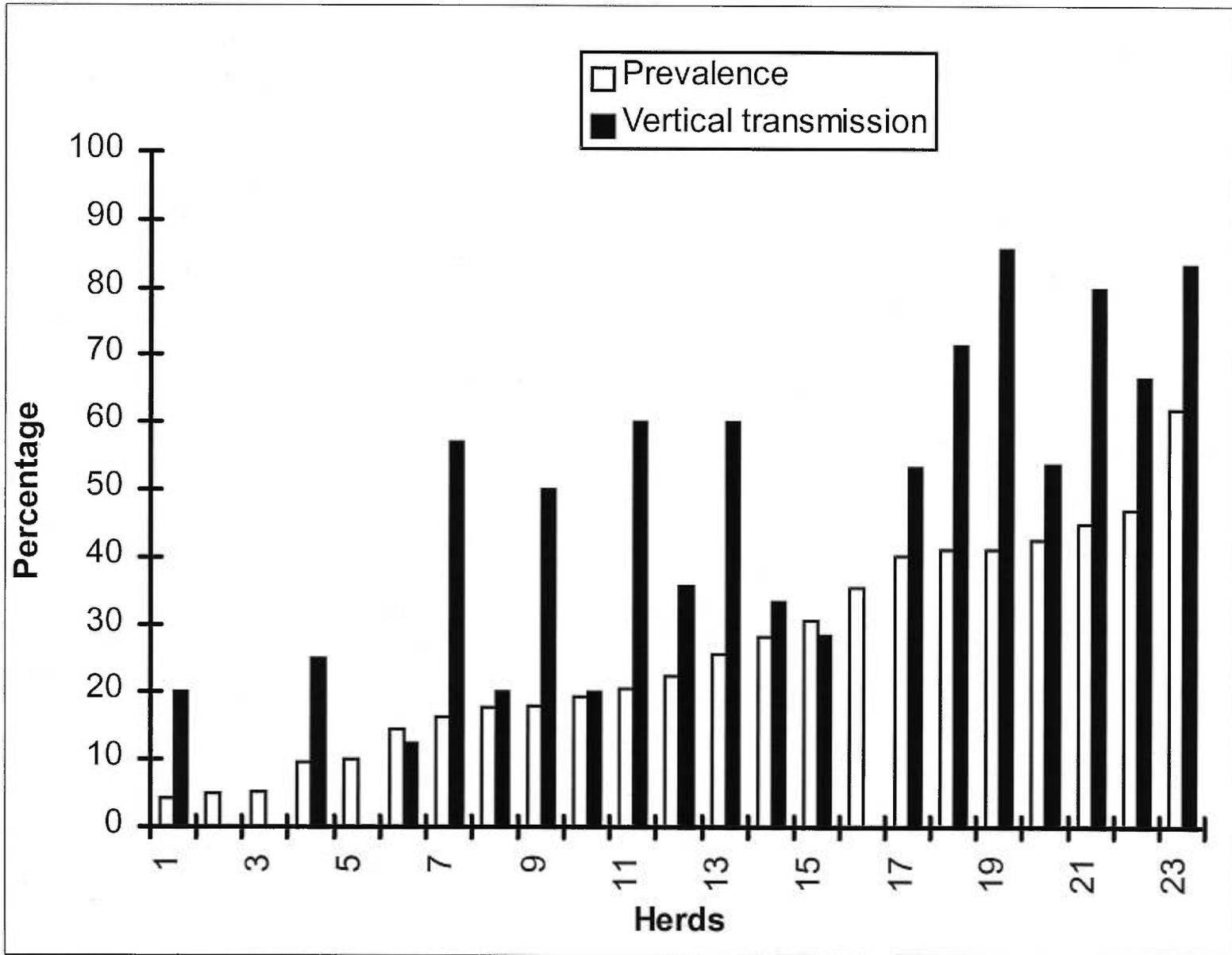
^b Number of dogs during the 3 y prior to the test date

Figure 1. Prevalence and vertical transmission for each herd studied.

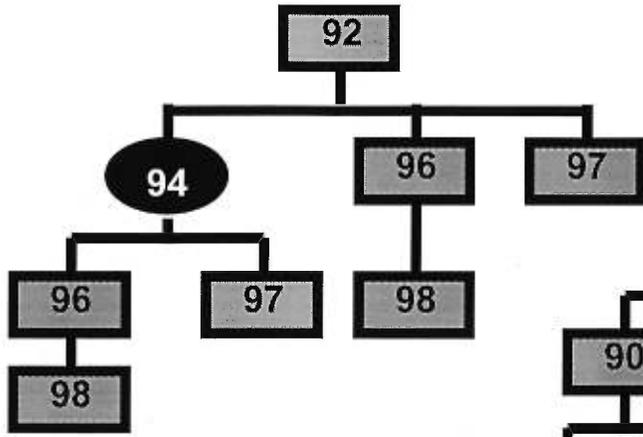
Figure 2. Genealogy of the 6 families in which horizontal transmission was identified.

 = not tested ;  = tested *Neospora caninum*- positive ;

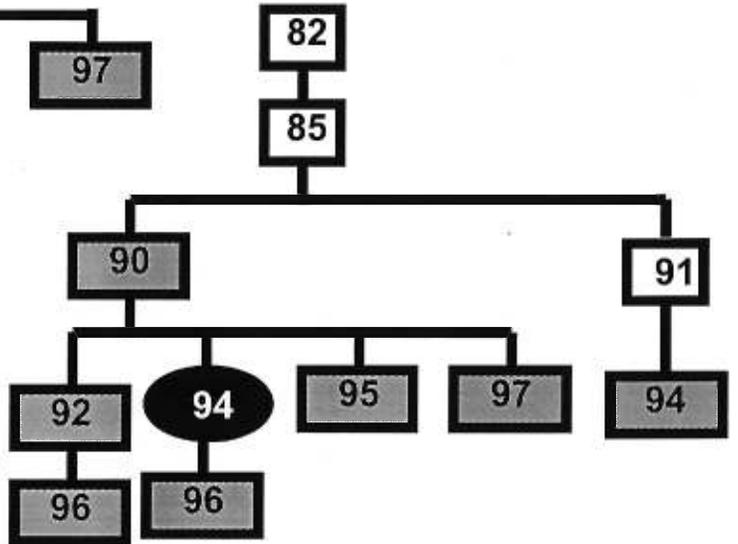
 = tested *Neospora caninum*- negative ; numbers indicate year of birth.



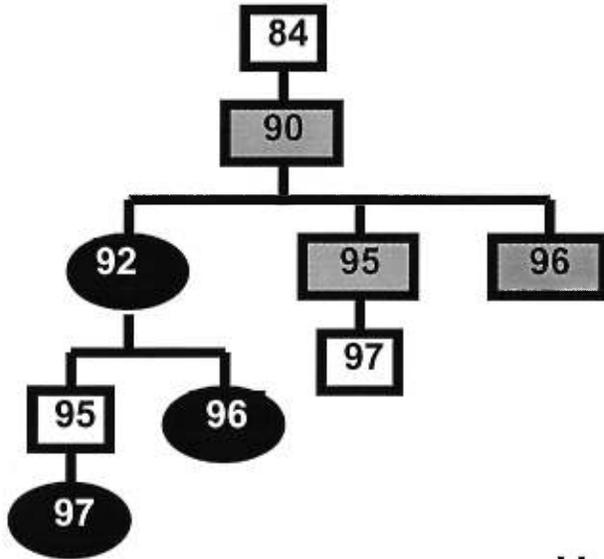
Herd 2



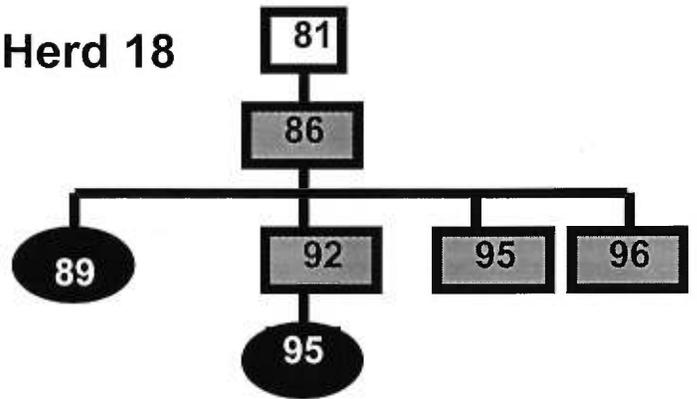
Herd 12



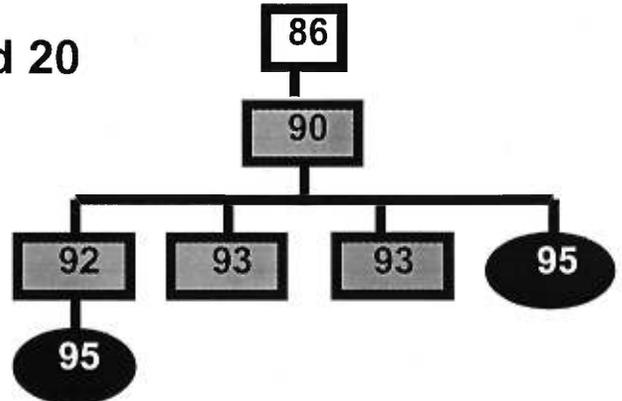
Herd 13



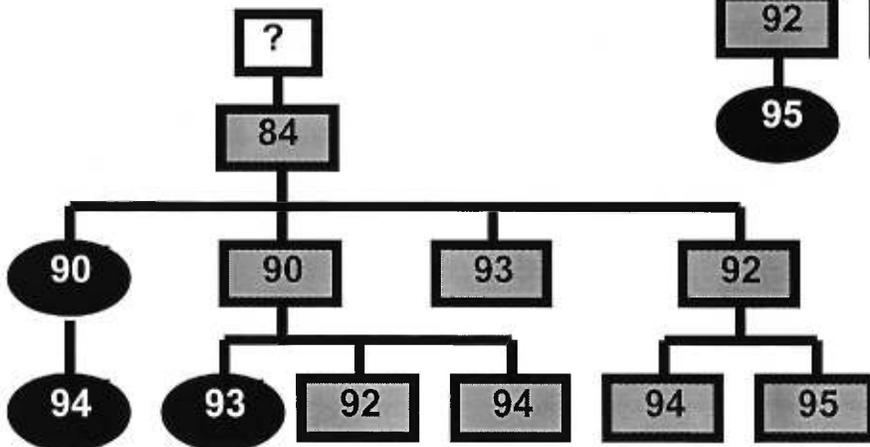
Herd 18



Herd 20



Herd 19



Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves

Nadia Bergeron¹, Christiane Girard², Julie Paré³, Gilles Fecteau¹, John Robinson⁴, Paul Baillargeon⁵

¹Département de sciences cliniques and ²Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000 St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada ; ³Biovet, 2900 rue Vanier, St-Hyacinthe, Québec J2S 6M2, Canada ; ⁴Animal Health Centre, 1767 Angus Campbell Road, Abbotsford, British Columbia V3G 2M3, Canada ; ⁵Clinique Vétérinaire de Saint-Louis, 84 rue Principale, Saint-Louis-de-Gonzague, Québec J0S 1T0, Canada.

Corresponding author: Dr. Gilles Fecteau

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada.

Tel: (450) 773-8521 #8337 Fax: (450) 778-8102

Cet article a été soumis au Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.

Abstract

Neospora caninum is thought to be transmitted to cattle by dogs, the only known definitive host. While aborted fetuses seem the most likely source of infective material for dogs, placentas from seropositive dams appear also as a potential source of infective material. The objective of the study was to evaluate the presence of *N. caninum* organisms in placentas of full-term calves born to seropositive cows. Sixteen placentas, eleven from *Neospora* seropositive cows, were examined histologically, and by immunohistochemistry and PCR for the presence of *N. caninum*. Mild placentitis was observed in all placentas. *N. caninum* was not identified by immunohistochemistry but placentas from two seropositive dams were found positive for *N. caninum* by PCR. These results suggest that placentas of full-term calves from seropositive cows may be a potential source of *N. caninum* for dogs, but the incidence of this mode of transmission is likely to be low.

Fetal infection by *Neospora caninum* can lead to abortion or birth of a congenitally infected calf with or without clinical manifestations.¹² Infection of the fetus likely occurs following a recrudescence of a latent infection or a new infection. The organism probably infects fetal tissues after first infecting the placenta.^{7, 13} However, placentitis always seems to be mild.^{1, 7}

The dog has recently been identified as a definitive host for *N. caninum*.¹⁰ Dogs likely become infected by ingestion of contaminated material, including aborted fetuses, dead calves or placentas. In two retrospective studies, placentas of aborted calves were examined. Ten of 19 in one study and 11 out of 19 in the other study had placentitis.^{1, 11} However, *N. caninum* like organisms were found histologically in only one placenta.¹ In another study, placenta of one aborted fetus was shown to harbor *N. caninum* zoites.¹³

Bradyzoites in tissue cysts are resistant to HCl-pepsin solution,⁸ and can pass through the stomach of carnivores. They could constitute the principal source of infection. Tachyzoites are known to be killed by pepsin and stomach acidity.^{8, 9} However, the lack of mastication of the placenta may protect tachyzoites within undigested tissue through the stomach.⁶ Also, a wound on the oral mucosa may allow tachyzoites to penetrate and infect the dog.⁸ The objective of this study was to verify the presence of tachyzoites and/or tissue cysts of *N. caninum* in placentas of full-term calves born from seropositive cows.

Materials and methods

Two veterinary clinics of bovine practitioners of Québec collaborated to the study by collecting placentas from full-term calves born to dams known to be positive or negative to *N. caninum* antibodies. Serological status of the dams was determined by ELISA as described elsewhere.⁴ Most placentas were sent fresh on ice.

Macroscopic examination was done and sections from 5 cotyledonary and 5 intercotyledonary areas were sampled, fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin and routinely processed for light microscopic examination. The sections were stained with hematoxylin-phloxin-saffron (HPS).

Immunohistochemistry was performed on two to four selected cotyledonary areas from each placenta. Each block processed contained two sections of placenta and two slides were examined per block. Twenty-seven blocks from the 16 placentas were examined by immunohistochemistry. The primary antibody to *N. caninum* was cell supernatant of a murine monoclonal (6G7)^a used at 1/20 and 1/40 dilutions. The secondary antibody was a 1/400 dilution of biotinylated horse anti-mouse IgG^b and the detection system was an avidin biotin complex immunoperoxidase system used according to the manufacturer directions (Vectastain ABC Elite).^b The stain was developed using diaminobenzadine as chromagen. The positive control was the heart of a dog containing *N. caninum* tachyzoites.

For PCR analysis, placental samples were prepared by placing tissue in a single use sterile bag containing Rnase/Dnase free sterile water to make a 10% solution. The bag was then placed in a Steward Stomacher^c and homogenized for 1.5 minutes at the highest speed setting. DNA isolation from bovine placental homogenate was done using the “Tissue Protocol” from a commercial extraction kit.^d Briefly, 10 mg of homogenized placenta was placed in extraction buffer and reacted with Proteinase K stock solution at 55° C for 3 hours while on a rocking platform until the tissue was lysed. Additional extraction buffer was then added and the sample incubated at 70° C for 10 minutes followed by the addition of ethanol. The sample was then applied to a spin column and centrifuged at 6000 x g for 1 minute. The DNA was eluted following removal of filtrate from the column and used in subsequent Polymerase Chain Reactions (PCR). DNA isolation from paraffin embedded tissue was done using a similar procedure recommended by the kit manufacturer.^d Fourteen placentas were submitted frozen and two in paraffin blocks. No attempt was made to remove paraffin from the sample prior to proceeding with normal extraction procedures.

Oligonucleotide PCR primers used were specific for *N. caninum* and did not react with *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis* spp. and *Hammondia hammondi*.¹⁴ Primers used identified as Np4B (sense) 5'- CCT-CCC-AAT-GCG-AAC-GAA-A -3', and Np21B (antisense) 5- GTG-CGT-CCA-ATC-CTG-TAA-C-3'. DNA amplification was done in 50 ul total volumes containing approximately 50 ng of DNA in a solution containing 10mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 U Taq DNA polymerase in Brij 35, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, and 20 pM of each *Neospora* primer. The mixture was overlaid with 50 ul of mineral oil. PCR

samples were initially denatured at 95° C for 5 minutes. Amplification reactions were performed for 50 cycles with denaturation 94° C, 1 minute, annealing 57° C, 1 minute, and extension 72° C, 1 minute. The final cycle was given a 7 minutes extension time at 72° C. Following PCR 14 ul of each sample were analyzed on gel electrophoresis using 1.0% agarose.

Results

Sixteen placentas from full-term calves were examined. Eleven placentas were obtained from cows were known to be seropositive to *N. caninum* up to 2,5 years prior to parturition. The other 5 placentas were from seronegative cows. Fourteen placentas were submitted fresh, and two were frozen. All calves but three were liveborn. Demographic information is presented in Table 1.

The macroscopic changes of the placentas were limited to mild to severe *post-mortem* changes, with contamination by feces and bedding material (straw and shavings).

On microscopic examination, placentas of seropositive and seronegative cows presented severe congestion of the villi in the cotyledonary area, with mild mineralization. Large mononuclear cells diffusely infiltrated the chorion of the placentas. The infiltration was light to moderate and often became more intense around blood vessels. The trophoblastic cells often showed changes interpreted as *post-mortem* alteration.

In the placenta from one seropositive cow, some lymphocytes were admixed with the large mononuclear cells (Placenta B). A severe focal placentitis was present in another placenta from a seropositive cow (Placenta K), with presence of intracytoplasmic bacterias in trophoblastic cells. Inflammatory cells that could not be identified because of freezing damage, infiltrated the superficial chorion (Placenta K).

Diffuse mild mononuclear cells infiltration was observed in the deep chorion (Placenta K).

N. caninum organisms were not identified in the placentas by immunohistochemistry.

Two placentas were considered positive on PCR analysis (Placentas A and D).

Discussion

Histologically, mononuclear cell infiltrates were present in all placentas and were diffusely distributed. This change was different from the foci of large mononuclear inflammatory cells associated or not with focal necrosis in the cotyledonary area, as reported in natural or experimental *Neospora* abortion.^{1, 3, 11} Mineralization was present in all placentas examined and therefore no association could be made between this change and *N. caninum* infection.

The changes observed in the placentas of seropositive cows were considered insignificant. These observations are in agreement with the mild lesions and limited tissue distribution of *N. caninum* observed in congenitally infected calves.² When tachyzoites are present in placentas of aborted fetuses, they are in small numbers comparatively to those observed in the brain of the aborted fetuses.^{1, 3, 11} The autolysis present in the placentas examined may also explain in part the negative results of immunohistochemistry.

N. caninum was not identified by immunohistochemistry, however, the small number of placentas studied and the relatively low sensitivity of immunohistochemistry⁵ precludes eliminating placentas of full-term calves from seropositive cows as a potential source of infectious material. Moreover, two placentas were found positive by PCR. Placentas may be a potential source of infection for dogs, but unlikely an important one.

Possible hypotheses explaining the absence or the presence of only small amounts of organisms in the placentas of *N. caninum* seropositive cows are : 1) the infection occurs in mid gestation and at time of parturition *N. caninum* are no longer present in the placentas, 2) *N. caninum* has a tropism for the nervous tissues and is not prevalent in the placentas and 3) no infection occurred during the pregnancy studied. In this study, all calves from seropositive dams tested post-colostral (n = 4) were seronegative for *N. caninum* antibodies.

Based on these results, it may be prudent to prevent ingestion of placentas from seropositive cows by dogs. However, this route of contamination is probably not important in the life cycle of *N. caninum*. As organisms are more frequently observed in aborted fetuses¹ than in placentas of full-term calves from seropositive dams, the former are certainly the main source for infection of dogs.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Diagnostic Immunology Laboratory of the Prairie Diagnostic Services for performing the immunochemistry, the Fonds du Centenaire for funding, the Clinique Vétérinaire St-Louis, and Dr Roger Martineau for their collaboration in collecting placentas.

Sources and Manufacturers

- a. A gift from Dr D. S. Lindsay, Auburn, AL
- b. Vector Laboratories, Burlingame, CA
- c. Brinkman Instruments, Westbury, New York
- d. Qiagen Canada Ltd, Mississauga, Ontario

References

- 1- Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, *et al*: 1990, Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet Pathol* 27: 354-361.
- 2- Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, *et al*: 1993, Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J Am Vet Med Assoc* 202: 110-117.
- 3- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, *et al*: 1994, Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J Vet Diagn Invest* 6: 207-215.
- 4-Bergeron N, Fecteau G, Paré J, *et al*: 2000, Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Can Vet J* 41 : 464-467.
- 5- Dubey JP : 1999, Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 84 : 349-367.
- 6- Dubey JP, Frenkel JK: 1976, Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool* 23: 537-546.

- 7- Helman RG, Stair EL, Lehenbauer TW, *et al*: 1998, Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. *J Vet Diagn Invest* 10: 292-295.
- 8- Lindsay DS, Dubey JP: 1990, Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (protozoa: apicomplexa). *J Parasitol* 76: 410-413.
- 9- Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL: 1991, Characterization of a *Neospora caninum* (protozoa: apicomplexa) isolate (NC-3) in mice. *J Alabama Acad Sci* 62: 1-7.
- 10- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, *et al*: 1998, Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28: 1473-1478.
- 11- Nietfield JC, Dubey JP, Anderson ML, *et al*: 1992, *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 4: 223-226.
- 12- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK: 1996, Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhooood mortality. *Can J Vet Res* 60:133-139.
- 13- Shivaprasad HL, Ely R, Dubey JP: 1989, A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet Parasitol* 34: 145-148.

14-Yamage M, Flechtner O, Gottstein B: 1996, *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). J Parasitol 82: 272-279.

Table 1. Demographic information concerning placentas examined.

Placentas	Herd of origin	Date of parturition	Lactation number*	ELISA[†] ratio of the dam	Date of the ELISA test	Delay prior to examination (days)	ELISA[§] ratio of calves (sex)
A	1	10-25-98	2	0,67	03-12-96	5	N/A (M)
B	2	11-02-98	3	1,64	11-10-98	1	N/A (M)
C	3	11-06-98	5	1,61	10-13-98	4	0,15 (F) [¶]
D	3	11-07-98	2	2,00	10-31-98	4	N/A(M)
E	4	11-10-98	5	2,29	01-21-98	4	N/A (M)
F	4	11-10-98	3	0,77	11-15-97	4	0,71 (F)
G	5	11-19-98	2	1,20	11-17-98	4	0,39 (F)
H	5	11-24-98	1	1,22	11-17-98	3	Stillborn (M)
I	5	12-03-98	3	1,50	12-03-98	5	0,43 (F)
J	6	12-19-98	3	0,72	12-08-97	N/A [‡]	N/A (M)

K	6	01-01-99	8	1,10	12-08-97	N/A [†]	N/A(M)
1	7	06-24-99	2	0,34	06-24-99	4	0,00 (F)
2	8	07-07-99	1	0,06	10-13-98	2	N/A (M)
3	9	07-31-99	1	0,19	10-14-98	6	0,00 (F)
4	9	08-06-99	1	0,04	10-14-98	4	Stillborn (F)
5	9	08-13-99	1	0,23	10-14-98	3	Stillborn (F)

* Lactation number of the cows when the placentas were collected

† ELISA considered positive if ratio $\geq 0,6$

‡ Frozen placentas

§ ELISA considered positive if ratio $\geq 0,8$. Serum was taken post-colostral.

|| Sold

Infections expérimentales de chiots avec des fœtus bovins infectés par *Neospora caninum*

Nadia Bergeron, Gilles Fecteau, Alain Villeneuve, Christiane Girard, Julie Paré

Département de sciences cliniques (Bergeron, Fecteau), Département de pathologie et microbiologie (Villeneuve, Girard), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec J1S 7C6 ; Biovet, 2900 rue Vanier, St-Hyacinthe, Québec J2S 6M2 (Paré).

Auteur correspondant et demande de tirés-à-part au Dr Gilles Fecteau.

Cette recherche a été réalisée grâce à une aide financière accordée par le Fonds du centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire.

Cet article sera soumis à la Revue Vétérinaire Canadienne.

Abstract

Neospora caninum is a protozoan that causes abortions in cattle. Recently, the dog has been identified as a definitive host for *N. caninum* by inoculation with experimentally infected mice. To determine the role of the dog in natural infection, 9 dogs 2 to 4 months of age were inoculated with bovine fetuses infected with *N. caninum*. The rectal temperature, pulse, respiratory rate, general appearance, hematology, serology and coprology were recorded during 6 weeks post-infection. None of the dogs excreted oocysts in their feces, or seroconverted, or had clinical signs, or lesions compatible with *N. caninum* infection. Other studies will be necessary to determine the natural mode of infection of dogs by *N. caninum*.

Résumé

Neospora caninum est un parasite qui cause des avortements chez les bovins laitiers. Jusqu'à récemment les seuls stades connus étaient les tachyzoïtes et les kystes contenant les bradyzoïtes. Le chien a été reconnu comme un hôte définitif lors d'une infection avec des souris infectées expérimentalement. Afin de vérifier le rôle du chien lors d'infection naturelle, 9 chiots âgés de 2 à 4 mois ont été inoculés avec des avortons bovins infectés par *N. caninum*. La température rectale, le pouls, la fréquence respiratoire, l'état d'éveil du chiot, la formule hématologique, l'analyse sérologique et coprologique des chiots ont été notés pendant 6 semaines post-infection. Aucun des chiots n'a excrété le parasite, séroconverti, démontré de signes cliniques ou développé des lésions à l'autopsie. D'autres études seront nécessaires pour vérifier le mode d'infection naturelle du chien par *N. caninum*.

Introduction

Neospora caninum est un protozoaire du phylum des *Apicomplexa* (1) et de la famille des *Sarcocystidae* (2). Ce parasite cause principalement des avortements chez les bovins laitiers (3-7).

Le cycle de *N. caninum* n'est pas connu, mais il pourrait ressembler à celui de *Toxoplasma gondii* à cause des similarités taxonomiques (2) et morphologiques (1) des 2 parasites. Jusqu'à tout récemment, les seuls stades connus étaient les tachyzoïtes et les kystes, contenant des bradyzoïtes, qui font partie du cycle de reproduction de *N. caninum*.

Pour *N. caninum*, on croit que l'hôte définitif excréterait des oocystes dans ses fèces et contaminerait les aliments des hôtes intermédiaires. Le parasite aurait un stade sexué dans l'hôte définitif suivi par un stade asexué dans l'hôte intermédiaire. McAllister *et al* ont démontré la présence d'oocystes de *N. caninum* dans les fèces de chiots ayant ingéré des kystes de *N. caninum* produits expérimentalement dans des souris (8). La quantité d'oocystes excrétés était toutefois faible. Le maximum d'oocystes excrétés par un chien a été de 5 oocystes par lame, ce chien avait ingéré 150 kystes. Trois chiots sur 4 ont séroconverti. Une expérience similaire a été reprise par Lindsay *et al* : 2 chiots ont été inoculés avec des souris infectées expérimentalement (9). Un chiot, immunosuppressé à l'aide de corticostéroïdes, a excrété plus d'oocystes (nombre total d'oocystes excrétés = $4,5 \times 10^6$ oocystes) que l'autre chiot et a séroconverti. Le chiot n'ayant pas reçu de corticostéroïdes n'a pas séroconverti, mais a quand même excrété des oocystes en petite quantité.

Des études séroépidémiologiques supportent le rôle du chien dans le cycle de *N. caninum* (10-12). Paré *et al* ont trouvé que les chiens étaient présents plus souvent

et en plus grand nombre, durant les 3 années précédentes au test sérologique, dans les fermes ayant des avortements à *N. caninum* que dans les fermes n'ayant pas de problème d'avortement (10). Sawada *et al* rapportent une prévalence sérologique plus élevée (31%) des infections à *N. caninum* chez les chiens vivant sur une ferme ayant des avortements à *N. caninum* ou des vaches séropositives à *N. caninum* comparativement à des chiens vivant en milieu urbain (7%) (11). Wouda *et al* ont évalué que 23,6% des chiens vivant sur une ferme étaient séropositifs pour *N. caninum* comparativement à 5,5% de séropositivité pour des chiens provenant d'un milieu urbain (12). Ils ont remarqué que dans les fermes où il n'y avait pas de chien, la séroprévalence à *N. caninum* des vaches était significativement plus faible que celles des fermes où les chiens étaient présents (12).

Dans les fermes laitières, la source probable de *N. caninum* pour l'hôte final serait les avortons bovins ou les veaux morts. L'objectif de cette étude est de vérifier si des chiots infectés expérimentalement par des fœtus bovins contenant des stades asexués de *N. caninum* excrètent des oocystes et séroconvertissent contre cet agent.

Matériel et méthode

Animaux

Les animaux étudiés étaient des chiots âgés de 2 à 4 mois dont 9 mâles et 3 femelles (n=12). Dix étaient de race croisée et 2 de race Pitbull. Les chiots provenaient d'un éleveur de la région de St-Hyacinthe. Pour être inclus dans l'étude, les chiots devaient être apparemment en santé et ne pas avoir d'anticorps circulant contre *N. caninum*.

Hébergement et alimentation

Les chiots étaient gardés dans des cages métalliques individuelles, dans un même local à l'animalerie de la Faculté de médecine vétérinaire. Ils étaient nourris quotidiennement avec 400g de moulée pour chiot en croissance (Purina CNM (Clinical Nutrition Management) Ralston Purina Canada Inc., 2500 Royal Windsor Drive, Mississauga, Ontario L5J 1K8). Ils avaient de l'eau fraîche à volonté.

Acclimatation

À leur arrivée, un examen clinique complet était effectué comprenant : une mesure de la température rectale, l'évaluation du pouls et de la fréquence respiratoire, l'état des muqueuses (couleur, temps de remplissage capillaire (TRC)) et l'état général du chiot. Les animaux étaient pesés et identifiés. Un échantillon sanguin était prélevé pour la détection d'anticorps contre *N. caninum* ainsi qu'un prélèvement de matières fécales pour examen coprologique. Les chiots n'étaient ni vaccinés ni vermifugés. La période d'acclimatation était d'une durée minimale d'une semaine.

Allocation

Les 12 chiots étaient répartis en 3 groupes, correspondant aux 3 expériences (expériences 1, 2 et 3). Pour chaque expérience, un groupe d'animaux infectés (n=3)

et un chien témoin (n=1) étaient formés préalablement. L'attribution comme témoin était déterminée par tirage au sort.

Matériel infectieux

Plusieurs cliniques vétérinaires œuvrant dans les grands animaux au Québec étaient sollicitées afin d'obtenir des avortons bovins. Les avortons soumis devaient provenir d'une mère possédant des anticorps contre *N. caninum* ou de troupeaux ayant eu des cas d'avortements à *N. caninum*. Dans le cas où le statut sérologique de la mère n'était pas connu, un échantillon sanguin de la mère accompagnait l'avorton et l'analyse était effectuée à l'aide d'un test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (13). Si l'avorton était trop gros pour être transporté aisément, seuls la tête et le cœur étaient acheminés. Les avortons étaient transportés dans une glacière et acheminés le plus rapidement possible au laboratoire.

Analyse du cerveau des fœtus

Le cerveau des fœtus était examiné afin de vérifier la présence de *N. caninum*. L'examen histologique était réalisé sur tous les cerveaux des fœtus reçus (Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6). Trois à 4 sections de 0,5 à 1,5 cm² de cerveau étaient fixées dans du formol 10% tamponné. Ensuite, les pièces étaient incluses dans de la paraffine de façon standard, coupées en tranches de 6 microns d'épaisseur et colorées au HPS (Hématoxyline-phloxine-saffran) pour être examinées au microscope. Le reste du fœtus était conservé au réfrigérateur dans un contenant en plastique.

Une technique d'immunoperoxydase (IP) était réalisée à deux laboratoires différents (Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe, Québec J2S 7C6 et Diagnostic Immunology

Laboratory of Prairie Diagnostic Services, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, 52 Campus Dr, Saskatoon, Saskatchewan S7N 5B4). Au premier laboratoire (Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire) (expérience 1), 1 à 2 blocs de cerveau étaient examinés. Chaque bloc contenait une section de cerveau et une coupe était examinée par bloc. L'anticorps primaire contre *N. caninum* était préparé à partir d'un antiserum de chèvre à une dilution de 1/8000 (Veterinary Medical Research and Development Inc. (VMRD), P.O. Box 502, NW 115 State Street, Pullman, WA 99163). L'anticorps secondaire était une dilution à 1/200 d'un conjugué anti-chèvre combiné à la biotine (Vector Laboratories Inc., 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010). Le système d'immunoperoxydase était utilisé selon les directives du manufacturier (Vectastain Elite ABC-Peroxydase Kits) (Vector Laboratories Inc.). L'AEC (3-Amino-9-éthyl carbazole) était utilisé comme chromogène. Le contrôle positif était le poumon d'un chien infecté naturellement par *N. caninum*.

Au deuxième laboratoire (Diagnosis Immunology Laboratory of Prairie Diagnostic Services) (expériences 2 et 3), 1 à 2 blocs par cerveau étaient examinés. Chaque bloc contenait une section de cerveau et 2 coupes étaient examinées par bloc. L'anticorps primaire contre *N. caninum* était un anticorps monoclonal (6G7) (offert gracieusement par le Dr D.S. Lindsay, Auburn, AL) provenant du surnageant de cellules de souris utilisé à une dilution de 1/20 et 1/40. L'anticorps secondaire était une dilution de 1/400 de sérum de cheval contenant des anticorps anti-IgG (Vector Laboratories Inc.) de souris et le système d'immunoperoxydase était utilisé selon les directives du manufacturier (Vectastain Elite ABC-Peroxydase Kits) (Vector

Laboratories Inc.). Le diaminobenzadine était utilisé comme chromogène. Le contrôle positif était le cœur d'un chien ayant des tachyzoïtes de *N. caninum*.

Observations des chiots et recueil de données

Au jour 0, les chiots étaient nourris avec des fœtus entiers, des cerveaux et des cœurs ou seulement avec des cerveaux de fœtus. Les chiots témoins étaient nourris normalement. Des prélèvements et des observations étaient réalisés à période fixe pour une durée de 6 semaines.

Examen physique

L'examen physique comprenait un TPR (température rectale, pouls et fréquence respiratoire) et une évaluation subjective de l'état d'éveil du chiot. Cet examen était réalisé à tous les jours pour les 3 premières semaines et aux 2 jours pour les 3 dernières semaines. Les chiots étaient pesés 1 fois par semaine pour les 6 semaines de l'étude.

Analyses de laboratoire

Sérologie

Un échantillon sanguin était prélevé 1 fois par semaine pour les 6 semaines de l'étude afin de mesurer une réponse sérologique contre *N. caninum*. Un test ELISA était utilisé pour mesurer les anticorps anti-*N. caninum* (Biovet, 2900 rue Vanier, St-Hyacinthe, Québec J2S 6M2). Seuls les sérums des semaines 3 et 6 étaient d'abord analysés pour des raisons d'économie. Un résultat était considéré positif si le ratio était $\geq 0,30$. Tous les sérums étaient conservés au congélateur à -70° C.

Hématologie

Un échantillon sanguin avec EDTA était prélevé 2 fois par semaine pour les 6 semaines de la durée de l'étude. Les paramètres suivants étaient évalués : comptage de globules blanc totaux et différentiel cellulaire (neutrophiles, lymphocytes, monocytes, eosinophiles, basophiles), comptage des globules rouges et des plaquettes, concentration des protéines totales, hémocrite et concentration en hémoglobine. Le sang était acheminé au laboratoire (Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire) pour analyse le jour même.

Coprologie

L'analyse coprologique était effectuée au laboratoire de Parasitologie (Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire) par la méthode de Wisconsin (14) aux 2 jours pour les 2 premières semaines, à tous les jours pour la troisième semaine et aux 2 jours pour les 3 dernières semaines. Les fèces de chaque chiot étaient recueillies pendant la journée et mélangées avant d'en prélever 2g pour l'analyse. Elles étaient conservées à 4° C jusqu'au moment de l'analyse. L'horaire d'analyse s'appuie sur les résultats de l'étude de McAllister *et al* (8). Deux des chiots de cette étude ont commencé à excréter des oocystes 13 jours post-infection et pour une durée de 10 à 13 jours (8).

Autopsie

A la fin de l'étude, les chiots étaient euthanasiés par injection d'une solution euthanasique à raison de 340 mg/ml (Euthansol©, Schering-Plough Animal Health, Division of Schering Canada Inc., 3535 Trans-Canada, Pointe-Claire, Québec H9R 1B4) à raison de 0,3 ml par kg de poids corporel. Une nécropsie était effectuée sur

chacun des chiots. Des pièces des organes suivants étaient prélevées : hémicerveau droit, y compris le cervelet et le tronc cérébral, diaphragme, biceps, quadiceps, psoas, thymus, ventricules droit et gauche du cœur, poumon, foie, rate, rein, pancréas, duodénum, jéjunum antérieur, moyen et postérieur, iléon, colon et nœuds lymphatiques mésentérique et iliaque. Ces prélèvements étaient fixés dans du formol 10% tamponné, inclus dans de la paraffine de façon standard, coupés à 6 microns d'épaisseur et colorés avec du HPS. L'examen histologique (Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire) était effectué sur tous ces tissus.

Particularités de chacune des expériences

Expérience 1

Analyse du cerveau des fœtus

Les fœtus reçus provenaient de mères sérologiquement positives aux anticorps de *N. caninum*. Ceux-ci étaient examinés à l'histopathologie et à l'IP. Tous les fœtus reçus ont été donnés aux chiots. Les fœtus étaient conservés au congélateur à -70° C jusqu'à l'inoculation.

Infection des chiots

Les 3 chiots sujets ont été nourris en même temps avec un total de 5 cerveaux provenant d'avortons bovins infectés de *N. caninum* et le placenta d'un des avortons. Le matériel infectieux était mélangé dans un sac et ensuite divisé en 3 parties pour être donner aux chiots. Les cerveaux des fœtus et le placenta étaient décongelés à l'eau froide puis à l'eau tiède pour une période de 45 minutes.

Expérience 2

Analyse du cerveau des fœtus

Des examens histologiques et d'IP étaient réalisés sur tous les cerveaux des fœtus reçus. Les avortons étaient gardés au réfrigérateur de 2 à 4 semaines avant d'être donnés aux chiots, soit le délai nécessaire pour obtenir les résultats d'IP. Une fois les résultats obtenus, les avortons en entier ou les cerveaux et cœurs étaient donnés aux chiots.

Infection des chiots

L'infection des chiots de la deuxième expérience était faite de façon séquentielle. Chaque chiot devait recevoir 2 avortons répondant aux 2 critères suivants : 1) provenir d'une mère positive aux anticorps de *N. caninum* et 2) avoir des lésions compatibles avec une infection à *N. caninum* et/ou un résultat d'IP positif. Les fœtus étaient donnés en entier aux chiots pour que ceux-ci puissent les ingérer le plus naturellement possible. Cependant, les cerveaux étaient placés dans leur bol à nourriture.

Expérience 3

Analyse du cerveau des fœtus

Les fœtus étaient donnés aux chiots la journée même de leur réception ; c'est-à-dire avant que les résultats des tests ne soient disponibles. Un examen histologique était fait sur tous les cerveaux des fœtus reçus. Un test d'IP était réalisé sur tous les cerveaux des fœtus provenant d'une mère séropositive à *N. caninum*.

Infection des chiots

La troisième expérience était également réalisée en séquence. Un des 2 critères suivants devait être atteint pour qu'un chiot soit considéré comme ayant reçu

suffisamment de matériel infectieux : 1) ingestion de 4 fœtus provenant de mères séropositives et dont les cerveaux avaient des lésions compatibles avec une infection à *N. caninum* à l'examen histopathologique et/ou un résultat positif à *N. caninum* à l'IP, 2) ingestion d'un cerveau de fœtus contenant des kystes démontrés à l'IP. Quand un chiot avait rencontré un de ces 2 critères, les 6 semaines d'observation débutaient. Les fœtus étaient disséqués en bouchées d'environ 3 cm². Toutefois, une période d'infection maximale de 3 semaines était allouée à chacun des chiots. Après 3 semaines, la période d'infection se terminait peu importe le nombre de fœtus reçus par les chiots.

Immunosuppression

Le sujet 9 avait reçu de la prednisone (Apo®-Prednisone, Apotex Inc., 150, prom. Signet, Weston, Ontario M9L 1T9) à raison de 4 mg par kg de poids corporel *per os* une fois par jour pour la durée de l'infection. L'administration de prednisone avait débuté 1 journée avant l'ingestion du premier fœtus et s'était terminée 4 jours post-ingestion du dernier fœtus.

Observations

Quand les chiots recevaient leur premier fœtus (infecté ou non), les observations et la prise de données débutaient selon l'horaire établi. Cependant, la période de 6 semaines d'observation post-infection commençait lors de l'ingestion du dernier fœtus considéré infectieux.

Analyses de laboratoire

L'examen physique décrit plus tôt était fait 6 jours par semaine pendant l'expérience 3 pour tous les chiots. Seule la température rectale était prise la septième journée par le ou la technicien (ne) qui s'occupait de nourrir les chiots.

Pour cette expérience, l'analyse coprologique était effectuée aux 2 jours pour toute la durée de l'expérience, autant pendant la période d'inoculation qu'en post-inoculation.

Résultats

Les données démographiques des chiots des 3 expériences ainsi que les résultats des examens à leur arrivée sont présentés dans le tableau 1. Les lésions des fœtus utilisés dans les 3 expériences sont présentées dans le tableau 2.

Résultats de l'expérience 1

Fœtus

L'âge des fœtus se situait entre 4 et 9 mois de gestation. Au total, 5 fœtus provenant de mères séropositives à *N. caninum* ont été reçus pour l'expérience 1.

Examen physique

L'examen physique des chiots de la première expérience n'a révélé aucune anomalie significative. Le sujet 2 a développé de l'hyperthermie (39,3 à 40,7° C) associée aux manipulations, tout au long des 6 semaines d'observation. Le gain de poids moyen quotidien des chiots était de 190g, 167g, 200g et 148g pour les chiots témoin A et sujets 1, 2 et 3 respectivement.

Tests de laboratoire

Aucun des chiots de l'expérience 1 n'a développé d'anticorps contre *N. caninum* à 3 et à 6 semaines post-inoculation. Il n'y a pas eu de changements hématologiques significatifs chez les chiots de l'expérience 1.

Aucun oocyste de *N. caninum* n'a été détecté. Les chiots avaient toutefois des oocystes d'*Isospora* et de *Cryptosporidium*, des œufs de *Toxocara* et de *Toxascaris* et des kystes de *Giardia*.

Autopsie

Les changements macroscopiques observés se sont limités à la présence d'*Ascarides* dans l'intestin grêle chez les chiots témoin A, sujets 1 et 2. Chez le

témoin A et le sujet 1 les fèces étaient un peu molles dans le côlon. Les changements microscopiques se limitaient à la présence de parasites dans l'intestin ; le témoin A et le sujet 1 avaient des *Giardia* dans le jéjunum, alors que le sujet 3 avait des *Giardia* dans le duodénum et le jéjunum. Des sections de nématodes étaient présentes dans le jéjunum du témoin A alors que chez le sujet 2, on retrouvait les nématodes dans tout le petit intestin et le colon.

Résultats de l'expérience 2

Fœtus

Dix fœtus dont 6 provenant de mères séropositives ont été utilisés. L'âge des fœtus variait de 4 à 8 mois de gestation.

Examen physique

Le témoin B et les sujets 4, 5 et 6 ont développé de l'hyperthermie (39,3 à 40,2° C) de façon aléatoire au cours de l'expérience. Ces hyperthermies sont associées à des journées où la température ambiante était plus élevée ou à des chiots plus excités avant toute manipulation.

Le gain de poids moyen quotidien des chiots était de 146g, 162g, 133g et 138g pour les chiots témoin B et sujets 4, 5 et 6 respectivement.

Tests de laboratoire

Aucun des chiots de l'expérience 2 n'a développé d'anticorps contre *N. caninum* à 3 et à 6 semaines post-inoculation.

Il n'y a pas eu de changements hématologiques significatifs chez les chiots de l'expérience 2, sauf pour le sujet 6. Onze jours post-inoculation, jour d'une chute dans la cage, une anémie marquée a été notée (globules rouges $3,26 \times 10^{12}/L$; hémocrite 23 L/L ; hémoglobine 74 g/L).

Aucun oocyste de *N. caninum* n'a été détecté. Les chiots avaient toutefois des oocystes d'*Isospora*, des œufs de *Toxocara* et de *Toxascaris* et des kystes de *Giardia*.

Autopsie

Les changements macroscopiques étaient limités à la présence d'environ 10 *Ascarides* dans le petit intestin pour le sujet 5 et de quelques pétéchies pulmonaires pour le sujet 6.

Il y avait des changements microscopiques légers chez le sujet 6. Il s'agissait de microgranulomes dans le foie. Ces changements pouvaient être dus à une migration d'*Ascarides* à travers le parenchyme hépatique. En effet, ce chiot était infecté de *Toxocara* pendant les 33 jours de l'expérience.

Résultats de l'expérience 3

Fœtus

Vingt-trois fœtus dont 9 provenant de mères séropositives ont été utilisés. L'âge des fœtus variait de 3 à 8 mois de gestation. Le sujet 7 a ingéré 9 fœtus en 17 jours, dont 3 provenaient de mères séropositives. Le sujet 8 a ingéré 6 fœtus en 22 jours, dont 3 provenaient de mères séropositives. Le sujet 9 a ingéré 8 fœtus en 21 jours, dont 3 provenaient de mères séropositives.

Examen physique

Au cours de l'expérience, le témoin C a développé des signes digestifs compatibles avec une gastro-entérite infectieuse (parvovirose). Ces signes ont duré 4 jours.

Le sujet 7 a développé quelques périodes d'hyperthermie (39,3 à 39,6° C) associées à de l'excitation ou à une température ambiante élevée. Ces hyperthermies

ne devraient pas être associées à la période de gastro-entérite puisque le sujet 7 était déjà euthanasié au moment de l'épisode de parvovirose.

Les sujets 8 et 9 ont eu une journée d'hyperthermie (39,6°C et 39,7° C respectivement) 10 jours avant une autre période d'hyperthermie (39,3 à 40,1° C) qui peut être associée à de l'excitation, à une température ambiante élevée ou à la période de gastro-entérite infectieuse. Le sujet 8 a développé des signes de gastro-entérite compatibles avec une parvovirose et qui a été fatale pour lui 2 semaines avant la fin de l'étude. Le sujet 9 n'a pas développé de signes de gastro-entérite, mais il a eu une diminution de l'appétit durant une semaine.

Le gain de poids moyen quotidien des chiots était de 90g, 118g, 94g et 95g pour les chiots témoin C et sujets 7, 8 et 9 respectivement.

Tests de laboratoire

Aucun des chiots de l'expérience 3 n'a développé d'anticorps contre *N. caninum* à 3 et à 6 semaines post-inoculation.

Le témoin C n'a pas eu de changements hématologiques significatifs pendant la période où il a démontré des signes digestifs. Toutefois, pendant l'expérience une éosinophilie, probablement associée aux parasites intestinaux, était présente chez le témoin C.

Le sujet 7 a développé des leucocytoses (GB : 13,9 à 24,0 X10⁹/L) variées tout au long des 6 semaines d'observation. Ces changements peuvent être associés à un stress, à de l'excitation ou à la présence de parasites (eosinophilies). Ces changements ne semblent pas être associés à un foyer inflammatoire chronique parce qu'à l'autopsie il n'y avait aucune lésion associée.

Le sujet 8 n'a pas eu de changements hématologiques significatifs pendant l'expérience.

Le sujet 9 a eu une neutrophilie ($17,40 \times 10^9/L$) et une monocytose ($1,60 \times 10^9/L$) une semaine avant le début de l'épisode de gastro-entérite du témoin C. Ces changements pourraient être associés à un stress ou à de l'excitation. Ces changements ne semblent pas être associés à un foyer inflammatoire chronique parce qu'à l'autopsie il n'y avait aucune lésion associée. Il a eu une lymphopénie ($0,80 \times 10^9/L$) et une neutropénie ($0,80 \times 10^9/L$) importante qui peuvent être associées à une parvovirose sous-clinique pendant la période de gastro-entérite.

Aucun oocyste de *N. caninum* n'a été détecté. Les chiots avaient toutefois des oocystes d'*Isospora*, des œufs de *Toxocara* et de *Trichuris* et des kystes de *Giardia*.

Autopsie

Les changements macroscopiques et microscopiques sont résumés dans le tableau 3. Les changements microscopiques associés à des foyers granulomateux dans le foie peuvent être du à la migration d'*Ascarides*. En effet, le témoin C et les sujets 8 et 9 ont eu des *Toxocara* presque tout au long de l'expérience. Les lésions microscopiques du sujet 8 confirmaient le diagnostic d'entérite à parvovirus aiguë.

Discussion

Il n'a pas été possible d'infecter des chiots avec des fœtus bovins infectés par *N. caninum*. Les hypothèses suivantes peuvent expliquer ces résultats : 1) la conservation des fœtus entraîne une diminution du potentiel infectieux, 2) la charge parasitaire était trop faible ou devenue trop faible suite aux délais avant l'ingestion dans les fœtus utilisés, 3) le chien n'est pas l'hôte définitif de *N. caninum*, mais un hôte accidentel possible et 4) il existe un hôte intermédiaire qui ingère les avortons et qui contamine éventuellement les chiens.

Les fœtus étaient transportés frais dans une glacière. La température pouvait varier pendant le transport. La viabilité du parasite est possiblement influencée par la température (15). Le temps qui s'écoulait entre l'avortement et l'arrivée du matériel infectieux à la Faculté de médecine vétérinaire variait de 1 à 5 jours pour les fœtus considérés comme du matériel infectieux. De plus, ils ont été gardés congelés ou réfrigérés pour les 2 premières expériences. Ce délai à différentes températures pourrait influencer le potentiel infectieux des fœtus.

Dans l'expérience 1, il est possible que la congélation des fœtus ait diminué le potentiel infectieux. En effet, la congélation des cerveaux des fœtus à -70°C pourrait avoir inactivé les tachyzoïtes et les kystes. Une étude a démontré que les bradyzoïtes dans les kystes sont tués par la congélation à -20°C pour 7 jours dans des cerveaux homogénéisés (15). Cependant, une autre étude indique que des kystes provenant d'un cerveau de veau ont survécu à -52°C pendant un mois (16). Toutefois, il n'y a aucune étude qui a étudié la congélation à -70°C de cerveaux de fœtus bovins. On peut penser qu'une congélation à -70°C n'inactivera pas les parasites puisque à

-52°C les parasites ont survécu pendant 1 mois. Cette théorie pourrait se baser sur le fait que la congélation à basse température a moins d'effet sur la survie des parasites.

Selon Lindsay *et al* (15), les bradyzoïtes dans les kystes ont survécu au moins 14 jours à 4° C dans un cerveau homogénéisé et ils ont également survécu dans le cerveau intact de la carcasse de souris à 4° C pour 7 jours (15). Les fœtus de l'expérience 2 sont demeurés de 14 jours à 28 jours à 4° C avant d'être ingérés par les chiots. Ce temps d'attente nous permettait d'avoir les résultats d'IP. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour vérifier la viabilité à 4° C du parasite dans une carcasse.

Pour l'expérience 3, les fœtus ont été ingérés dès la réception pour diminuer le temps entre l'avortement et l'ingestion du matériel infectieux par les chiots. Le parasite survit peut-être à la température ambiante, mais il devient peut-être moins virulent.

La quantité de parasites (tachyzoïtes et kystes) présente dans les fœtus infectés ne peut pas être évaluée précisément. Toutefois, la quantité de parasite semble être faible dans les fœtus utilisés puisque seulement quelques kystes ont pu être isolés chez 25% des fœtus (5/20) provenant d'une mère sérologiquement positive à *N. caninum*. Le succès de l'isolement dépend du nombre d'organismes présents et du stade d'autolyse du fœtus (17). De plus, la majorité des fœtus utilisés pour l'expérience présentaient de l'autolyse à des degrés variables. On rapporte qu'un diagnostic provisoire peut être fait à l'examen histologique du cerveau (7, 18). Cependant, l'examen du cerveau à l'IP est nécessaire pour un diagnostic définitif car seulement quelques organismes viables de *N. caninum* peuvent être observés dans les tissus autolysés (17, 19-20). On rapporte qu'il est très difficile de cultiver des parasites

provenant des cerveaux de fœtus et on suggère aussi que les parasites présents dans les fœtus avortés sont peu nombreux et souvent morts (17, 21). A la suite de culture cellulaire, Conrad *et al* ont réussi à isoler *N. caninum* de seulement 2 fœtus de plus d'une centaine suspectée d'avoir avorté à cause de *N. caninum* (21). Ceci illustre la difficulté d'isoler *N. caninum* des avortons bovins. Il est difficile de localiser des tachyzoïtes bien préservés et les organismes présents sont dispersés même chez des fœtus qui ont été bien préservés (20). Ce qui est différent de l'expérience de McAllister *et al* qui connaissaient le nombre de kystes donnés à chaque chiot (8). Ce nombre variait de 125 à 300 kystes. La concentration d'oocystes dans les fèces était faible et semble être à peu près en proportion avec le nombre de kystes ingérés par les chiens (8).

Une étude rapporte un cas d'un veau de 3 jours d'âge où plus de kystes étaient présents dans la moelle épinière que dans le cerveau (22). Il semble que chez tous les fœtus infectés congénitalement, *N. caninum* soit confiné au cerveau et à la moelle épinière (17). Il n'y a pas d'étude comparant la proportion de *N. caninum* dans le cerveau et la moelle épinière. La seule étude réalisée sur la distribution des lésions n'étudiait pas la moelle épinière (23). Les chiots de l'étude ont reçu tous les cerveaux des fœtus. Pour ce qui est de la moelle épinière, les chiots ne recevaient que le tiers crânial ou moins selon la disponibilité et la facilité d'obtenir la moelle épinière, ce qui pourrait avoir diminué la charge parasitaire.

Les études réalisées par McAllister *et al* et Lindsay *et al* (8, 9) ont utilisé des souris qui contenaient des kystes pour infecter les chiots avec succès. Chez certains des fœtus utilisés, on observait seulement des tachyzoïtes et non des kystes. Si

l'inoculum contient seulement des tachyzoïtes, il est possible qu'aucun organisme ne survive à la digestion gastrique (24).

Le petit nombre de kystes pourrait ne pas permettre une infection détectable ; c'est-à-dire les oocystes dans les fèces étant trop peu nombreux, ils n'ont pas pu être décelé. McAllister rapporte que le nombre d'oocystes observés dans les fèces peut être affecté par le nombre de kystes qui ont été ingérés et le type et la quantité de nourriture donnée aux sujets testés (24). Selon les études de McAllister *et al* (8) et Lindsay *et al* (9), les chiens peuvent excréter des oocystes sans séroconvertir. Il ne faudrait donc pas se fier seulement à la sérologie. Cependant, l'autopsie viendrait confirmer la présence d'une infection puisque dans l'étude de Lindsay *et al* (9), les chiens infectés avaient des lésions compatibles avec une infection à *N. caninum*.

Cependant, un chat infecté par *T. gondii* peut excréter une quantité importante d'oocystes dans les fèces (plus de 100 000 oocystes /g de fèces) (25). Ce qui pourrait nous amener à croire que le chien n'est pas l'hôte définitif ou que le cycle n'est pas complet puisque le nombre d'oocystes excrétés n'est pas assez élevé pour permettre une infection convainquante. McAllister rapporte que le nombre d'oocystes observés dans les fèces peut être affecté par le nombre de kystes qui ont été ingérés et le type et la quantité de nourriture donnée aux sujets testés (24).

Le fait que les fœtus aient été donnés en entier ou en morceaux d'environ 3 cm² ne devrait pas avoir influencé le cours de l'infection. S'il y avait des kystes dans les tissus, ils n'auraient pas été détruits par l'activité gastrique (26). Le fait d'avoir donné des morceaux de taille importante aux chiots mime leur comportement. Laisser les chiots jouer avec les fœtus auraient pu causer des lésions à la muqueuse buccale et permettre aux tachyzoïtes de passer directement à l'estomac (17, 26).

Le chien n'est peut-être pas l'hôte définitif de *N. caninum*, mais un hôte accidentel possible, ce qui pourrait expliquer que l'infection a réussi davantage chez un chiot immunosupprimé (9) comparé à notre étude. Dans l'étude de Lindsay *et al*, le chien immunosupprimé a excrété plus d'oocystes et a séroconverti comparé au chien n'ayant pas reçu de corticostéroïdes (9). De plus, le nombre d'oocystes excrétés par ce chien est aussi plus compatible avec une quantité acceptable d'oocystes qui pourrait permettre une infection des hôtes intermédiaires. Cette constatation amène l'hypothèse qu'un canidé sauvage pourrait être le véritable hôte définitif de *N. caninum*.

L'infection expérimentale réussie par McAllister *et al* et Lindsay *et al* (8, 9) soulève l'hypothèse de l'existence d'un deuxième hôte intermédiaire nécessaire afin de compléter le cycle. Cet hôte intermédiaire se contaminerait à partir des fœtus bovins et le chien ingérerait cet hôte intermédiaire. Ce cycle hypothétique expliquerait pourquoi dans les études de McAllister *et al* et Lindsay *et al* (8, 9) les chiens ont excrété des oocystes et qu'à la suite d'une inoculation par des fœtus bovins, il ne semble pas y avoir d'excrétion d'oocystes.

Toutefois, le chiot immunosupprimé de l'expérience 3 n'a pas excrété d'oocystes et n'a pas montré de signes cliniques, de changements hématologiques ou séroconverti à *N. caninum*. Cependant, dans l'expérience de Lindsay *et al*, le chien immunosupprimé a excrété des oocystes en bonne quantité ($4,5 \times 10^6$ oocystes) et a séroconverti (9). Ce chien a reçu des corticostéroïdes par voie intramusculaire 7 jours et 6 jours avant-inoculation, le jour de l'inoculation et un jour post-inoculation (9). L'infection absente chez le sujet 9 est peut être due à la voie d'administration. La

voie d'administration, *per os*, utilisée n'est peut-être pas adéquate et l'état d'immunosuppression souhaitée n'est pas atteint.

En conclusion, le fait d'être incapable d'infecter des chiots à l'aide de fœtus bovins démontrés comme étant porteur du parasite *N. caninum* suggère que le cycle de ce parasite n'est pas complètement élucidé. En effet, le rôle du chien comme hôte définitif n'a été démontré que lors d'infection avec du matériel expérimental.

D'autres études seront nécessaires afin de vérifier le rôle du chien et des canidés sauvages dans l'épidémiologie de la maladie.

Remerciements

Les auteurs veulent remercier chacun des médecins vétérinaires qui a participé à l'étude en rendant disponible des fœtus pour les expériences. Les auteurs veulent aussi remercier le personnel de l'animalerie de la Faculté de médecine vétérinaire pour l'aide technique.

Bibliographie

- 1- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J Am Vet Med Assoc 1988 ; 192 : 1269-1285.

- 2- Holmdahl OJM, Mattsson JG, Uggla A, Johansson KE. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiol Letters 1994 ; 119 : 187-192.

- 3- Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, Daft BM, Kinde H, Conrad PA. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. Vet Pathol 1990 ; 27 : 354-361.

- 4- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1991 ; 198 : 241-244.

- 5- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet Pathol 1991 ; 28 : 110-116.

- 6- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, *et al.* Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J Am Vet Med Assoc 1995 ; 207 : 1206-1210.

7- Dubey JP. Neosporosis in cattle : biology and economic impact. J Am Vet Med Assoc 1999 ; 214 : 1160-1163.

8- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 1998 ; 28 : 1473-1478.

9- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol 1999 ; 82 : 327-333.

10- Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. Seroepidemiology study of *Neospora caninum* in dairy herds. J Am Vet Med Assoc 1998 ; 213 : 1595-1598.

11- Sawada M, Park C, Kondo H, *et al.* Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. J Vet Med Sci 1998 ; 60 : 853-854.

12- Wouda W, Dijkstra Th, Kramer AMH, van Maanen C, Brinkhof JMA. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1677-1682.

13- Bergeron N, Fecteau G, Paré J, Martineau R, Villeneuve A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. Can Vet J 2000 ; 41 : 464-467.

- 14- Cox DD, Todd AC. Survey of gastrointestinal parasitism in Wisconsin dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1962 ; 141 : 706-709.
- 15- Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J Parasitol* 1992 ; 78 : 70-72.
- 16- Bryan LA, Gajadhar AA, Dubey JP, Haines DM. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora sp* protozoan. *Can Vet J* 1994 ; 35 : 11-113.
- 17- Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996 ; 67 : 1-59.
- 18- Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1999 ; 84: 349-367.
- 19- Nietfeld JC, Dubey JP, Anderson ML, Libal MC, Yeager MJ, Neiger RD. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1992 ; 4 : 223-226.
- 20- Dubey JP, Abbitt B, Topper MJ, Edwards JF. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum*-infection in an aborted bovine foetus. *J Comp Pathol* 1998 ; 118 : 169-172.

- 21- Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, *et al.* In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine foetuses. *Parasitol* 1993 ; 106 : 239-249.
- 22- Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf : pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest* 1991 ; 3 : 39-46.
- 23- Helman RG, Stair EL, Lehenbauer TW, Rodgers S, Saliki JT. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. *J Vet Diagn Invest* 1998 ; 10 : 292-295.
- 24- McAllister MM. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitol Today* 1999 ; 15 : 216-217.
- 25- Dubey JP. Toxoplasmosis in cats. *Feline Pract* 1986 ; 16 : 12-45.
- 26- Lindsay DS, Dubey JP. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (protozoan : apicomplexa). *J Parasitol* 1990 ; 76 : 410-413.

Tableau 1. Données démographiques, ratio ELISA et résultats de coprologie des chiots des 3 expériences à T0.

Identification	Age	Poids	Sexe	Race	Ratio	Coprologie	Acclimatation
	(sem)	(Kg)			ELISA^a		(jours)
Témoin A	13	11,0	M	Croisée	0,00	Coccidies	14
Sujet 1	11	11,6	M	Croisée	0,03	Négatif	14
Sujet 2	13	8,8	M	Croisée	0,02	Toxocara	14
Sujet 3	11	9,8	M	Croisée	0,02	Toxocara	14
Témoin B	9	7,0	M	Croisée	0,02	Coccidies et <i>Toxocara</i>	21
Sujet 4	10½	6,0	M	Croisée	0,08	<i>Toxocara</i>	21
Sujet 5	9	6,2	M	Croisée	0,01	<i>Toxocara</i>	25
Sujet 6	8	4,8	M	Croisée	0,03	Négatif	23
Témoin C	9	3,4	F	Croisée	0,00	Coccidies et <i>Toxocara</i>	8
Sujet 7	9	4,0	M	Croisée	0,00	Coccidies et <i>Toxocara</i>	8
Sujet 8	12	2,6	F	Pitbull	0,00	Coccidies et <i>Toxocara</i>	14
Sujet 9	15	2,2	F	Pitbull	0,00	Coccidies et <i>Toxocara</i>	28

^a Positif si ratio $\geq 0,30$

Tableau 2. Ratio ELISA des vaches lors de l'avortement et lésions retrouvées dans le cerveau des fœtus ingérés par les chiots des 3 expériences.

Chiots	Fœtus ^a	Ratio ELISA ^b	Histopathologie	Immunoperoxydase
Sujets 1,2,3	A	1,26	aucune lésion	négatif
	B	1,44	aucune lésion	présence de kystes
	C	2,16	foyers granulomateux	tachyzoïtes et kystes
	D + p ^c	1,50	aucune lésion	négatif
	E	1,22	aucune lésion	négatif
Sujet 4	F	1,68	aucune lésion	tachyzoïtes
	G	1,74	foyers granulomateux	tachyzoïtes
Sujet 5	H	1,32	aucune lésion	tachyzoïtes
	I	0,69	foyers de gliose	négatif
Sujet 6	J	1,38	foyers granulomateux	tachyzoïtes
	K	0,73	aucune lésion	négatif
Sujet 7	L	1,41	foyers granulomateux	tachyzoïtes et kystes
	M	1,01	foyers granulomateux	tachyzoïtes et kystes
	N	0,84	foyers granulomateux	tachyzoïtes
Sujet 8	O	1,56	foyers granulomateux	négatif
	P	0,71	aucune lésion	négatif
	Q	1,10	aucune lésion	négatif

Sujet 9	R	0,63	aucune lésion	négatif
	S	1,98	foyers granulomateux	tachyzoïtes
	T	1,61	foyers granulomateux	tachyzoïtes et kystes

^a Foetus reçus par les chiots sujets.

^b Ratio ELISA des vaches avortées. Ratio positif si $\geq 0,50$ ou $\geq 0,60$ selon la date à laquelle le test à été réalisé.

^c Placenta

Tableau 3. Changements macroscopiques et microscopiques chez les chiots de l'expérience 3.

Chiots	Lésions macroscopiques	Lésions microscopiques
Témoin C	10 ascaris dans le petit intestin	Foyers granulomateux dans le foie
Cas 7	Rien de significatif	Foyers granulomateux dans les poumons et le foie
Cas 8	Foie et poumons congestionnés, paroi du petit intestin épaissie, entérite importante, 10 ascaris, hémorragies linéaires dans le colon	Entérite à parvovirus aiguë, coagulation intravasculaire disséminée, quelques coccidies dans l'intestin ainsi que des courts cocco-bacilles intimement attachés à l'épithélium de certaines villosités intestinales.
Cas 9	50 ascaris dans le petit intestin	Foyers granulomateux dans le foie

Discussion

La transmission verticale dans les troupeaux laitiers du Québec varie d'un troupeau à un autre, de 0% à 85,7% avec une moyenne de 44,4%. Ce résultat est toutefois différent de ceux obtenus par d'autres études où la transmission verticale variait de 72% à 95,2% (40, 101, 145, 162, 187). Le nombre de troupeaux étudiés, le choix des troupeaux et le type d'étude pourraient expliquer ces différences. En effet, 23 troupeaux ont été étudiés comparativement à 1 à 6 troupeaux dans les études précédentes (40, 101, 145, 162, 187). Un nombre plus élevé de troupeaux permet de faire ressortir les facteurs intrinsèques à un troupeau. Ces facteurs pourraient influencer le taux de transmission verticale.

Dans l'étude présentée ici, il existe une corrélation entre la prévalence des animaux séropositifs dans un troupeau et la transmission verticale de ce même troupeau. Ainsi, les troupeaux à prévalence élevée ont une transmission verticale également plus élevée. Deux explications sont proposées. La première explication reflète une proportion plus élevée d'infection active que d'infection latente dans les troupeaux à prévalence élevée. La deuxième explication tient à la valeur prédictive positive des résultats. Les troupeaux à faible prévalence ont une plus grande proportion de faux positifs par rapport aux troupeaux à prévalence élevée. Quand on examine des filles provenant de mères possiblement faussement positives, la transmission verticale sera faussement diminuée. Il semble que la transmission verticale estimée est plus exacte dans les troupeaux à prévalence élevée que dans les troupeaux à prévalence faible. De plus, dans les autres études publiées, les auteurs

choisissaient des troupeaux où il existait des problèmes d'avortements à *N. caninum*, on peut supposer que la prévalence était donc élevée dans ces troupeaux.

Le type d'étude utilisée, transversale, a pu affecter à la baisse le taux de transmission verticale. Seules les contemporaines ont été étudiées. En comparaison, 3 études publiées étaient prospectives en utilisant tous les veaux nés sur la ferme pendant une période de temps (40, 145, 187). Les analyses sanguines étaient effectuées avant la prise du colostrum. L'étude de Wouda *et al* comprenait 2 parties (187), l'étude rétrospective (72%) avait une transmission verticale plus faible que l'étude prospective (92%) ce qui corrobore cette explication. La réforme sélective des vaches infectées diminue le taux de transmission verticale quand on calcule à partir des vaches contemporaines. Il a été rapporté que les vaches séropositives ont plus de chance d'être réformées et produisent moins de lait que les vaches négatives du même groupe (173, 175). L'étude de Journel *et al* (101) est une étude rétrospective et leur résultat de transmission verticale (77%) va dans le même sens que l'étude rétrospective de Wouda *et al* (187). L'étude par Schares *et al* (162) a également utilisé une étude rétrospective (93%). Le taux de transmission verticale a pu être influencé par l'analyse d'un seul troupeau avec des problèmes d'avortements.

Il y a d'autres facteurs qui peuvent être la cause d'une transmission verticale plus faible dans les troupeaux laitiers du Québec. Les facteurs environnementaux et de gestion sont différents d'un pays à un autre. La taille du troupeau, le climat et le taux de production spécifique à chaque exploitation peuvent avoir un effet sur le stress que subissent les vaches et ainsi influencer la recrudescence des infections latentes et affecter le taux de transmission verticale de *N. caninum*.

La présence de transmission horizontale est suspectée dans 7 familles provenant de 6 troupeaux différents. Parmi ces 7 familles, deux ont une descendance qui vient confirmer le statut positif (infecté) de la vache. Les critères de sélection étaient les suivants : une vache séropositive devait provenir d'une mère séronégative et avoir un minimum de 2 sœurs séronégatives. Les critères choisis étaient stricts et se comparaient à ceux établis par Schares *et al* lors d'une précédente étude (162). Dans cette étude, une seule transmission horizontale avait été observée dans le troupeau (162). Il semble que ce mode de transmission serait rapporté peu souvent par rapport à la transmission verticale.

Onze placentas de vaches séropositives à *N. caninum* et vêlant à terme ont été examinés pour évaluer la présence de matériel potentiellement infectieux. Les changements histologiques observés dans les placentas provenant de mères séropositives ont été considérés non-significatifs. Les résultats d'immunoperoxydase étaient tous négatifs. La méthode PCR a identifié, chez 2 placentas, un acide nucléique compatible avec des organismes de *N. caninum*. Ces résultats suggèrent que les placentas provenant de vaches séropositives à *N. caninum* et vêlant à terme peuvent être une source d'infection pour les chiens. Toutefois, l'incidence de ce mode de transmission semble peu fréquent vu le petit nombre de placentas positifs parmi les vaches séropositives et le faible nombre d'organismes présents dans les placentas.

Neuf chiots ont été nourris avec des fœtus infectés de *N. caninum* afin de tenter de mimer le mode de transmission naturelle de *N. caninum*. Il n'a pas été possible d'infecter des chiots en leur faisant ingérer des fœtus bovins considérés infectés à *N. caninum*. Les hypothèses suivantes peuvent expliquer ces résultats : 1) la conservation des fœtus entraîne une diminution du potentiel infectieux, 2) la charge

parasitaire était trop faible ou devenue trop faible suite aux délais avant l'ingestion dans les fœtus utilisés, 3) le chien n'est pas l'hôte définitif de *N. caninum*, mais un hôte accidentel possible et 4) il existe un hôte intermédiaire qui ingère les avortons et qui contamine éventuellement les chiens.

La viabilité du parasite est possiblement influencée par la température (107). Les conditions dans lesquelles le parasite a été transporté ou conservé peuvent avoir modifié le potentiel infectieux du parasite. La congélation à -70°C des fœtus de l'expérience 1 peut avoir diminué le potentiel infectieux. Une étude a démontré que la congélation à -20°C a tué les bradyzoïtes qui se trouvaient dans des cerveaux homogénéisés après 7 jours (107). Toutefois, une autre étude indique que des kystes provenant d'un cerveau de veau ont survécu à -52°C pendant un mois (26). Il faudrait faire des études supplémentaires pour connaître la viabilité du parasite à -70°C .

Dans la deuxième expérience, les fœtus ont été conservés de 14 à 28 jours à 4°C avant d'être ingérés par les chiens. Une étude a montré que les bradyzoïtes ont survécu dans le cerveau intact de la carcasse de souris à 4°C pour 7 jours (107). Il faudrait des études supplémentaires pour évaluer la viabilité du parasite à 4°C . Dans l'expérience 3, les fœtus ont été donnés la journée même et l'absence d'infection est peut-être due à une diminution de la viabilité du parasite lorsqu'il est conservé à la température ambiante.

La quantité de parasites (tachyzoïtes et kystes) présente dans les fœtus infectés ne peut pas être évaluée précisément. Toutefois, la quantité de parasite semble être faible dans les fœtus utilisés parce que peu ou pas de parasites étaient visibles à l'IP.

On rapporte que seulement quelques organismes de *N. caninum* peuvent être vus dans les tissus autolysés (71). Dans l'expérience de McAllister *et al* le nombre de kystes donnés à chaque chiot était connu, variant de 125 à 300 kystes (125). Le nombre de parasites contenus dans les fœtus était probablement faible et le fait de les donner aux chiens quelque temps après l'avortement pourrait avoir influencé leur potentiel de virulence.

Une étude rapporte un cas où ils ont retrouvé plus de kystes dans la moelle épinière que dans le cerveau (13). Il semble que chez tous les fœtus infectés congénitalement, *N. caninum* soit confiné au cerveau et à la moelle épinière (71). Les chiots de l'étude ont reçu les cerveaux des fœtus considérés comme du matériel infectieux et ils recevaient que le tiers crânial ou moins de la moelle épinière selon la disponibilité de celle-ci. Puisque les kystes pourraient être plus nombreux au niveau de la moelle épinière, il se pourrait que les chiots n'aient pas reçu une dose infectante adéquate en recevant peu ou pas de moelle épinière.

Les études réalisées par McAllister *et al* et Lindsay *et al* (146, 125) ont utilisé des souris qui contenaient des kystes pour infecter les chiots avec succès. Si l'inoculum contient seulement des tachyzoïtes, il est possible qu'aucun organisme ne survive à la digestion gastrique (124). Parmi les fœtus que les chiots ont reçus, certains ne contenaient que des tachyzoïtes, ce qui peut expliquer que certains chiots n'aient pas été infectés. Une autre explication possible pourrait être que le nombre peu élevé de kystes présents dans les fœtus ne permettaient pas une infection détectable par les tests diagnostiques présentement disponibles.

Dans l'étude de Lindsay *et al* (116), le chiot immunosupprimé a excrété plus d'oocystes et a séroconverti comparé au chien n'ayant pas reçu de corticostéroïdes.

Le chien n'est peut-être pas l'hôte définitif de *N. caninum*, mais un hôte accidentel possible. Une autre hypothèse est qu'un canidé sauvage serait l'hôte définitif du parasite *N. caninum*.

L'hôte définitif de *N. caninum* doit posséder quelques caractéristiques. L'hôte définitif recherché est un animal qui est présent partout dans le monde puisque des avortements à *N. caninum* sont rapportés sur tous les continents. Il s'agit d'une espèce animale qui a un contact fréquent avec les bovins, on parle donc d'un animal en liberté et ne demeurant pas en jardin zoologique exclusivement. Cet animal doit pouvoir entrer en contact avec les bovins qui sont au pâturage et ceux qui restent toujours dans une étable. Un contact facile entre les hôtes semble nécessaire pour permettre une transmission entre les différents hôtes du cycle de transmission de *N. caninum*.

L'infection expérimentale réussie par McAllister *et al* et Lindsay *et al* (116, 125) soulève l'idée de l'existence d'un deuxième hôte intermédiaire nécessaire afin de compléter le cycle. Cet hôte intermédiaire se contaminerait à partir des fœtus bovins et le chien ingérerait cet hôte intermédiaire. Ce cycle hypothétique expliquerait pourquoi dans les études de McAllister *et al* et Lindsay *et al* (116, 125) les chiens ont excrété des oocystes et qu'à la suite d'une inoculation par des fœtus bovins, il ne semble pas y avoir d'excrétion d'oocystes. Ainsi, le modèle expérimental via la souris ressemblerait plus au modèle naturel que l'infection sans la souris, directement des fœtus.

Conclusion

Les résultats de cette étude confirment l'importance de la transmission verticale dans l'épidémiologie de l'infection à *N. caninum*, particulièrement quand la prévalence d'animaux séropositifs est élevée dans le troupeau. La variabilité du taux de transmission verticale observée dans les différents troupeaux présente un portrait de ce qui peut être observé en ne testant que les contemporaines. Idéalement, les animaux devraient être testés avant la prise de colostrum.

La transmission horizontale n'est identifiée que dans 6 des 23 troupeaux, ce qui suggère que ce mode de transmission n'est pas la route d'infection majeure pour *N. caninum*.

Même si les placentas ne semblent pas être une source d'infection importante pour le chien, il est quand même prudent de prévenir l'ingestion de placentas provenant de vaches séropositives.

L'épidémiologie de *N. caninum* n'est pas encore complètement élucidée puisque dans cette étude, il n'a pas été possible d'infecter des chiots avec des fœtus bovins infectés de *N. caninum*.

Le rôle du chien comme étant un hôte définitif n'a été démontré que lors d'infections expérimentales. D'autres études seront nécessaires pour vérifier si le chien agit comme hôte définitif occasionnel ou si un autre animal est impliqué comme hôte intermédiaire. Il se peut qu'un rongeur agisse comme hôte intermédiaire dans le cycle de *N. caninum* où il ferait le lien entre les chiens et le matériel

infectieux. Il faudrait aussi explorer le rôle des canidés sauvages dans l'épidémiologie de la maladie.

Beaucoup d'études restent à faire sur la durée de vie et la viabilité des tachyzoïtes et des kystes dans différentes conditions de conservation. Ces mêmes études devront être faites sur les oocystes lorsque l'hôte ou les hôtes définitif (s) seront connus. Toutes ces études nous permettront de connaître l'épidémiologie de la maladie et le cycle de vie de *N. caninum*.

Bibliographie

- 1- Abbitt B, Craig TM, Jones LP, Huey RL, Eugster K. Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis*. J Am Vet Med Assoc 1993; 203 : 444-448.
- 2- Agerholm JS, Barr BC. Bovine abortions associated with *Neospora* in Denmark. Acta Vet Scand 1994 ; 35 : 461-464.
- 3- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1991 ; 198 : 241-244.
- 4- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, Read DH, Dubey JP, Conrad PA, Barr BC. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J Am Vet Med Assoc 1995 ; 207 : 1206-1210.
- 5- Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC, Conrad PA. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1997 ; 210 : 1169-1172.
- 6- Andrianarivo AG, Choromanski L, McDonough SP, Packham AE, Conrad PA. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1613-1625.
- 7- Barber JS, Gasser RB, J Ellis, Reichel MP, McMillan D, Trees AJ. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. J Parasitol 1997 ; 83 : 1056-1058.

- 8- Barber JS, Holmdahl OJM, Owen MR, Guy F, Uggla A, Trees AJ. Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). Parasitol 1995 ; 111 : 563-568.
- 9- Barber JS, Payne- Johnson CE, Trees AJ. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. J Small Anim Pract 1996 ; 37 : 568-574.
- 10- Barber JS, Trees AJ. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. Vet Rec 1996 ; 139 : 439-443.
- 11- Barber J, Trees AJ, Owen M, Tennant B. Isolation of *Neospora caninum* from a British dog. Vet Rec 1993 ; 133 : 531-532.
- 12- Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, Daft BM, Kinde H, Conrad PA. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. Vet Pathol 1990 ; 27 : 354-361.
- 13- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet Pathol 1991 ; 28 : 110-116.
- 14- Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, Chauvet AE, Dubey JP, Ardans AA. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses : Four cases (1990-1992). J Am Vet Med Assoc 1993 ; 202 : 110-117.
- 15- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, BonDurant RH, Ardans AA, Olivier MN, Conrad PA. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. J Vet Diagn Invest 1994 ; 6 : 207-215.

- 16- Baszler TV, Gay LJC, Long MT, Mathison BA. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. J Clin Microbiol 1999 ; 37 : 4059-4064.
- 17- Bildfell R, Davidson J, Dubey JP. *Neospora*-induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. Can Vet J 1994 ; 35 : 122.
- 18- Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Parasitol Res 1984 ; 70 : 271-274.
- 19- Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJM, Uggla A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 1996 ; 208 : 1441-1444.
- 20- Björkman C, Lundén A, Holmdahl J, Barber J, Trees AJ, Uggla A. *Neospora caninum* in dogs : detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. Parasite Immunol 1994 ; 16 : 643-648.
- 21- Björkman C, Lundén A, Uggla A. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Swedish dogs. Acta Vet Scand 1994 ; 35 : 445-447.
- 22- Björkman C, Näslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton D, Uggla A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest 1999 ; 11 : 41-44.
- 23- Björkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1497-1507.
- 24- Boulton JG, Gill PA, Cook RW, Fraser GC, Harper PAW, Dubey JP. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. Aust Vet J 1995 ; 72 : 119-120.

- 25- Bruère AN, West DM. Abortion in ewes. *In* : The sheep : Health, disease and production. Veterinary Continuing Education, Massey University, Palmerston North, 1993, p. 56-69.
- 26- Bryan LA, Gajadhar AA, Dubey JP, Haines DM. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *Can Vet J* 1994 ; 35 : 111-113.
- 27- Buxton D, Caldow GL, Maley SW, Marks J, Innes EA. Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Vet Rec* 1997 ; 141 : 649-651.
- 28- Buxton D, Maley SW, Pastoret PP, Brochier B, Innes EA. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet Rec* 1997 ; 141 : 308-309.
- 29- Campero CM, Anderson AL, Conosciutu G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. *Neospora caninum*-associated abortion in dairy herd in Argentina. *Vet Rec* 1998; 143 : 228-229.
- 30- Cheadle MA, Lindsay DS, Blagburn BL. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs. *Vet Parasitol* 1999 ; 85 : 325-330.
- 31- Chessum BS. Reactivation of *Toxoplasma* oocyst production in the cat by infection with *Isospora felis*. *Br Vet J* 1972 ; 128 : XXXIII-XXXVI.
- 32- Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, Sorjonen DC, Dubey JP. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Parasitol* 1995 ; 81 : 208-211.
- 33- Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, Anderson M, Daft B, Kinde H, Dubey JP, Munson L, Ardans A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine foetuses. *Parasitol* 1993 ; 106 : 239-249.

- 34- Conrad PA, Sverlow KW, Anderson ML, Rowe JD, BonDurant RH, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, Dubey JP, Duhamel G, Barr B. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infection. J Vet Diagn Invest 1993 ; 5 : 572-578.
- 35- Cox BT, Reichel MP, Griffiths LM. Serology of a *Neospora* abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand : a case study. New Zealand Vet J 1998 ; 46 : 28-31.
- 36- Cuddon P, Lin DS, Bowman DD, Lindsay DS, Miller TK, Duncan ID, deLahunta A, Cummings J, Suter M, Cooper B, King JM, Dubey JP. *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates : Diagnostic evaluation and organism isolation. J Vet Intern Med 1992 ; 6 : 325-332.
- 37- Daft BM, Barr BC, Collins N, Sverlow K. *Neospora* encephalomyelitis and polyradiculoneuritis in aged mare with Cushing's disease. Equine Vet J 1997 ; 29 : 240-243.
- 38- Davison HC, French NP, Trees AJ. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. Vet Rec 1999 ; 144 : 547-550.
- 39- Davison HC, Otter A, Trees AJ. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1189-1194.
- 40- Davison HC, Otter A, Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1683-1689.
- 41- De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs : humoral and cellular immune responses. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1647-1657.

- 42- Dubey JP. Feline toxoplasmosis : A survey of domiciled and stray cats. J Am Vet Med Assoc 1973 ; 162 : 873-877.
- 43- Dubey JP. Attempted transmission of feline coccidia from chronically infected queens to their kittens. J Am Vet Med Assoc 1977 ; 170 : 541-543.
- 44- Dubey JP. *Toxoplasma, Hammondia, Besnoitia, Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In : Parasitic Protozoa, Vol 3. Edit Kreier JP, Academic Press, New York, 1977, p. 102-166.
- 45- Dubey JP. Toxoplasmosis in cats. Feline Pract 1986 ; 16 : 12-45.
- 46- Dubey JP. Congenital neosporosis in a calf. Vet Rec 1989 ; 125 : 486.
- 47- Dubey JP. *Neospora caninum* : A look at a new *Toxoplasma*-like parasite of dogs and other animals. Comp Cont Educ Pract Vet 1990 ; 12 : 653-663.
- 48- Dubey JP. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. J Parasitol 1995 ; 81 : 410-415.
- 49- Dubey JP. Neosporosis-the first decade of research. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1485-1488.
- 50- Dubey JP. Neosporosis in cattle : biology and economic impact. J Am Vet Med Assoc 1999 ; 214 : 1160-1163.
- 51- Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol 1999 ; 84: 349-367.
- 52- Dubey JP, Abbitt B, Topper MJ, Edwards JF. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum*-infection in an aborted bovine fetus. J Comp Pathol 1998 ; 118 : 169-172.
- 53- Dubey JP, Acland HM, Hamir AN. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. J Parasitol 1992 ; 78 : 532-534.

- 54- Dubey JP, Beattie CP. General Biology. *In* : Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press Inc., Florida, 1988, p. 1-40.
- 55- Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis in sheep (*Ovis auries*). *In* : Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press Inc., Florida, 1988, p. 61-80.
- 56- Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis in cats. *In* : Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press Inc., Florida, 1988, p. 117-124.
- 57- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1988 ; 192 : 1269-1285.
- 58- Dubey JP, Frenkel JK. Immunity to feline toxoplasmosis : Modification by administration of corticosteroids. *Vet Pathol* 1974 ; 11 : 350-379.
- 59- Dubey JP, Greene CE, Lappin MR. Toxoplasmosis and Neosporosis. *In* : Infectious Diseases of the Dog and Cat. Edit Greene CE, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1990, p. 818-834.
- 60- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J Am Vet Med Assoc* 1990 ; 197 : 1043-1044.
- 61- Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS, Topper MJ. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J Parasitol* 1990 ; 76 : 127-130.
- 62- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1988 ; 193 : 1259-1263.
- 63- Dubey JP, Hollis K, Romand S, Thulliez P, Kwok OCH, Hungerford L, Anchor C, Etter D. High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Int J Parasitol* 1999 ; 29 : 1709-1711.

- 64- Dubey JP, Janovitz EB, Skowronek AJ. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Vet Parasitol* 1992 ; 43 : 137-141.
- 65- Dubey JP, Koestner A, Piper RC. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1990 ; 197 : 857-860.
- 66- Dubey JP, Lappin MR. Toxoplasmosis and neosporosis. *In* : Infectious diseases of the dog and cat, 2nd edition. Edit Greene CE, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1998, p. 493-509.
- 67- Dubey JP, Leathers CW, Lindsay DS. *Neospora caninum*-like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. *J Parasitol* 1989 ; 75 : 146-148.
- 68- Dubey JP, Lindsay DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res* 1989 ; 50 : 1578-1579.
- 69- Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis in Dogs. *Vet Parasitol* 1990 ; 36 : 147-151.
- 70- Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis. *Parasitol Today* 1993 ; 9 : 452-458.
- 71- Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996 ; 67 : 1-59.
- 72- Dubey JP, Lindsay DS. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol Res* 2000 ; 86 : 165-168.
- 73- Dubey JP, Lindsay DD, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1992 ; 201 : 709-713.
- 74- Dubey JP, Lindsay DS, Lipscomb TP. Neosporosis in Cats. *Vet Pathol* 1990 ; 27 : 335-339.
- 75- Dubey JP, Metzger FL, Hattel AL, Lindsay DS, Fritz DL. Canine cutaneous neosporosis : clinical improvement with clindamycin. *Vet Dermatol* 1995 ; 6 : 37-43.

- 76- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. J Parasitol 1970 ; 56 : 447-456.
- 77- Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. J Am Vet Med Assoc 1970 ; 157 : 1767-1770.
- 78- Dubey JP, Miller S, Lindsay DS, Topper MJ. *Neospora caninum*-associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. J Vet Diagn Invest 1990 ; 2 : 66-69.
- 79- Dubey JP, Romand S, Hilali M, Kwok OCH, Thulliez P. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). Int J Parasitol 1998 ; 28 : 527-529.
- 80- Duivenvoorden J, Lusi P. *Neospora* abortions in eastern Ontario dairy herds. Can Vet J 1995 ; 36 : 623.
- 81- Ellis JT, McMillan D, Ryce C, Payne S, Atkinson R, Harper PAW. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1589-1596.
- 82- Fondevila D, Anor S, Pumarola M, Dubey JP. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. Vet Parasitol 1998 ; 77 : 187-189.
- 83- Fritz D, George C, Dubey JP, Trees AJ, Barber JS, Hopfner CL, Mehaut S, LeNet JL, Longeart L. *Neospora caninum* : associated nodular dermatitis in a middle-aged dog. Canine Pract 1997 ; 22 : 21-22.
- 84- Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. Vet Parasitol 1999 ; 86 : 71-75.
- 85- Graham DA, Smyth JA, McLaren IE, Ellis WA. Stillbirth/perinatal weak calf syndrome : Serological examination for evidence of *Neospora caninum* infection. Vet Rec 1996 ; 139 ; 523-524.

- 86- Greene CE, Cook JR, Mahaffey EA. Clindamycine for treatment of *Toxoplasma* polymyositis in a dog. J Am Vet Med Assoc 1985 ; 187 : 631-364.
- 87- Greig B, Rossow KD, Collins JE, Dubey JP. *Neospora caninum* pneumonia in an adult dog. J Am Vet Med Assoc 1995 ; 206 : 1000-1001.
- 88- Harmelin A, Perl S, Nyska A, Yakobson B, Shpigel N, Orgad U, Dubey JP. Neosporosis-associated bovine abortion in Israel. Vet Rec 1995 ; 136 : 80.
- 89- Hay WH, Shell LG, Lindsay DS, Dubey JP. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. J Am Vet Med Assoc 1990 ; 197 : 87-89.
- 90- Helman RG, Stair EL, Lehenbauer TW, Rodgers S, Saliki JT. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. J Vet Diagn Invest 1998 ; 42 : 190-191.
- 91- Hietala SK, Thurmond MC. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. Int J Parasitol 1999 ; 29 : 1669-1676.
- 92- Hilali M, Romand S, Thulliez P, Kwok OCH, Dubey JP. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. Vet Parasitol 1998 ; 75 : 269-271.
- 93- Hoar BR, Ribble CS, Spitzer CC, Spitzer PG, Janzen ED. Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora* sp. infection. Can Vet J 1996 ; 37 : 364-366.
- 94- Holmdahl OJM, Björkman C, Uggla A. A case of *Neospora* associated bovine abortion in Sweden. Acta Vet Scand 1995 ; 36 : 279-281.
- 95- Holmdahl OJM, Mattsson JG, Uggla A, Johansson. K.E. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. FEMS Microbiol Letters 1994 ; 119 : 187-192.

- 96- Hornok S, Näslund K, Hajtos I, Tanyi J, Tekes L, Verga I, Uggla A, Björkman C. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in bovine postabortion blood samples from Hungary. *Acta Vet Hung* 1998 ; 46 : 431-436.
- 97- Huong LTT, Ljungström BL, Uggla A, Björkman C. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. *Vet Parasitol* 1998 ; 75 : 53-57.
- 98- Jardine JE, Last RD. *Neospora caninum* in aborted twin calves. *J South Afr Vet Assoc* 1993 ; 64 : 101-102.
- 99- Jardine JE, Wells BH. Bovine neosporosis in Zimbabwe. *Vet Rec* 1995 ; 137 : 223.
- 100- Jensen AM, Björkman C, Kjeldsen AM, Wedderkopp A, Willadsen C, Uggla A, Lind P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev Vet Med* 1999 ; 40 : 151-163.
- 101- Journel C, Tainturier D, Pitel PH, Chatagnon G. *Neospora caninum* : étude d'un élevage contaminé, quelques hypothèses de transmission. *Point Vét* 1999 ; 30 : 49-56.
- 102- Koestner A, Cole CR. Neuropathology of canine toxoplasmosis. *Am J Vet Res* 1960 ; 21 : 831-844.
- 103- Lappin MR. Feline Toxoplasmosis : Interpretation of Diagnosis Test Results. *Sem Vet Med Surg (Small Animal)* 1996 ; 11:154-160.
- 104- Larochelle D, Paré J. La néosporose au Québec. *Raizo* 1993 ; 8 : 1-5.
- 105- Lathe CL. *Neospora caninum* in British dogs. *Vet Rec* 1994 ; 134 : 532.
- 106- Liddell S, Jenkins MC, Collica CM, Dubey JP. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J Parasitol* 1999 ; 85 : 1072-1075.

- 107- Lindsay DS, Blagburn BL, Dubey JP. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. J Parasitol 1992 ; 78 : 70-72.
- 108- Lindsay DS, Butter JM, Blagburn BL. Efficacy of decoquinate against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. Vet Parasitol 1997 ; 68 : 34-40.
- 109- Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res 1989 ; 50 : 1981-1983.
- 110- Lindsay DS, Dubey JP. *Neospora caninum* (protozoa :apicomplexa) infections in mice. J Parasitol 1989 ; 75 : 772-779.
- 111- Lindsay DS, Dubey JP. Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell culture. J Parasitol 1989 ; 75 : 990-992.
- 112- Lindsay DS, Dubey JP. *Neospora caninum* (protozoa : apicomplexa) infections in rats. Can J Zool 1990 ; 68 : 1595-1599.
- 113- Lindsay DS, Dubey JP. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (protozoa : apicomplexa) infections in mice. J Parasitol 1990 ; 76 : 177-179.
- 114- Lindsay DS, Dubey JP. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (protozoa : apicomplexa). J Parasitol 1990 ; 76 : 410-413.
- 115- Lindsay DS, Dubey JP, Cole RA, Nuehring LP, Blagburn BL. *Neospora*-induced protozoal abortions in cattle. Comp Cont Educ Pract Vet 1993 ; 15 : 882-889.
- 116- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol 1999 ; 82 : 327-333.
- 117- Lindsay DS, Kelly EJ, McKown RD, Stein FJ, Plozer J, Herman J, Blagburn BL, Dubey JP. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. J Parasitol 1996 ; 82 : 657-659.

- 118- Lindsay DS, Rippey NS, Cole RA, Parsons LC, Dubey JP, Tidwell RR, Blagburn BL. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am J Vet Res* 1994 ; 55 : 976-981.
- 119- Lindsay DS, Speer CA, Toivio-Kinnucan MA, Dubey JP, Blagburn BL. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am J Vet Res* 1993 ; 54 : 103-106.
- 120- Lindsay DS, Steinberg H, Dubielzig RR, Semrad SD, Konkle DM, Miller PE, Blagburn BL. Central nervous system neosporosis in a foal. *J Vet Diagn Invest* 1996 ; 8 : 507-510.
- 121- Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int J Parasitol* 1999 ; 29 : 1521-1523.
- 122- Marsh AE, Barr BC, Sverlow K, Ho M, Dubey JP, Conrad PA. Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *J Parasitol* 1995 ; 81 : 530-535.
- 123- Mayhew IG, Smith KC, Dubey JP, Gatward LK, McGlennon NJ. Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. *J Small Anim Pract* 1991 ; 32 : 609-612.
- 124- McAllister MM. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitol Today* 1999 ; 15 : 216-217.
- 125- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998 ; 28 : 1473-1478.
- 126- McAllister M, Huffman EM, Hietala SK, Conrad PA, Anderson ML, Salman MD. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diagn Invest* 1996 ; 8 : 355-357.

- 127- McAllister MM, Jolley WR, Wills RA, Lindsay DS, McGuire AM, Tranas JD. Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. Am J Vet Res 1998 ; 59 : 441-444.
- 128- McGlennon NJ, Jefferies AR, Casas C. Polyradiculoneuritis and polymyositis due to a *Toxoplasma*-like protozoan : diagnosis and treatment. J Small Anim Pract 1990 ; 31 : 102-104.
- 129- McIntosh DW, Haines DM. *Neospora* infection in an aborted fetus in British Columbia. Can Vet J 1994 ; 35 : 114-115.
- 130- McNamee PT, Jeffrey M. *Neospora*-associated bovine abortion in Northern Ireland. Vet Rec 1994 ; 134 : 48.
- 131- McNamee PT, Trees AJ, Guy F, Moffet D, Kilpatrick D. Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland. Vet Rec 1996 ; 138 : 419-420.
- 132- Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, van Werven T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks : a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. Theriogenology 1998 49:1301-1309.
- 133- Nietfeld JC, Dubey JP, Anderson ML, Libal MC, Yaeger MJ, Neiger RD. *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. J Vet Diagn Invest 1992 ; 4 : 223-226.
- 134- Obendorf DL, Murray N, Veldhuis G, Munday BL, Dubey JP. Abortion caused by neosporosis in cattle. Aust Vet J 1995 ; 72 : 117-118.
- 135- Odin M, Dubey JP. Sudden death associated with *Neospora caninum* myocarditis in a dog. J Am Vet Med Assoc 1993 ; 203 : 831-833.

- 136- Ogino H, Watanabe E, Watanabe S, Agawa H, Narita M, Haritani M, Kawashima K. Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *J Comp Pathol* 1992 ; 107 : 231-237.
- 137- O'Toole D, Jeffrey M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet Rec* 1987 ; 121 : 563-566.
- 138- Otter A, Griffiths IB, Jeffrey M. Bovine *Neospora caninum* abortion in the UK. *Vet Rec* 1993 ; 133 : 375.
- 139- Otter A, Jeffrey M, Griffiths IB, Dubey JP. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet Rec* 1995 ; 136 : 602-606.
- 140- Otter A, Jeffrey M, Scholes SFE, Helmick B, Wilesmith JW, Trees AJ. Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Vet Rec* 1997 ; 141 : 487-489.
- 141- Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA, Loomis EF, Rowe JD, Anderson ML, Marsh AE, Cray C, Barr BC. A modified agglutination test for *Neospora caninum* : development, optimization, and comparison to direct fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998 ; 5 : 467-473.
- 142- Paré J. Mise à jour sur les infections à *Neospora* sp. chez les bovins. *Le Méd Vét Québ* 1995 ; 25 : 12-16.
- 143- Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 1998 ; 213 : 1595-1598.
- 144- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 1995 ; 7 : 273-275.

- 145- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can J Vet Res* 1996 ; 60 : 133-139.
- 146- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 1997; 83 : 82-87.
- 147- Parish SM, Maag-Miller L, Besser TE, Weidner JP, McElwain T, Knowles DP, Leathers CW. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J Am Vet Med Assoc* 1987 ; 191 : 1599-1600.
- 148- Pasquali P, Mandara MT, Adamo F, Ricci G, Polidori GA, Dubey JP. Neosporosis in a dog in Italy. *Vet Parasitol* 1998 ; 77 : 297-299.
- 149- Perl S, Harrus S, Satuchne C (Goldvaser), Yakobson B, Haines D. Cutaneous neosporosis in a dog in Israel. *Vet Parasitol* 1998 ; 79 : 257-261.
- 150- Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC, Colby ED. Development of gametes and oocysts in cats fed cysts derived from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 1977 ; 63 : 158-159.
- 151- Pitel PH, Pronost S, Legendre MF, Chatagnon G, Tainturier D, Fortier G. Infection des bovins par *Neospora caninum* : deux années d'observations dans l'Ouest de la France. *Point Vét* 2000 ; 31 : 53-58.
- 152- Poli A, Mancianti F, Carli MA, Stroschio MC, Kramer L. *Neospora caninum* infection in a Bernese cattle dog from Italy. *Vet Parasitol* 1998 ; 78 : 79-85.
- 153- Poncelet L, Coignoul F, Fontaine J, Balligand M. Infestation de chiots par *Neospora canis* en Belgique et en France ? *Ann Méd Vét* 1990 ; 134 : 167-171.

- 154- Pumarola M, Anor S, Ramis AJ, Borràs D, Gorraiz J, Dubey JP. *Neospora caninum* infection in a Napolitan mastiff dog from Spain. *Vet Parasitol* 1996 ; 64 : 315-317.
- 155- Quintanilla- Gozalo A, Pereira- Bueno J, Tabarés E, Innes EA, González-Paniello R, Ortega- Mora LM. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol* 1999 ; 29 : 1201-1208.
- 156- Reichel MP, Drake JM. The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. *New Zealand Vet J* 1996 ; 44 : 151-154.
- 157- Reichel MP, Thornton RN, Morgan PL, Mills RJ.M, Schares G. Neosporosis in a pup. *New Zealand Vet J* 1998 ; 46 : 106-110.
- 158- Remington JS, Jacobs L, Melton ML. Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. *J Infect Dis* 1961 ; 108 : 163-173.
- 159- Rogers DC, Grotelueschen DM, Anderson ML, McCullough MS, Shain WS, Dubey JP. Endemic protozoal abortions in a dairy cow herd. *Agri-Practice* 1993 ; 14 : 16-21.
- 160- Romand S, Thulliez P, Dubey JP. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res* 1998 ; 84 : 50-53.
- 161- Sawada M, Park C, Kondo H, Morita T, Shimada A, Yamane I, Umemura T. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J Vet Med Sci* 1998 ; 60 : 853-854.
- 162- Schares G, Peters M, Wurm R, Bärwald A, Conraths FJ. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998 ; 80 : 87-98.

- 163- Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey JP, de Graaf DC, Edelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths FJ. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. J Parasitol 1999 ; 85 : 688-694.
- 164- Shivaprasad HL, Ely R, Dubey JP. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. Vet Parasitol 1989 ; 34 : 145-148.
- 165- Simpson VR, Monies RJ, Riley P, Cromey DS. Foxes and neosporosis. Vet Rec 1997 ; 141 : 503
- 166- Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. J Protozool 1989 ; 36 : 458-463.
- 167- Stenlund S, Björkman C, Holmdahl OJM, Kindahl H, Uggla A. Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. Parasitol Res 1997 ; 83 : 214-219.
- 168- Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. Vet Parasitol 1999 ; 85 : 227-234.
- 169- Thilsted JP, Dubey JP. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J Vet Diagn Invest 1989 ; 1 : 205-209.
- 170- Thornton RN, Gajadhar A, Evans J. *Neospora* abortion epidemic in a dairy herd. New Zealand Vet J 1994 ; 42 : 190-191.
- 171- Thornton RN, Thompson EJ, Dubey JP. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. New Zealand Vet J 1991 ; 39 : 129-133.
- 172- Thurmond MC, Anderson ML, Blanchard PC. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. J Parasitol 1995 ; 81 : 364-367.
- 173- Thurmond MC, Hietala SK. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. Am J Vet Res 1996 ; 57 : 1559-1562.

- 174- Thurmond MC, Hietala SK. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res* 1997 ; 58 : 1381-1385.
- 175- Thurmond MC, Hietala SK. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1997 ; 210 : 672-674.
- 176- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard P.C. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest* 1997 ; 9 : 44-49.
- 177- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J Vet Diagn Invest* 1999 ; 11 : 90-94.
- 178- Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 1999 ; 29 : 1195-1200.
- 179- Trees AJ, Guy F, Low JC, Roberts L, Buxton D, Dubey JP. Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet Rec* 1994 ; 134 : 405-407.
- 180- Trees AJ, Guy F, Tennant BJ, Balfour AH, Dubey JP. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Vet Rec* 1993 ; 132 : 125-126.
- 181- Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, Unzaga JM, Di Lorenzo C, Guglielmone A, Jenkins MC, Dubey JP. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int J Parasitol* 1999 ; 29 : 1705-1708.

- 182- Waldeland H. Toxoplasmosis in sheep. Long-term epidemiological studies in four breeding flocks. *Acta Vet Scand* 1977 ; 18 : 227-236.
- 183- Waldner CL, Janzen ED, Henderson J, Haines DM. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J Am Vet Med Assoc* 1999 ; 215 : 1485-1490.
- 184- Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproduction performance in beef herds. *J Am Vet Med Assoc* 1998 ; 213 : 685-690.
- 185- Wouda W, Dijkstra Th, Kramer AMH, Van Maanen C, Brinkhof JMA. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol* 1999 ; 29 : 1677-1682.
- 186- Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol* 1997 ; 83 : 545-547.
- 187- Wouda W, Moen AR, Schukken YH. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 1998 ; 49 : 1311-1316.
- 188- Wouda W, Moen AR, Visser IJR, VanKnapen F. Bovine fetal neosporosis : a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest* 1997 ; 9 : 180-185.
- 189- Wouda W, Visser IJR, VanKnapen F. Bovine protozoal abortion. *Vet Rec* 1992 ; 132 : 279.
- 190- Yaeger MJ, Shawd-Wessels S, Leslie-Steen P. *Neospora* abortion storm in a Midwestern dairy. *J Vet Diagn Invest* 1994 ; 6 : 506-508.

- 191- Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. *Neospora caninum* : Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). J Parasitol 1996 ; 82 : 272-279.
- 192- Yamane I, Kokuho T, Shimura K, Eto M, Haritani M, Ouchi Y, Sverlow KW, Conrad PA. In vitro isolation of a bovine *Neospora* in Japan. Vet Rec 1996 ; 138 : 632.
- 193- Yamane I, Kokuho T, Shimura K, Eto M, Shibahara T, Haritani M, Ouchi Y, Sverlow K, Conrad PA. In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora species* in Japan. Res Vet Sci 1997 ; 63 : 77-80.

Remerciements

Je remercie mon directeur de maîtrise le Dr Gilles Fecteau qui m'a guidée dans l'élaboration de mon étude et qui a su m'encourager tout au long de mon projet de maîtrise.

Je remercie mon codirecteur de maîtrise le Dr Alain Villeneuve pour m'avoir aidée à élaborer le plan de travail de mon projet et pour son support technique et moral tout au long de l'étude.

Je remercie la Dre Julie Paré qui a été disponible en tout temps pour répondre à mes questions et qui nous a aidés à définir le projet et à élaborer les articles.

Je remercie la Dre Christiane Girard qui nous a été d'une aide importante pour la partie pathologie et qui nous a aidés avec les manipulations et les articles.

Je remercie les Drs Paul Baillargeon, Roger Martineau et John Robinson pour leur contribution et leur expertise pour mon projet de maîtrise et l'élaboration des articles.

Je remercie le Fonds du centenaire pour leur contribution financière aux expériences sur les placentas et les chiens.

Je remercie le laboratoire de parasitologie et en particulier Mme Francine Lavoie pour avoir été patiente avec moi et avoir répondu à mes questions.

Je remercie le personnel des laboratoires du Service de diagnostic de la Faculté de médecine vétérinaire (hématologie et pathologie) pour avoir fait les analyses et répondu à mes questions.

Je remercie le laboratoire Biovet pour l'analyse des sérums et la distribution des placentas et des fœtus.

Je remercie le personnel de l'animalerie de la Faculté de médecine vétérinaire pour leur aide lors des manipulations avec les chiots.

Je remercie le Diagnostic Immunology Laboratory of the Prairie Diagnostic Services pour l'examen d'immunoperoxydase des placentas et des cerveaux des fœtus.

Je remercie les médecins vétérinaires qui ont contribué à l'étude en rendant disponible pour analyse les données de troupeaux, en fournissant des placentas et/ou des fœtus.

Je remercie les secrétaires de ces médecins vétérinaires qui ont bien voulu répondre à mes questions et faire mes messages.

Je remercie les éleveurs qui ont collaboré au projet soit en nous permettant d'utiliser leurs données ou en nous fournissant du matériel infectieux.