

2m11.2809.3

Université de Montréal

La transplantation embryonnaire comme méthode de prévention de la transmission
verticale de *Neospora caninum* chez les bovins

par

Paul Baillargeon

Département des Sciences Cliniques

Faculté de Médecine Vétérinaire

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

Août, 2000

© Paul Baillargeon, 2000



3. 9025 1115

Université de Montréal

La transmission électronique comme méthode de prévention de la fraude
Veuillez lire attentivement les points

SF
607
154
2000
N. 003

Paul Baillargeon
Département des Sciences Cliniques
Faculté de Médecine Vétérinaire

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

AOût 2000

© Paul Baillargeon, 2000



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

La transplantation embryonnaire comme méthode de prévention de la transmission verticale de *Neospora caninum* chez les bovins

Présenté par :
Paul Baillargeon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Émile Bouchard
Dr. Daniel Bousquet
Dr. Gilles Fecteau

Mémoire accepté

Le

Sommaire

Ce mémoire présente les résultats d'une étude prospective qui avait pour but d'évaluer l'efficacité de la transplantation embryonnaire pour la prévention de la transmission verticale de *N. caninum*. L'échantillon était constitué de 88 vaches et taures receveuses provenant de 9 troupeaux différents et de leurs veaux obtenus par transplantation embryonnaire. La procédure expérimentale incluait la détermination du statut sérologique des receveuses ainsi que le lavage et le traitement à la trypsine des embryons viables selon la méthode proposée par l'IETS avant l'implantation.

Trois groupes expérimentaux ont été constitués. Les groupes A et B (receveuses séronégatives) ont été implantés avec, respectivement, des embryons provenant de donneuses séropositives (A) et séronégatives (B). Le groupe C (receveuses séropositives) a été implanté avec des embryons provenant des deux groupes de donneuses. Un échantillon de sang a été prélevé mensuellement de toutes les receveuses gravides. Les échantillons de sang prélevés à la naissance sur les veaux vivants ont été évalués pour la gamma glutamyltransférase (GGT) dans le but de confirmer leur statut pré-colostrale et pour leur ratio S/P d'anticorps contre *N. caninum*. Les tissus prélevés des avortons et des veaux mort-nés ont été examinés à l'histopathologie et par une méthode immunohistochimique (IHC).

Soixante-quatorze veaux ont été échantillonnés à la naissance et 11 fœtus ou veaux mort-nés ont été examinés avec prélèvement de tissus pour analyse. Tous les échantillons des groupes A et B (n=79) étaient négatifs pour les anticorps contre *N. caninum* (n=70) ou à l'examen des tissus (n=9). Cinq veaux du groupe C sont nés avec un statut séropositif et un des deux veaux dont les tissus ont été analysés étaient positifs. Au total 6 des 8 veaux du groupe C ont été considérés infectés à la naissance. La transmission verticale a été significativement inférieure dans les groupes A et B (0%) par rapport au groupe C (75%) ($p < 0,0001$).

La transplantation embryonnaire après le lavage et le traitement à la trypsine des embryons implantés dans des receveuses exemptes de l'infection à *N. caninum* (séronégatives) est une méthode efficace pour prévenir la transmission verticale de *N. caninum*. Les résultats appuient la recommandation de vérifier le statut sérologique pour *N. caninum* de toutes les femelles candidates à l'implantation d'un embryon.

Table des Matières

Identification du jury	I
Sommaire.....	II
Table des matières	III
Liste des tableaux.....	V
Liste des figures.....	VI
Liste des sigles et abréviations	VII
Dédicace.....	VIII
Remerciements.....	IX
Introduction	2
Revue de littérature	4
Le parasite et son cycle de vie	5
Signes cliniques de l'infection.....	7
<i>Neospora caninum</i> et les performances de reproduction.....	8
L'avortement.....	9
Prévalence des avortements à <i>Neospora</i>	10
Physiopathologie	11
Le diagnostic	12
Méthodes sérologiques	12
Séroprévalence	15
Impact économique	17
La transmission horizontale de l'infection.....	18
La transmission verticale de l'infection	20
Le contrôle de la maladie	24
Article scientifique	26
Abstract	27
Introduction.....	29
Material and Methods	30
Sampling	30
Experimental groups	30
Embryo transfer protocol.....	30
Laboratory procedures	32
Statistical analysis.....	33
Results.....	33
Screening results	33
Superovulation and ET results.....	33
Pregnancy results	34
Discussion	35
References	38
Tables	43
I	43
II	44
III	45
Résultats	46
Discussion	60
Prévention de la transmission verticale	60
Interprétation des résultats du test ELISA.....	64
Résultats du transfert d'embryons	66
La participation des producteurs	67

Conclusion	71
Impact de l'étude pour l'industrie	71
Méthode de biosécurité éprouvée	71
Le risque d'introduction par les achats	72
Dépistage de l'infection.....	72
Orientation de la recherche sur <i>Neospora</i>	73
Liste des références	74

Liste des Tableaux

- Tableau I** - Séroprévalence observée pour *N. caninum* dans le monde 16
- Tableau II** - Ratios S/P des tests effectués avant l'implantation, au cours de la gestation et sur leurs veaux pour les 6 receveuses exclues de l'étude parce que leur test de dépistage avant l'implantation les rendaient inéligibles (Groupe E). ... 49
- Tableau III** - Résultats de dépistage sérologique des anticorps contre *N. caninum* (ratio S/P moyen) avant implantation pour 11 troupeaux échantillonnés au début de l'étude et pour 1 troupeau de receveuses achetées sur le marché..... 50
- Tableau IV** - Résultats des implantations et des gestations confirmées au cours de l'étude selon le groupe expérimental des receveuses et selon le statut sérologique de donneuses..... 51
- Tableau V** - Receveuses de l'étude visant à déterminer si la transplantation embryonnaire est efficace pour prévenir de la transmission verticale de *N. caninum* dont le statut a été évalué en fonction des critères d'inclusion définis..... 52

Liste des Figures

Figure 1 - Cycle hypothétique de transmission de <i>N. caninum</i>	6
Figure 2 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 45D du groupe A exclue du calcul de la transmission verticale.....	53
Figure 3 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 135JM du groupe A exclue du calcul de la transmission verticale	54
Figure 4 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 1387-R2 du groupe A exclue du calcul de la transmission verticale.....	55
Figure 5 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 37 du groupe C exclue du calcul de la transmission verticale.	56
Figure 6 - Profil sérologique mensuel moyen avec avec erreur type de la moyenne pour les receveuses gravides des groupe A rassemblées en vue de déterminer si la transplantation embryonnaire est une moyen efficace pour prévenir la transmission verticale de <i>N. caninum</i>	57
Figure 7 - Profil sérologique mensuel moyen avec avec erreur type de la moyenne pour les receveuses gravides du groupe B rassemblées en vue de déterminer si la transplantation embryonnaire est une moyen efficace pour prévenir la transmission verticale de <i>N. caninum</i>	58
Figure 8 - Profil sérologique mensuel moyen avec avec erreur type de la moyenne pour les receveuses gravides du groupe C rassemblées en vue de déterminer si la transplantation embryonnaire est une moyen efficace pour prévenir la transmission verticale de <i>N. caninum</i>	59

Liste des sigles et abréviations

BVD : Bovine Viral Diarrhea

CI ELISA : competition inhibition ELISA

DAT : direct agglutination test

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EL : Embryo loss

ET : Embryo Transfer

GGT : Gamma Glutamyl Transferase

IBR : Infectious Bovine Rhinotracheitis

IETS : International Embryo Transfer Society

IFAT : Indirect Fluorescent Antibody Test

IHC : Immunohistochimie

LEB : Leucose Enzootique Bovine

N. caninum : *Neospora caninum*

OR : Odd Ratio

PCR : Polymerase Chain Reaction

ratio S /P: ratio Sample to Positive

T. gondii : Toxoplasma gondii

Dédicace

Un projet de cette envergure et conduit, par surcroît, à travers les aléas de la pratique ne peut avoir été mené à bien sans l'aide et le support de parents et d'amis. Ma reconnaissance va d'abord à Lucie pour avoir accepté de me laisser plonger dans cette aventure en février 1997. Aux enfants, Julie, Anne, Serge et François pour le support moral et la patience qu'ils ont manifesté sans faillir depuis le début.

Reconnaissance et gratitude à un collègue et ami, Dr Gilles Fecteau pour avoir avivé, au hasard d'une conversation d'octobre 1996, la flamme vacillante d'un vieux rêve de fin d'études. Un merci bien sincère pour avoir exercé son rôle de directeur de maîtrise avec enthousiasme, patience et méticulosité : une contribution à mon projet qui est allé bien souvent au-delà du devoir professionnel.

Merci à la Dre Julie Paré pour l'expertise partagée pendant le projet bien sur, mais aussi pour sa contribution au déroulement de mon projet d'étude à travers toutes ces rencontres imprévues de fin de journée à sa table.

Finalement, un merci sincère aux collègues de la Clinique Vétérinaire St-Louis-Embryobec, les Drs Roger Sauvé, Richard Rémillard, Marc Perras, Marc Lambert, Fernand Dubé, Guy Massicotte et Daniel Boileau pour leur patience au cours de tout le projet d'étude et leur support technique au cours du projet de recherche. Une reconnaissance spéciale au Dr Barry Sutherland pour avoir tracé la voie pour un « vieux collègue » et au Dr Roger Sauvé pour l'enthousiasme et l'énergie manifestés sans défaillance au cours de nos 22 années d'association professionnelle.

Remerciements :

Des remerciements sont adressés à :

- Le Conseil d'Orientation de la Recherche pour les Productions Animales du Québec qui a financé ce projet de recherche.
- Aux 8 éleveurs qui ont participé à ce projet de recherche par leur assistance enthousiaste et précieuse pour les animaux fournis et pour la collecte des échantillons.

Jean-Marie Laurin, Chute à Blondeau, Ont.

Normand Norline, St-Eugène, Ont.

Ferme Lavigne et Frères, Ste-Anne de Prescott, Ont.

Ferme ValBisson, St-Polycarpe, Qc

Ferme André Villeneuve & Fils, Ste-Marthe, Qc

Ferme Monréal, Les Cèdres, Qc

Ferme Andrale, St-Zotique, Qc

Ferme MacDonald, Ste-Anne de Bellevue, Qc

- Au Dr. André Clavet de la Clinique Vétérinaire Témis qui a pris en charge les opérations du 9^e troupeau participant de l'étude.

Introduction

N. caninum a été identifié pour la première fois en 1988 chez le chien¹. Le parasite avait été observé en 1984 chez des chiots ayant développé des signes neurologiques entre l'âge de 2 et 5 mois². À l'examen histopathologique des animaux malades, il avait été confondu avec *Toxoplasma gondii*³. En 1988, le genre *Neospora* est proposé par Dubey pour identifier le parasite observé chez des chiens présentant des signes cliniques et des lésions similaires au cas norvégien¹. La maladie n'était pas nouvelle à l'époque puisque l'infection a été démontrée par une étude rétrospective sur des tissus de chiens morts aux USA en 1957 et 1958³.

La mise au point d'une méthode immunohistochimique plus précise pour l'identification de *N. caninum* dans les tissus infectés a facilité le diagnostic des cas cliniques soumis aux laboratoires de diagnostic⁴⁻⁶. Au Québec, le premier rapport de *N. caninum* date de 1993^a. En 1996, les rapports de diagnostic des laboratoires de pathologie provinciaux et une étude épidémiologique confirment la présence et l'importance de l'infection dans le cheptel québécois⁷.

Les résultats de ces travaux ont éveillé l'intérêt d'un bon nombre de producteurs laitiers et d'éleveurs. La biosécurité dans les élevages, une préoccupation croissante en production bovine à l'instar des autres productions animales, augmentera probablement l'intérêt pour la néosporose au cours des prochaines années.

Les connaissances disponibles actuellement sur le mode de transmission de l'infection permettent d'entrevoir le contrôle effectif de cette infection dans les troupeaux atteints^{8,9}. La majorité des infections surviennent par contamination *in utero* du fœtus^{8,10}. L'infection par l'ingestion de tachyzoïtes a été démontrée expérimentalement et pourrait être un moyen de transmission verticale par le colostrum¹¹. La transmission horizontale, par l'ingestion des oocystes produits par un hôte définitif canidé, n'a été démontrée qu'expérimentalement. Elle semble cependant nécessaire pour l'apparition de nouveaux foyers d'infection⁸. Des données épidémiologiques et des développements récents sur la compréhension du cycle de *N. caninum* supportent l'existence de ce mode de transmission¹²⁻¹⁶.

^a Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation du Québec, (MAPAQ)

Aucun traitement n'a démontré d'efficacité *in vivo* pour traiter l'infection¹ ou prévenir la transmission verticale à ce jour¹⁰. Les travaux sur le potentiel de la vaccination pour prévenir l'infection ou en limiter les conséquences en sont au stade préliminaire¹⁷. La vaccination de souris femelles infectées avec un extrait de tachyzoïtes de *N. caninum* pendant la gestation a semblé protéger complètement les souriceaux contre l'infection *in utero*¹⁸.

Une stratégie de contrôle basée sur la prévention de la transmission verticale par l'élimination des animaux séropositifs permettrait de diminuer rapidement la prévalence de l'infection dans un troupeau atteint^{9,19}. C'est le seul moyen disponible à l'heure actuelle pour prévenir la transmission verticale¹⁰. Cette stratégie tout en étant efficace pour prévenir les nouvelles infections pourrait être difficilement justifiable au point de vue économique pour les troupeaux dont la séroprévalence est élevée⁸. Le contrôle efficace à long terme de l'infection est cependant conditionnel à la prévention de la transmission horizontale⁹.

La transplantation embryonnaire est disponible au Québec, depuis les années 80, par l'entremise des médecins vétérinaires praticiens des animaux de la ferme. Environ 3000 récoltes d'embryons par année, générant à peu près 17000 embryons viables, ont été effectuées au Québec de 1996 à 1999^b.

Le potentiel de la transplantation embryonnaire pour prévenir la transmission des maladies est bien démontré²⁰. La Société internationale de Transfert d'Embryons (IETS) a proposé un protocole de lavage et de traitement des embryons à la trypsine qui permet de prévenir efficacement la transmission de maladies comme la brucellose, la diarrhée virale bovine (BVD), la rhinotrachéite infectieuse bovine (IBR) et le virus de la leucose enzootique bovine²¹.

L'objectif de la présente étude était de démontrer que la transplantation embryonnaire incluant une procédure de lavage et de traitement des embryons à la trypsine telle que proposée par l'IETS et l'implantation dans des receveuses exemptes de l'infection permet de prévenir la transmission verticale de *N. caninum*.

^b Sommaire des activités de la Canadian Embryo Transfer Society pour 1998, préparé par Dr. Reuben Mapletoft, Université de Saskatchewan.

Revue de littérature

Jusqu'en 1988, *N. caninum* était confondu avec *Toxoplasma gondii*⁸. L'histoire de ce parasite commence en Norvège avec la description de lésions cérébrales et musculaires causées par un parasite semblable à *T. gondii* chez des chiots Boxer qui avaient présenté des anomalies cliniques d'ordre neurologique entre l'âge de 2 et 6 mois. Le caractère inhabituel du cas provenait de l'absence d'anticorps contre *T. gondii* chez les chiots et de l'impossibilité d'infecter des souris et d'y retrouver le parasite avec les tissus présentant les lésions². En 1988, sur la base de différences structurelles à la microscopie électronique, le genre *Neospora* fut proposé pour le parasite observé sur 10 chiens aux USA qui avaient présenté des signes cliniques similaires aux chiens norvégiens¹.

Le développement d'un test immunohistochimique permettant la coloration spécifique de *N. caninum* dans les tissus a facilité le diagnostic de l'infection chez les animaux⁴. L'avènement de ce test a permis, entre autres, de démontrer que le parasite observé en 1984 en Norvège était bien *N. caninum*²². L'examen des tissus de chiens morts en 1957 et 1958 avec cette méthode démontra rétrospectivement que la néosporose n'était pas une nouvelle maladie³.

L'identité du *Neospora* isolé chez les bovins a soulevé des questions parmi les experts, certains préférant s'en tenir à l'identification *Neospora* sp malgré les similitudes observées avec les cas observés chez les chiens²³. Dubey, dans sa revue de 1996, estime que les différences observées entre les isolats canins et bovins ne sont pas plus grandes que celles observées entre les familles d'autres espèces et que *N. caninum* est l'organisme en cause pour les 2 espèces²⁴.

Des problèmes neuromoteurs chez des veaux naissants avaient été associés à la présence d'un protozoaire dans le système nerveux central dès 1987²⁵ et ont été reliés à *N. caninum* en 1989 à l'aide du test IHC²⁶. En 1988, *N. caninum* a été identifié comme la cause d'une épidémie d'avortements dans un troupeau de 240 vaches au Nouveau-Mexique où 29 avortements furent observés sur une période de 5 mois⁵. Au même moment, la réévaluation des lésions histopathologiques d'un fœtus provenant de l'État de Washington, soumis au laboratoire de l'Université d'Illinois en 1982, suggérait une infection à *Neospora*⁶. Toujours de façon rétrospective, des parasites,

structurellement et antigéniquement semblables à *N. caninum*, étaient retrouvés dans les tissus de 4 veaux naissants paralysés, provenant de 4 troupeaux différents de l'État de Washington et dont on avait décrit les lésions histopathologiques en 1987^{27,28}.

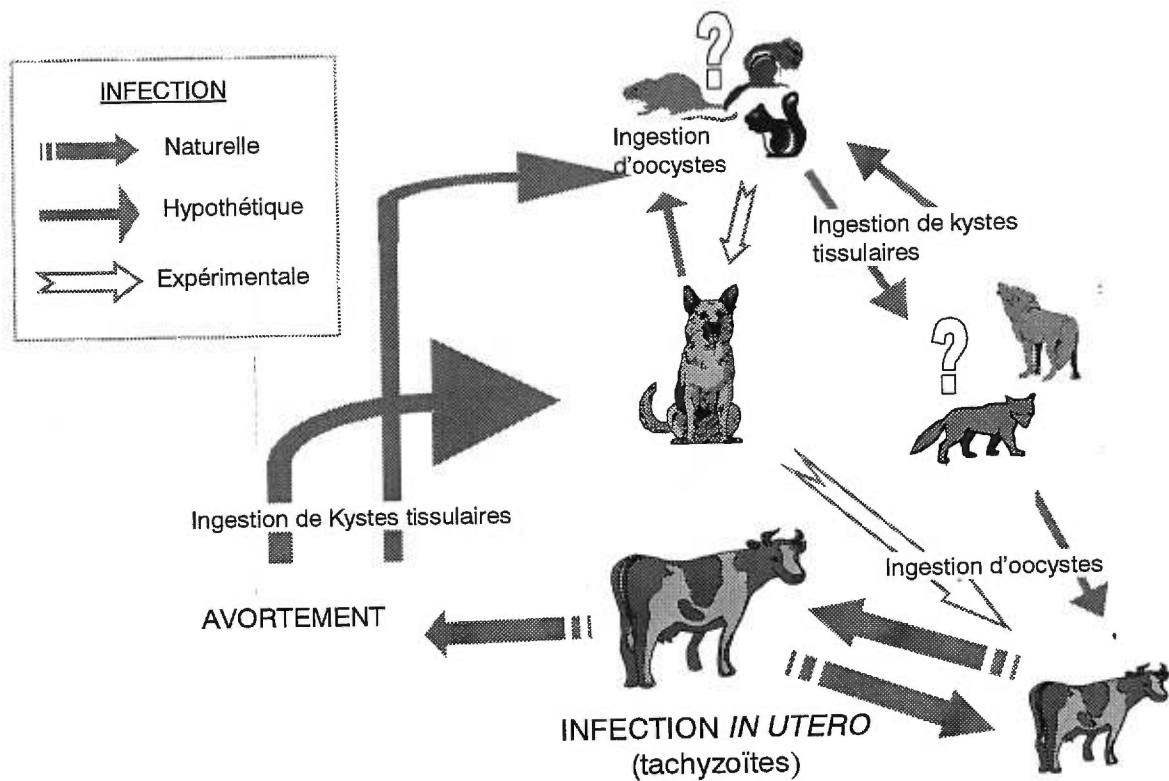
Par la suite, de nombreux rapports partout dans le monde ont identifié *N. caninum* : Afrique du Sud²⁹, Angleterre³⁰, Argentine³¹, Australie³²⁻³⁴, Brésil³⁵, Canada^{36,37}, Danemark³¹, Etats-Unis⁵, Israël³⁸, Nouvelle-Zélande³⁹, Hollande⁴⁰, Suède⁴¹, Japon⁴² et au Zimbabwe⁴³. L'infection constituait une cause importante d'avortements lors de l'analyse rétrospective des avortons soumis aux laboratoires de diagnostic dans la plupart de ces pays^{39,40,44,45}. Par contre, en Afrique du Sud, la néosporose n'était la cause que de 2 des 144 avortements soumis à un laboratoire de diagnostic entre 1991 et 1993⁴⁶. De plus, en Suède, des données séroépidémiologiques ont montré que seulement 7% des vaches ayant déjà avorté avait des anticorps contre *N. caninum*⁴⁷.

Le parasite et son cycle de vie

Le cycle de vie de *N. caninum*, pour ce qu'on en connaît, est classique du cycle « Proie-Prédateur » des protozoaires apparentés *Toxoplasma* et *Hammondia*, du phylum *Apicomplexa*. La figure 1 (page 6), illustre le cycle de *N. caninum* en distinguant les éléments connus du cycle et les éléments qui sont présumés sans avoir encore été démontrés. Comme pour les protozoaires apparentés, des oocystes sont présents dans les fèces d'un hôte définitif carnivore qui s'est lui-même infecté en ingérant les tissus infectés d'un hôte intermédiaire. L'hôte intermédiaire est devenu infecté par l'ingestion des oocystes provenant de l'hôte définitif présumé (chien et autres canidés sauvages) et permet la reproduction asexuée du parasite dans ses tissus⁴⁸.

Le cycle complet de *N. caninum* demeure encore inconnu. Les formes qui ont été identifiées dès le début sont le tachyzoïte et le bradyzoïte enkysté qui constituent les stades de reproduction asexuée du parasite^{3,49}. Les tachyzoïtes présents dans la plupart des tissus des animaux infectés, sont responsables des lésions histopathologiques⁵⁰. Ils se multiplient rapidement et causent la mort des cellules infectées³. Les kystes tissulaires, contenant les bradyzoïtes, sont retrouvés presque exclusivement dans le système nerveux, habituellement en petit nombre³. Leur présence ne cause pas de réaction inflammatoire la plupart du temps⁵⁰. Contrairement aux tachyzoïtes, les kystes

Figure 1 - Cycle hypothétique de transmission de *N. caninum*



*Adapté de N. Bergeron*¹²

sont résistants aux acides gastriques⁵¹ et sont capables de causer l'infection chez des souris⁵² et des chats⁵³.

Récemment, des oocystes ont été démontrés dans les fèces de chiots suite à leur infection expérimentale par l'ingestion de tissus murins infectés¹⁵. La découverte a été confirmée l'année suivante, en utilisant la même méthode d'infection expérimentale, par les travaux de Lindsay qui a infecté par voie orale 2 chiens avec des tissus provenant de souris infectées¹⁶. Dans cette étude, seul le chien ayant reçu de la prednisolone avant l'ingestion des tissus infectés a séroconverti. Les 2 chiens ont cependant rejeté

des oocystes de *N. caninum* qui ont sporulé et démontré leur capacité d'infecter par l'inoculation de souris. Le chien et probablement d'autres canidés comme le coyote sont maintenant reconnus comme les hôtes définitifs de *N. caninum*^{10,48}. Jusqu'à maintenant par contre, les oocystes n'ont pu être démontrés chez les chats et les souris infectés expérimentalement avec la même procédure^{54,55}.

La source de contamination naturelle par *N. caninum* de l'hôte définitif n'a cependant pas encore été déterminée. La présence de bradyzoïtes enkystés dans les tissus infectés est une condition essentielle pour l'infection de l'hôte définitif. Les chiens, identifiés épidémiologiquement comme facteurs de risque de l'infection dans les troupeaux laitiers^{7,56}, s'infecteraient à partir des tissus fœtaux et des placentas infectés présents sur les fermes. Des données sérologiques ont démontré que des chiens nourris avec des carcasses de veaux⁴⁸ ou vivant en milieu rural⁵⁷ sont en plus grande proportion séropositifs contre *N. caninum*. Ces données sont un indice épidémiologique supplémentaire de leur contribution à la propagation du parasite.

Cependant des travaux récents visant à infecter des chiots à partir de tissus fœtaux et placentaires infectés naturellement, telle que démontrée par la présence de bradyzoïtes enkystés, n'ont pas conduit à l'observation d'oocystes fécaux, à la séroconversion, ou à la présence de lésions histopathologiques chez les animaux étudiés⁵⁸. La démonstration que le chien ou d'autres canidés sauvages sont les hôtes définitifs naturels de *Neospora caninum* n'a donc pas encore été faite.

Signes cliniques de l'infection

Les signes cliniques de l'infection à *Neospora* chez les bovins sont reliés exclusivement aux systèmes nerveux et reproducteurs. L'infection a été associée à des problèmes musculaires et à la mortinatalité chez des veaux naissants infectés *in utero*^{25,32,59}. Les veaux infectés présentant ces anomalies cliniques sont sous-développés ou incapables de se lever²⁴. Les signes neurologiques rapportés sont le plus souvent présents à la naissance. Cependant, la littérature rapporte le cas d'un veau né cliniquement normal ayant développé des signes neurologiques après l'âge de 2 semaines⁶⁰. Les anomalies rapportées sont l'ataxie, une diminution du réflexe patellaire et la perte de proprioception affectant plus sévèrement les membres postérieurs²⁸. Certains veaux présentent de l'exophtalmie, du strabisme ventro-médial ou des anomalies musculosquelettiques (contractions spastiques, difformités, incoordination) affectant les

membres antérieurs et postérieurs⁶¹⁻⁶³. Dans le seul cas documenté où les anomalies sont apparues après la naissance, les signes cliniques ont progressé des membres antérieurs aux membres postérieurs⁶⁰.

La littérature ne mentionne pas quelle proportion des veaux infectés congénitalement sont susceptibles de présenter les signes cliniques décrits. Compte tenu du risque élevé (80%) de transmission *in utero*, chez les veaux issus de mères infectées et de la séroprévalence élevée qui a été observée dans certains troupeaux, la proportion de veaux présentant des signes cliniques (11 veaux rapportés dans 8 rapport de cas) semble faible^{24,64,65}.

***Neospora caninum* et les performances de reproduction**

L'influence de l'infection à *N. caninum* sur les performances de reproduction a été évaluée par des indicateurs comme le nombre d'inséminations par conception ou le taux de réforme pour infertilité⁶⁶⁻⁶⁸. Les conclusions de ces études sont partagées. Au moins deux études n'ont pas observé de relation entre le statut sérologique et les deux paramètres évalués^{66,68}. L'étude de Stenlund *et al*, quant à elle, a montré une différence significative (1,7 vs 2,2) entre le nombre d'inséminations par conception pour la 1^{ère} et à la 2^e gestation des femelles observées⁶⁷. Les animaux étudiés dans cette étude étaient tous séropositifs et la différence observée a été obtenue en comparant les performances de reproduction avant et après la 1^{ère} gestation. Les auteurs, en s'appuyant sur cette observation ont conclu que d'autres effets que l'avortement et la mortinatalité pourraient découler de l'infection à *Neospora*⁶⁷. Une conclusion fragile compte tenu de l'ensemble des facteurs de risque liés à la régie et à la santé des animaux qui peuvent influencer les performances de reproduction chez les bovins laitiers de cet âge.

Le risque de réforme pour infertilité pour 8 troupeaux vaches-veaux de l'Alberta (419 vaches) avec une séroprévalence de 30%, était plus élevé de façon significative chez les séropositives (OR=2,5)⁶⁹. Cette étude était prospective sur une période de 4 années d'observations et les auteurs concluaient que la néosporose doit être évaluée comme cause potentielle de pertes économiques dans les troupeaux vaches-veaux. Même si la démonstration de l'infection à *Neospora* comme cause de diminution des performances de reproduction dans ces troupeaux n'a pas été faite dans cette étude, les résultats

obtenus laissent entrevoir le rôle potentiellement négatif de cette infection sur la reproduction des bovins.

L'avortement

L'avortement est le seul signe clinique identifié jusqu'à maintenant chez les animaux adultes infectés par *N. caninum*¹⁰. Il peut survenir chez des femelles de tout âge après le 3^e mois de gestation^{8,50} mais le plus souvent (60%) entre le 5^e et le 6^e mois de gestation²⁴. Les vaches ne démontrent pas de signes cliniques particuliers avant l'avortement et le placenta n'est pas retenu⁷⁰. Les avortons sont partiellement autolysés et parfois momifiés^{5,39,71,72}. Ils ne présentent pas de lésions macroscopiques distinctes⁷³. Les lésions microscopiques sont retrouvées le plus souvent dans le cerveau, la moelle épinière, le cœur et occasionnellement dans les poumons et les reins⁵⁰.

L'avortement est assurément la condition la plus importante affectant les performances de reproduction des vaches infectées par *N. caninum*⁷³. Il survient le plus souvent de façon sporadique mais peut occasionnellement survenir de façon épidémique sur une période de quelques semaines. Les avortements surviennent tout au cours de l'année et peuvent n'impliquer que quelques vaches ou jusqu'à 30% des vaches d'un troupeau¹⁰. Des avortements à répétition ont aussi été rapportés⁷⁴⁻⁷⁶. L'incidence des avortements à répétition associés à *Neospora*, estimée à partir des observations de Anderson *et al* sur 112 vaches⁷⁵ et de Moen *et al* sur 125 avortements⁷⁷, serait cependant inférieure à 5 %.

Il a été démontré que les vaches qui ont des anticorps contre *N. caninum* sont plus à risque d'avorter que les séronégatives⁸. Le risque d'avorter, pour les animaux infectés congénitalement, est augmenté d'environ 3 fois pour la plupart des études ayant étudié le phénomène^{66,78-80}. Cependant, dans une étude californienne, le risque d'avorter a été estimé à 7,4 fois plus grand que celui des séronégatives pour la 1^{ère} gestation, à 1,7 fois pour la 1^{ère} gestation de la 1^{ère} lactation et à 5.6 fois pour la 1^{ère} gestation survenant au cours de la 2^e lactation⁷⁶. Ces valeurs élevées ont aussi été observées dans un troupeau vaches-veaux de l'Alberta où le risque d'avorter des séropositives de tout âge a été évalué à 5,7 fois plus que celui des séronégatives⁶⁹.

Prévalence des avortements à *Neospora*

Dès 1990, un protozoaire ressemblant à *T. gondii* a été rapporté comme une cause majeure d'avortement en Californie: 18% des 445 fœtus soumis de 1987 à 1989 au réseau de laboratoires de diagnostic de Californie (CVDLS) présentaient les lésions histopathologiques caractéristiques de l'infection à *N. caninum*⁷². À cette époque, l'utilisation d'un test immunohistochimique décrit par Lindsay *et al*⁴ a permis de confirmer la présence de *N. caninum* dans 19% des 391 fœtus soumis au Laboratoire de Tulare de 1985 à 1989. L'utilisation de cette méthode permettait de parvenir à un diagnostic définitif dans 43% des cas d'avortements soumis à ce laboratoire par rapport à 29% par analyse histopathologique^{81,82}.

Ces études ont aussi permis de confirmer que l'infection était une cause majeure d'avortement bien avant sa première identification⁸³. Anderson *et al*, toujours en Californie, ont examiné tous les avortons (n=266) récupérés dans 26 troupeaux comprenant 19 708 vaches pour une année complète⁷⁵. Dans cette étude, 12 des 26 troupeaux n'avaient pas d'histoire d'avortement à *Neospora*. Les auteurs ont noté que 87,2% de tous les fœtus soumis provenaient des 14 troupeaux où *N. caninum* avaient déjà causé des avortements avant l'étude. *N. caninum* a été diagnostiqué dans 43,5% des avortements de ces 14 troupeaux. Dans un contexte différent mais avec une méthodologie similaire, une étude en Pensylvanie a par contre constaté que moins de 5% de 688 avortons soumis aux laboratoires de diagnostic entre 1994 et 1996, présentaient les lésions histopathologiques caractéristiques de *N. caninum*⁸⁴.

Des rapports confirmèrent par la suite, ailleurs dans le monde et par des méthodes d'investigation similaires, l'importance de *N. caninum* comme cause d'avortement. Au Danemark et en Angleterre par l'évaluation histopathologique et immunohistochimique des tissus foetaux, 10% des avortements étaient causés par *N. caninum*^{45,85} tandis qu'en Nouvelle-Zélande ce taux s'élevait à 28%³⁹. En Hollande, 17% des 3 184 avortons analysés au cours des années 92 et 94 présentaient les lésions histopathologiques de *N. caninum*⁸⁶. Au Québec, en 1996, 11,4% des cas d'avortement soumis aux laboratoires de pathologie provinciaux étaient causés par *N. caninum*^c. En Écosse, 16% des 547 fœtus examinés présentaient des anticorps anti-*N. caninum*, une

^c Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ)

preuve indirecte de la présence de l'infection⁶⁷. En Afrique du Sud cependant, seulement 1,3% de 144 cas d'avortements ont été diagnostiqués à *N. caninum*²⁹.

En résumé, selon Dubey, les données les plus fiables provenant de Californie et de Hollande permettent d'estimer que *N. caninum* est responsable de 20% à 30% des avortements observés chez les bovins⁸.

Physiopathologie

Les mécanismes de l'infection *in utero* par *N. caninum* ne sont pas encore connus. Il n'a pas été établi hors de tout doute si l'infection fœtale survient suite à une réactivation d'une infection latente ou s'il faut une nouvelle infection de la mère pour que la transmission survienne ou même si les 2 éventualités seraient possibles⁸. Plusieurs experts proposent le scénario de la réactivation d'une infection latente acquise avant la naissance de la mère pour expliquer la transmission *in utero* de *N. caninum*^{64,67,70}. Stenlund *et al* en particulier, après avoir analysé la dynamique des anticorps chez 18 vaches infectées naturellement au cours de 2 gestations consécutives, concluent que le comportement sérologique répétitif observé suggère une réactivation du parasite à la mi-gestation plutôt qu'une réinfection⁶⁷. Une élévation graduelle du titre d'anticorps à partir du 3^e mois de gestation combinée à une concentration élevée d'anticorps en fin de gestation permet de prédire le risque de transmission *in utero* chez des animaux infectés naturellement⁸⁸. La variation d'anticorps observée chez la mère en cours de gestation pourrait être en réaction à la prolifération de tachyzoïtes réactivés par un mécanisme relié à la gestation ou à l'infection en cours dans le fœtus⁸⁹. Il a été démontré que la variation du titre d'anticorps de la mère au cours de la gestation influence le moment de l'infection du fœtus et le risque d'avortement⁸⁸ ainsi que la distribution et le type de lésions³. On a aussi observé que plus l'infection est hâtive, plus le risque de mortalité fœtale et d'avortement est élevé²⁴. Les infections tardives, survenant au moment où le fœtus est devenu immunocompétent, résultent en infections congénitales chez des veaux cliniquement sains^{24,90}.

La transmission de *N. caninum in utero* n'entraîne donc pas nécessairement la mort du fœtus et génère plutôt un veau infecté et asymptomatique⁶⁵. La majorité de ces veaux présentent un titre pré-colostral élevé d'anticorps contre *N. caninum* permettant de les identifier de façon précoce^{65,70}. La morbidité et la mortalité de ces veaux ne sont pas nécessairement affectés: le taux de survie à 90 jours étant même plus élevé chez les

séropositifs à la naissance⁶⁵. Par contre, une étude suédoise a rapporté des résultats différents sur cette question en examinant les dossiers d'un troupeau dont la prévalence était de 29% au moment de l'étude⁶⁸. Les chercheurs ont observé un taux de mortalité de 7% sur une quinzaine d'années et ont conclu que cette valeur était plus élevée que la valeur de référence (2 à 5%) qu'ils utilisaient⁶⁸. L'étude, d'une part, n'a pas déterminé si une différence existait entre les veaux provenant des lignées infectées et ceux provenant des lignées saines. D'autre part, les auteurs ont inclus de façon surprenante dans leur définition de « mortalité » les avortements, les momifications fœtales et les mortinatalités survenus au cours de l'étude.

Le diagnostic

L'isolement en cultures tissulaires permet de reconnaître formellement la présence du parasite pour fin de recherche mais constitue une technique trop peu sensible, compte tenu du fait que les tachyzoïtes meurent avec l'autolyse des tissus⁸. Elle est de plus trop onéreuse et complexe pour le diagnostic clinique. Les lésions microscopiques entourant les tachyzoïtes présents dans les tissus infectés, principalement le cerveau, le cœur et le foie ont constitué la première méthode diagnostic disponible⁸. La lésion caractéristique chez les bovins est une encéphalomyélite multifocale non suppurative caractérisée par de la nécrose et de l'infiltration de cellules mononucléaires³. Le développement d'une méthode de coloration immunohistochimique a permis de faciliter la détection des tachyzoïtes et leur différenciation d'avec *T. gondii*^{4,91}. L'examen du fœtus demeure toujours nécessaire pour parvenir à un diagnostic définitif d'avortement à *N. caninum*⁸. Le diagnostic étiologique de ces avortements est basé sur la présence du parasite et des lésions caractéristiques décrites⁸. La plupart des rapports de cas publiés ont été diagnostiqués sur la base de cette définition. Le diagnostic sérologique par fluorescence indirecte (IFAT) des liquides fœtaux est un bon complément aux méthodes d'examen tissulaires chez les avortons mais il ne permet pas d'exclure *N. caninum* lors de résultat négatif⁹².

Méthodes sérologiques

Deux études ont revu récemment les différentes méthodes sérologiques disponibles pour le diagnostic de la néosporose^{93,94}. Le premier test de dépistage sérologique développé en 1988 a été le test de fluorescence indirecte (IFAT) permettant de détecter les anticorps contre les tachyzoïtes de *N. caninum*⁹⁵. Ce test identifie principalement les

antigènes de surface de la cellule de *N. caninum* qui sont considérés plus spécifiques que les composantes intracellulaires pour cette classe de parasites⁹³. À faible niveau d'anticorps, la fluorescence partielle des tachyzoïtes peut être confondue avec une réaction croisée pour *T. gondii*. Le IFAT est, encore aujourd'hui, un test de référence auquel les autres tests sont comparés^{93,94}. Les seuils d'interprétation pour un test positif varient d'un laboratoire à l'autre et vont de 1 :160 à 1 :640 pour les bovins. Le IFAT possède une grande spécificité et une sensibilité de 79% pour le diagnostic de l'infection à *N. caninum* chez les fœtus de plus de 6 mois⁹⁶. À cause du caractère subjectif de l'interprétation des résultats (la fluorescence observée devant impliquer toute la surface des tachyzoïtes pour un test positif) et parce que la technologie ELISA se prête mieux à l'automatisation nécessaire pour l'analyse de grandes quantités d'échantillons, celle-ci est devenue la plus utilisée au cours des dernières années⁹³. Un test d'agglutination directe (DAT) a été décrit en 1998 et est commercialement disponible^{97,98}. Le principe de ce test, utilisé dans le dépistage de *T. gondii*, est que des tachyzoïtes intacts préservés dans la formaline s'agglutinent en présence d'anticorps spécifiques. Il présente l'avantage de ne pas nécessiter l'utilisation d'anticorps conjugués spécifiques de l'espèce testée et de présenter une sensibilité et une spécificité comparable au IFAT qu'il pourrait éventuellement remplacer si les tests de validation supportent les résultats déjà disponibles⁹³.

Plusieurs versions du test ELISA ont été décrites et validées⁹⁹⁻¹⁰⁴. L'utilisation de préparations antigéniques constituées surtout de constituants intracellulaires diminuait, à l'origine, la sensibilité et la spécificité du test. Le développement de techniques utilisant des tachyzoïtes entiers ou, plus récemment, des antigènes de surface de type recombinant ou des antigènes sélectionnés immunologiquement a permis d'augmenter les performances de cette technique sérologique. Björkman et al et Atkinson et al listent les différentes catégories de tests ELISAs qui ont été développés. Les ELISAs rapportés sont :

1. Competition Inhibition (CI ELISA) : des anticorps d'origine murine compétitionnent avec les anticorps du sérum testé pour un antigène de surface de *N. caninum*. Le résultat est exprimé en pourcentage d'inhibition par le sérum testé et 58% est considéré comme un test positif. La sensibilité et la spécificité de ce test ne sont pas documentées.

2. Les ELISAs utilisant un antigène soluble (Crude antigen ELISAs) : Le test utilisé pour cette étude appartient à ce groupe¹⁰¹. La préparation antigénique est un mélange d'antigènes de surface et intracellulaires et procure une spécificité élevée (97% à 100%) à ces tests. La sensibilité rapportée pour cette catégorie d'ELISAs est de 87% à 92%^{101,105-107}. Ces ELISAs ont été les plus utilisés dans les enquêtes séroépidémiologiques^{76,107-110}.
3. Tachyzoïtes préservés ELISAs (Mastazyme-Neospora): des tachyzoïtes entiers et préservés de *N. caninum* (origine canine) sont utilisés comme antigènes. Les anticorps des sérums testés n'ont ainsi accès qu'à des antigènes de surface. La sensibilité et la spécificité rapportées sont de 95% et de 96%.
4. Immunostimulatory complex (Iscom) ELISA : une méthode qui permet de sélectionner les antigènes d'origine membranaires. La sensibilité et la spécificité rapportée sont de 100% et 96% respectivement. Une application de ce test a été développée pour la détection d'anticorps anti-*Neospora* dans le lait¹¹¹. Une modification de cette technique ELISA a été développée (IgG avidity assay) pour permettre de distinguer les infections chroniques et aiguës par *N. caninum*¹¹². Ce test s'appuie sur le fait que les anticorps apparus au début de l'infection ont moins d'affinité pour les antigènes de *N. caninum* que les anticorps produits par la suite.
5. ELISAs utilisant des antigènes recombinants : la recherche de clones produisant des protéines avec un potentiel pour la vaccination ou le diagnostic sérologique de *N. caninum* a permis de produire des ELISAs avec une sensibilité supérieure aux tests utilisant des extraits solubles.

Les tests ELISAs ont en général une bonne concordance pour distinguer les sérums positifs et négatifs pour *N. caninum*. Dans la plupart des études cependant, une faible proportion des sérums étaient négatifs⁹³. Atkinson *et al* signale que tous les ELISAs fonctionnent bien lorsque les niveaux d'Ac sont élevés. A faible niveau d'Ac, les résultats sont plus variables et des contradictions entre les tests peuvent même être observées⁹⁴. Il est donc important de sélectionner des seuils d'interprétation appropriés pour chaque test et en fonction de l'application du test utilisé. Dans une enquête épidémiologique, par exemple, on pourrait préférer une sensibilité élevée (en abaissant le seuil d'interprétation) alors que dans le cas d'un diagnostic d'avortement, on

sélectionnerait une spécificité élevée (en élevant le seuil) pour éliminer les réactions de fond non associées causalement avec l'avortement.

Les méthodes sérologiques ont permis d'accumuler au cours des dernières années une somme importante de connaissances concernant l'épidémiologie de *N. caninum*. Leur validité est plus grande pour l'interprétation de résultats de groupes et diminue lors d'interprétation de résultats individuels. La comparaison entre les tests des résultats obtenus est difficile et un problème de la sérologie pour *N. caninum* est qu'aucun test n'a obtenu de reconnaissance universelle dans la communauté scientifique⁹³. Björkman *et al* suggèrent ainsi l'établissement de laboratoires de référence disposant d'une banque de serum positifs et négatifs bien caractérisés pour parvenir à la standardisation du diagnostic sérologique de *N. caninum*.

Le développement de plusieurs méthodes de reconnaissance de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR) de *N. caninum* a permis d'augmenter la sensibilité des tests de dépistage de ce protozoaire dans les tissus infectés¹¹³. Ces méthodes attendent toutefois d'être validées pour le diagnostic des avortements à *N. caninum*⁸.

Séroprévalence

L'apparition des trousse de dépistage par méthode ELISA a permis de vérifier à grande échelle la prévalence des anticorps contre *N. caninum*. En général, elle est plus grande dans les élevages laitiers que dans les élevages de boucherie^{110,114}. Cette disparité pourrait être reliée au type de régie alimentaire, en particulier à l'entreposage et à la préparation des aliments, et à la densité des populations liée au confinement qui caractérisent les troupeaux laitiers^{73,89}. Par exemple, une étude de séroprévalence parmi des troupeaux vaches-veaux en Espagne a démontré que la séroprévalence augmentait avec la taille des troupeaux¹¹⁴. Klein *et al* en France ont observé dans leur étude de séroprévalence que les élevages de grande taille et de niveau génétique supérieur étaient plus souvent infectés¹¹⁰. La relation avec les pratiques de régie intensive (densité animale élevée, alimentation avec des aliments entreposés) qui augmenteraient le risque de contamination ressemble au comportement épidémiologique de *T. gondii* dans les troupeaux de moutons de grande taille⁷³. Le tableau I présente les séroprévalences observées dans différentes parties du monde.

Tableau I - Séroprévalence observée pour *N. caninum* dans le monde

Séroprévalence	Nombre d'animaux	Endroit	Référence
39%	10280	Hollande	19
35.9%	1287	Espagne	114
30.6%	889	Espagne	79
19.2%	2594	Maritimes, Canada	115
17.3%	4295	Angleterre	116
16.6%	3059	Québec	7
16%	1561	Danemark	66
14%	447	Brésil	35
13%	1051	Angleterre	78
13%	1515	Danemark	80
11.5%	1689	Suède	108
9.4%	489	Irlande	117
5.6%	1924	France (Orne)	118
2%	780	Suède	47

Plusieurs études ont démontré que, dans les troupeaux étudiés, la prévalence variait avec le taux d'avortements causés par *N. caninum*. Au Québec, par exemple, la prévalence passait de 22,5% à 7,3% lorsque les troupeaux étaient catégorisés selon la présence ou l'absence d'avortements diagnostiqués à *Neospora*⁷. Un écart semblable a été observé en Angleterre (6% vs 18%)⁷⁸ et en Hollande (13,9% vs 51,5%)¹⁹. Au

Danemark dans une étude sur 31 troupeaux, la moitié des 16 troupeaux sans avortements ne comportait aucun réacteur⁶⁶.

La proportion de troupeaux infectés est importante dans la plupart des études de séroprévalence. Elle était de 74% au Danemark⁶⁶, de 64% en France¹¹⁸ et de 83% en Espagne¹¹⁴. Au Québec, Paré *et al* ont estimé que 73% des troupeaux ont au moins 1 animal présentant des anticorps contre *N. caninum*⁷.

Impact économique

Une revue des éléments à considérer pour l'évaluation de l'impact économique de la néosporose a été publiée en 1999¹¹⁹. Les avortements sont la conséquence la plus importante de cette infection et sont responsables d'une portion significative de l'impact économique de *N. caninum*⁸. On estime que le coût de chaque avortement survenant à la mi-gestation est de 600\$ à 1000\$ US¹²⁰. La valeur du fœtus, les conséquences sur la lactation, le coût additionnel de la reproduction et le coût du remplacement y sont directement reliés¹⁰.

Cependant d'autres conséquences de l'infection, pourraient augmenter de façon significative l'impact économique de *N. caninum*. Les mortinatalités, la mortalité néonatale, les pertes embryonnaires, la diminution de production lactée et la valeur réduite des animaux d'élevage sont des conséquences qui ont été reliées à l'infection à *Neospora*¹¹⁹. Dans un troupeau californien de 442 vaches dont la séroprévalence était de 36%, les séropositives ont produit environ 1 kg de lait (1,6 kg de lait corrigé pour le gras) de moins. Par contre, une enquête récente dans les Provinces Maritimes du Canada n'a pu démontrer d'effet négatif sur la production laitière chez les séropositives¹¹⁵. Dans le groupe de vaches que Thurmond *et al* ont étudié, la séropositivité a augmenté de 1,6 fois le risque de réforme (en corrigeant pour le risque d'être réformée lié à l'avortement) et les vaches séropositives réformées ont été éliminées du troupeau 6,3 mois plus tôt que les séronégatives¹²¹.

Des études épidémiologiques sur des bases de données comme celle de l'ASTLQ comprenant des informations sur le statut des animaux, leur performances de santé, de reproduction et de production permettront de quantifier l'importance des conséquences potentielles de l'infection à *N. caninum*. Il n'est pas possible d'évaluer l'importance économique de *N. caninum* à partir de la seule prévalence de l'infection dans la

population ou parmi les avortons à cause de la variabilité observée dans les pertes reliée à l'infection¹¹⁹. Une étude récente, basée sur une modélisation informatisée, a prédit des pertes reliées l'infection à *N. caninum* de l'ordre de 15\$ à 24\$ millions pour l'industrie du bœuf du Texas¹²².

La transmission horizontale de l'infection

La confirmation récente du rôle du chien comme hôte définitif de *N. caninum*^{15,16} et l'infection expérimentale de veaux par l'ingestion d'oocystes¹²³ supportent la possibilité de la transmission horizontale de cette infection. Jusqu'à maintenant, ce mode de transmission n'a pas été démontré dans des conditions naturelles¹²⁴. Cependant, plusieurs rapports scientifiques ont conclu à la présence de la transmission horizontale^{12-14,19,125,126}. Le premier rapport, documentant une épidémie d'avortements dans un troupeau du Midwest américain, s'appuie sur une preuve circonstancielle: la contamination possible d'un supplément (tourteau de coton) entreposé sans protection dans les 2 mois précédant l'épisode est incriminée. La période de 60 jours, selon les auteurs, correspond à la période d'incubation qui a été observée dans les infections expérimentales. La séroprévalence dans le troupeau n'est pas documentée et l'auteur conclue, sans démontrer la contamination fécale de l'aliment, à une infection récente¹²⁵.

Le deuxième rapport s'appuie sur une analyse de la courbe épidémique des avortements observés¹²⁶. La répartition hebdomadaire du pourcentage d'avortement des 360 vaches (66 avortements observés au cours des 60 premiers jours de l'épisode) du troupeau étudié montre une augmentation soudaine et importante suivie d'une diminution graduelle après la 3^e semaine jusqu'à la 6^e semaine. La déviation à droite de la courbe graphique des avortements est fortement suggestive, selon les chercheurs, d'une exposition à une source d'infection isolée. Cependant, les analyses sérologiques effectuées dans ce troupeau sur 74 vaches dont 25 avaient avorté, montraient que 34 des 49 vaches (69%) qui n'avaient pas avorté avaient un titre IFAT égal ou supérieur à 1:640, considéré comme positif⁶. De plus 8 avortements étaient survenus dans le troupeau de remplacement 3 à 4 mois avant l'épisode observés chez les vaches. Ces observations pouvaient être un indice de la présence de l'infection avant les avortements et cela n'a pas été noté par les auteurs.

En Hollande, en analysant la relation entre la séroprévalence et l'âge dans 50 troupeaux où des avortements à caractère épidémique avaient été causés par *N.*

caninum, Wouda a conclu que seulement 6 troupeaux présentaient l'évidence de transmission horizontale en s'appuyant sur l'augmentation significative de la séroprévalence avec l'âge¹⁹. Pour tous les autres troupeaux où la séroprévalence observée ne variait pas selon l'âge, les auteurs concluent que l'épidémie d'avortements observée pourrait avoir été causée par des facteurs causant la recrudescence d'infections latentes plutôt que par l'acquisition de nouvelles infections. Cette conclusion pourrait aussi être considérée pour l'épisode que McAllister *et al* ont décrit précédemment.

Les taux de transmission horizontale documentés jusqu'à maintenant sont faibles^{13,14}. Deux études prospectives, avec échantillonnage précolostral, ont obtenu des taux de séroconversion post-natale similaires. Davison *et al* en Angleterre ont observé 1,9 cas de séroconversion par 100 animaux à risque par année dans 6 troupeaux dont la prévalence variait de 7% à 38%¹³. Hietala *et al* ont observé dans 2 troupeaux californiens à prévalence élevée (36% et 58%), moins de 1 cas de séroconversion par 100 animaux adultes à risque par année¹⁴ et de 2 à 4% des animaux à risque entre la naissance et le 1^{er} vêlage⁸⁹. On doit noter, en ce qui concerne le taux de transmission horizontale plus élevé observé chez les jeunes, qu'une majorité des séroconversions néonatales observées (13/17) dans l'étude d'Hietala *et al* sont survenues en période néonatale et étaient vraisemblablement la conséquence d'infections transplacentaires survenues en fin de gestation. En Hollande, l'analyse rétrospective de 50 troupeaux avec avortements à caractère épidémique n'a identifié que 6 troupeaux (12%) où la transmission horizontale semblait exister¹⁹. Plus récemment, au Québec, une étude rétrospective des généalogies des troupeaux testés pour *Neospora* a identifié 7 cas de transmission horizontale dans 33 familles répondant aux critères d'inclusion de l'étude. Pour être retenue comme évidence de transmission horizontale, une vache séropositive provenant d'une mère séronégative devait avoir 2 sœurs séronégatives.

En conclusion, la transmission horizontale naturelle de *N. caninum* n'a pas encore été démontrée. Elle est toutefois supportée par plusieurs études séroépidémiologiques^{7,57}, par la démonstration expérimentale du chien comme hôte définitif du parasite¹⁵ et par l'infection expérimentale de veaux par des oocystes provenant de fèces de chien infectés expérimentalement¹²³. Il est donc important de protéger l'eau et les aliments destinés aux bovins de la contamination par les fèces des chiens ou d'autres canidés sauvages⁸.

La transmission verticale de l'infection

La transmission transplacentaire de *N. caninum*, par infection *in utero* du fœtus, est le seul mode de transmission démontré jusqu'à maintenant²⁴. Le premier rapport confirmant la transmission *in utero* de *N. caninum* a été publié en 1989. Deux chattes infectées expérimentalement ont donné naissance à des chattons infectés congénitalement⁵³. Une d'entre elles avait été infectée près de 6 mois avant de devenir gravide confirmant ainsi que l'infection n'avait pas besoin de survenir pendant la gestation pour être transmise *in utero*⁵³.

La transmission verticale a été démontrée chez plusieurs espèces par l'injection expérimentale de tachyzoïtes en sous-cutanée ou en intra-musculaire : canine¹²⁷, féline⁵³, caprine¹²⁸, murine¹²⁹ et bovine¹³⁰.

La transmission *in utero* de l'infection à 5 veaux asymptomatiques nés de vaches ayant avorté auparavant de fœtus infectés par *N. caninum* constituait la première démonstration naturelle de ce mode de transmission⁷⁰. Le caractère répétitif de ce mode de transmission, démontré par l'infection de ces 5 veaux à partir de l'infection chronique de leur mères, a mis très tôt en évidence l'importance épidémiologique potentielle de ce mode de transmission. Une observation similaire dans 2 troupeaux avec avortements endémiques a démontré une forte association entre le statut sérologique des mères ayant déjà avorté par *N. caninum* et le statut sérologique de leurs filles⁶⁴. Cette observation indiquait à la fois que les vaches avortant un fœtus infecté par *N. caninum* avaient probablement été infectées *in utero* et que leur avortement n'était pas du à une exposition récente à des oocystes d'un hôte définitif.

La démonstration du potentiel de transmission *in utero* sur plusieurs générations est venue de Suède⁶⁸. À l'aide des données séroépidémiologiques et généalogiques du troupeau, Bjorkman *et al* démontrèrent que tous les animaux séropositifs de ce troupeau de 58 vaches provenaient de 2 vaches achetées 15 ans plus tôt. Ils conclurent que l'infection peut être maintenue à un niveau de prévalence constant dans une population en l'absence d'un hôte définitif⁶⁸. Anderson *et al*, aux USA, parvinrent à la même conclusion après avoir suivi jusqu'à leur premier vêlage une cohorte de 50 génisses nées séropositives. Tous les veaux testés (n=18) provenant de mères séropositives étaient aussi nés séropositifs¹³¹.

Deux enquêtes séroépidémiologiques du début des années '90, utilisant des tests sérologiques différents, ont démontré la symétrie étroite entre le statut sérologique pré-colostral des veaux et la séoprévalence dans leurs troupeaux d'origine. En utilisant un test de fluorescence indirecte (IFAT), 33% des 260 veaux de 2 troupeaux avec une séoprévalence chez les adultes de 39%, étaient positifs à la naissance¹³². Le seuil d'interprétation conservateur, utilisé dans cette étude (1:640), pour un test positif peut avoir sous-estimé la séoprévalence à la naissance⁸. Les mêmes chercheurs utilisant un test ELISA, ont démontré que la séoprévalence pré-colostrale sur une période de 2,5 années était de 38% pour 2 troupeaux dont la séoprévalence chez les adultes étaient de 40%⁶⁵. Ces 2 études confirmaient sur une plus large échelle, par la constance de la relation entre la séopositivité à la naissance et à l'âge adulte, que la transmission verticale *in utero* constituait le principal mode de transmission. On y notait également que l'âge de la mère n'avait pas d'impact sur le statut sérologique du nouveau-né suggérant que l'immunité naturelle ne protégeait pas contre la contamination d'un fœtus lors d'une gestation subséquente⁶⁵. D'autres études ont conclu à la prépondérance de la transmission verticale pour *N. caninum* au cours des dernières années^{13,14,19,87,131,133,134}. Schares en Nouvelle-Zélande a démontré, à l'aide d'analyses sérologiques, l'association familiale pour le statut sérologique à *N. caninum* dans un troupeau et l'absence de relation avec l'âge. Quatorze des 15 descendants provenant de 10 vaches séropositives étaient eux-mêmes séropositifs¹³³.

Anderson *et al* en Californie ont suivi de la naissance au 1^{er} vêlage une cohorte de 50 génisses¹³¹. Vingt-cinq d'entre elles étaient séropositives à la naissance avec un titre IFAT supérieur à 1:5 120 et les 25 génisses séronégatives à la naissance avaient un titre IFAT inférieur à 1:80. Tous les veaux nés des génisses séropositives étaient séropositifs à la naissance avec un titre IFAT supérieur à 1:1 280 et tous ceux qui ont été examinés en *post-mortem* (n=7) présentaient les signes caractéristiques de l'infection à *Neospora*. Les veaux nés des vaches séronégatives étaient tous séronégatifs à la naissance et les 3 qui ont été examinés *post-mortem* ne présentaient aucun signe de l'infection. Les auteurs ont conclu que l'infection pouvait être acquise avant la naissance et transmise de la même façon à la génération suivante permettant ainsi de maintenir l'infection dans le troupeau¹³¹.

Wouda *et al* en Hollande ont cherché des anticorps contre *N. caninum* dans les sérums pré-colostraux de 67 veaux de 4 troupeaux nés à la suite d'une épidémie d'avortements

causés par *N. caninum*. Cinquante de ces veaux étaient de la 1^{ère} génération (F1) après l'épisode et 17 étaient de la 2^e génération (F2). Respectivement 68% des F1 et 82% des F2 présentait des anticorps contre *N. caninum* dans leur sérum pré-colostrale démontrant ainsi l'efficacité de la transmission *in utero* de *N. caninum*¹³⁴. Rappelons que ces chercheurs étaient déjà parvenus à la même conclusion en analysant le statut sérologique de 50 troupeaux parmi lesquels se retrouvaient les 4 troupeaux de cette étude¹⁹. Pour 44 de ces troupeaux, malgré l'évolution épidémique des avortements, le statut sérologique des animaux ne variait pas avec l'âge. Cette observation suggérait que l'infection s'était perpétuée par transmission verticale.

Davison *et al* en Angleterre ont prélevé 124 sérums pré-colostraux chez des veaux provenant de mères séropositives: L'analyse sérologique avec une méthode ELISA de ces échantillons a démontré que 95,2% d'entre eux étaient positifs. Les auteurs ont conclu que la transmission verticale constituait le principal mode de propagation de l'infection dans ces 6 troupeaux¹³.

Des études ont calculé le taux de transmission verticale entre les mères séropositives et leurs veaux. La plupart de ces estimations concluent à des taux élevés de transmission verticale démontrant ainsi l'importance de ce mode de propagation^{64,65,131,133}. Dix veaux séropositifs (83%) sont nés de douze vaches ayant avorté par *N. caninum* au cours de leur gestation précédente dans 2 troupeaux californiens⁶⁴. Une enquête sérologique prospective avec échantillonnage pré-colostrale sur 115 veaux provenant de mères séropositives a révélé un taux de transmission verticale de 81%⁶⁵. Une étude généalogique dans 1 troupeau néo-zélandais avec avortements sporadiques a conclu que 93% des descendants de mères séropositives étaient séropositifs¹³³.

Dans une autre étude, tous les veaux nés de 20 mères séropositives étaient séropositifs sur un prélèvement post-colostrale effectué avant 10 jours d'âge tandis que tous les veaux nés de mères séronégatives étaient séronégatifs¹³¹. Dans cette étude, tous les veaux des deux cohortes avaient, sans distinction, reçu un colostrum mélangé provenant des vaches adultes du troupeau sans égard à leur statut sérologique pour *N. caninum*. Cette mesure ne semble pas avoir influencé le profil sérologique des veaux provenant des mères séronégatives de cette étude puisque la plupart des sérologies néonatales effectuées étaient post-colostrales.

On doit noter que l'estimation du taux de transmission verticale basée sur un échantillonnage pré-colostral peut sous-estimer le taux réel de transmission. Sur 456 veaux étudiés sur une période de 4 années dont 172 ont été classés positifs dès la naissance à *N. caninum*, au moins 9 veaux supplémentaires ont séroconverti pendant la période néonatale¹⁴. Les mères de ces veaux étant séropositives, ces séroconversions provenaient probablement d'infections *in utero* tardives selon les auteurs¹⁴.

Plus récemment, une étude rétrospective sur 23 troupeaux du Québec, estimait la transmission verticale à 44,4%, une valeur nettement moins élevée que les taux publiés précédemment¹². L'échantillon étudié est cependant représentatif de ce qu'on pourrait rencontrer lors de l'analyse des données sérologiques et généalogiques d'un troupeau. Les auteurs indiquent que l'échantillonnage pourrait avoir biaisé leurs résultats : l'élimination sélective des séropositives dont le statut était connu des propriétaires pourrait avoir contribué à diminuer le taux estimé de transmission verticale. D'autre part, la valeur prédictive d'un test positif diminue dans une population à faible prévalence, augmentant ainsi le risque d'identifier de faux positifs dans la population étudiée¹². Il est donc possible, considérant que 11 des 23 troupeaux de l'étude avait une séroprévalence inférieure à la moyenne de 21,9% pour la population étudiée, qu'un certain nombre de séropositifs de leur échantillonnage étaient de faux positifs et ne pouvaient pas exprimer de transmission verticale parce qu'ils n'étaient tout simplement pas infectés.

La transmission verticale naturelle chez le chien a été rapportée mais, contrairement à ce qui est observé chez les bovins, son incidence beaucoup plus faible (20% des chiots nés de mères séropositives sont infectés) ne peut supporter la prévalence observée dans la population¹³⁵. L'infection post-natale y survient donc plus fréquemment que chez les bovins.

La variabilité observée dans les taux de transmission verticale chez les bovins pourrait être en partie une conséquence des objectifs et des méthodologies des études ayant généré cette information. Ils ont été calculés à partir des résultats d'enquêtes séroépidémiologiques visant en premier lieu à établir la prévalence de l'infection dans les populations étudiées, à identifier les facteurs de risque de l'infection⁷, à comparer la

validité de différents tests¹³³ ou à comprendre les facteurs influençant le risque d'avortement relié à l'infection à *Neospora*¹¹⁶.

La transmission verticale est néanmoins responsable de la majorité des nouvelles infections à *N. caninum*⁸⁹ et elle peut, à elle seule, assurer la pérennité de l'infection dans un troupeau à la suite de son introduction par le biais de la transmission horizontale ou de l'achat d'un animal infecté.

Le contrôle de la maladie

Le diagnostic d'un avortement par *N. caninum* ne peut être confirmé seulement par la présence d'anticorps chez la mère. Il a cependant été démontré que l'élimination sélective des séropositives d'un troupeau constituait un moyen efficace pour diminuer le nombre d'avortements par *N. caninum*⁹. L'élimination des vaches séropositives comme mesure de contrôle dans certains troupeaux à prévalence élevée peut être économiquement peu réaliste⁸.

Dans sa revue de littérature de 1999, Dubey mentionne que la prévention de la transmission du parasite entre la mère et le fœtus n'a pas encore été démontrée par quelque moyen que ce soit⁸. L'immunoprophylaxie est en cours d'investigation et a démontré expérimentalement des résultats encourageants pour la prévention de la transmission verticale chez des souris¹⁷. Ces souris avaient cependant été infectées expérimentalement en cours de gestation : un modèle qui ne s'applique pas à la majorité des infections naturelles où les mères sont infectées avant de devenir gravides. Son potentiel n'a donc pas encore été démontré pour la prévention de la transmission *in utero* chez des animaux infectés avant le début de la gestation.

La médication n'a pas fait l'objet de recherche *in vivo* chez les bovins et ne présenterait d'intérêt que si le médicament utilisé ne génère pas de résidus dans le lait ou la viande. Les ionophores qui détiennent une homologation pour les bovins laitiers au Canada (lasalocide et monensin), ont démontré *in vitro*, par l'évaluation des effets des tachyzoïtes sur des cultures cellulaires, une efficacité aux plus basses concentrations expérimentées¹³⁶. Leur efficacité *in vivo* n'a jamais été expérimentée jusqu'à maintenant. À cet égard, il est intéressant de noter que le risque d'avorter le plus élevé rapporté dans la littérature (OR=7 pour la 1^{ère} gestation des séropositives par rapport aux séronégatives) a été observé chez des génisses qui recevaient

quotidiennement 200 mg de monensin (le dosage utilisé pour le contrôle de la coccidiose) au cours de l'étude⁷⁶. L'utilisation d'ionophores aux dosages homologués ne semble donc pas protéger le fœtus contre l'infection transplacentaire.

La transplantation embryonnaire a démontré son potentiel et est déjà utilisée comme méthode de biosécurité dans la prévention de plusieurs infections courantes des bovins comme le BVD, le IBR, la Leucose Enzootique Bovine et la Brucellose²⁰. Pour qu'une maladie infectieuse soit transmise par le biais du transfert d'embryons, la présence d'un agent infectieux, son adhérence à l'embryon ou la contamination des liquides de lavages sont des pré-requis²⁰. Même si la présence en début de gestation dans l'utérus des tachyzoïtes de *N. caninum* n'a pas été démontrée, la contamination par des tachyzoïtes de *N. caninum* des liquides de la récolte ne peut être exclue *a priori*. La réactivation de ces tachyzoïtes à la suite des traitements hormonaux et la présence de sang de la donneuse dans la solution de lavage sont des causes potentielles de contamination des embryons produits *in vivo*. La procédure de transplantation par elle-même pourrait cependant représenter un obstacle à la contamination des embryons par le biais de la dilution de l'agent pathogène et de la congélation / décongélation des embryons²⁰. Des études ont démontré que des embryons exposés à des agents pathogènes comme le IBR, le cytomegalovirus et le virus de la stomatite vésiculaire et dont la zone pellucide est intacte pouvaient être transplantés de façon sécuritaire après lavage et traitement à la trypsine²⁰. Selon ces auteurs, la sécurité de la méthode pourrait même rendre inutile la connaissance préalable du statut infectieux de la donneuse vis-à-vis ces maladies. La procédure concernant le lavage et le traitement à la trypsine des embryons a été décrite dans le *Manual of the International Embryo Transfer Society* et est couramment employée par les médecins vétérinaires praticiens de la transplantation embryonnaire^{20,137}.

L'utilisation de la transplantation embryonnaire comme méthode de prévention de la transmission verticale de *N. caninum* et possiblement comme mesure de régulation, en vue de diminuer le niveau d'infection d'un troupeau, n'a pas été étudiée scientifiquement. Des rapports non-vérifiés suggèrent que la transplantation d'embryons dans des receveuses séronégatives pourrait prévenir la transmission verticale du parasite⁸⁹. La validation de cette méthode en ferait le seul moyen connu de prévenir la transmission *in utero* de l'infection à *N. caninum*.

Article scientifique

« Embryo transfer as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle »

Baillargeon P.¹, Fecteau G.², Lamothe P.², Paré J.,³ Sauvé R.¹

¹ Clinique Vétérinaire St-Louis, St-Louis de Gonzague, Québec.

² Département de Sciences Cliniques, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec.

³ Biovet Inc., St-Hyacinthe, Québec.

Corresponding author : Paul Baillargeon 84 Principale, St-Louis de Gonzague, Qc, Canada, JOS 1T0, phone: 450, 377-3010, fax : 450, 371-8938, e-mail:paul@embryobec.com

L'article a été accepté pour publication dans le «The Journal of the American Veterinary Medical Association »

ABSTRACT

OBJECTIVE : To evaluate the potential of embryo transfer (ET) into seronegative recipients, in preventing vertical transmission of *Neospora caninum*.

DESIGN : Prospective study

SAMPLE POPULATION: Eighty-seven recipient cows and heifers and their ET calves from 22 donors originating from 9 different dairy herds.

PROCEDURE: *Neospora caninum* serological status of donors and recipients was determined by ELISA before collection and transfer of embryos. Viable embryos were washed and trypsin treated according to the procedure defined by the International Embryo Transfer Society (IETS). Recipients from experimental groups A and B (seronegative) were transferred with embryos from seropositive and seronegative donors, respectively. Recipients from group C (seropositive) were transferred with embryos from seronegative or seropositive donors. Recipients were blood sampled monthly during pregnancy. Calf blood samples, collected at birth, were assayed for gamma-glutamyltransferase (GGT) to confirm pre-colostral status and for *N. caninum* antibodies using an ELISA. Tissues collected from stillbirths and aborted fetuses were analyzed by histopathology and immunohistochemistry (IHC).

RESULTS: Seventy-six calves were sampled pre-colostrally and 11 fetuses/stillbirths were examined. All calves sampled from groups A and B (n = 79) were negative for *N. caninum* antibodies (n= 70) or by tissue analysis (n = 9). In group C, 5 calves out of 6 were seropositive at birth and 1 of the 2 IHC analyses was positive. Vertical transmission rate was significantly lower in groups A and B (0%) than in group C (75%) (p < 0.0001).

CLINICAL IMPLICATIONS: Embryo transfer into seronegative recipients is an effective way to prevent vertical transmission of *N. caninum*. Results provide support for pre-transfer testing of all ET recipients.

Introduction

Neospora caninum was identified for the first time in dogs in 1988¹. The first case of abortion associated with *Neospora* in cattle was reported in a New Mexico herd in 1988². Numerous reports across the world have since demonstrated that *N. caninum* is an important cause of abortion in cattle³.

Although horizontal transmission, through a definitive host likely occurs⁴⁻⁶, vertical transmission, through *in utero* infection, has been shown to be the most frequent mode of transmission^{4,7-9}. Serological data and genealogy analysis studies support this observation^{4,7-13}. Estimated rate of vertical transmission varies from 44.4% to 100% between studies^{4,14-17}. It has been shown that vertical transmission by itself can maintain infection level through generations in a herd¹⁴.

The goals of a control strategy for *N. caninum*, based on current knowledge, are to prevent vertical transmission of the parasite^{18,19} and minimize risk of horizontal transmission¹⁶. Culling of seropositive animals has been proposed¹⁹ and studied with mathematical models to determine efficacy²⁰. This implies though, for some herds, the loss of valuable animals with superior genetic merit and high commercial value.

Protecting the early embryo from exposure to viral or bacterial contamination decreases the risk of disease transmission^{21,22}. For transmission of an infectious agent to occur, it must be present in the embryonic cells, be associated with the zona pellucida or be present in the medium used to transfer the embryo^{23,24}. Embryo transfer, after washing and trypsin treatment of the embryos as recommended by the International Embryo Transfer Society (IETS), is a proven method for the effective control of the transmission of pathogens such as bovine leukosis virus (BLV), infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and *Brucella abortus*²⁴.

The objective of this study was to determine the efficacy of an embryo transfer procedure into seronegative recipients to prevent vertical transmission of *N. caninum* in cattle.

Material and Methods

Animal sampling

Eleven Holstein herds from southwestern Québec were selected to participate in this project. Participating herds had a history of confirmed *N. caninum* abortions or of seropositive animals based on Clinique Vétérinaire St-Louis health records. Precedence was given to herds with computerized health records. Availability of sufficient number of potential donors and recipients in order to constitute defined experimental groups before July 1999 was also considered as a selection criterion. Each herd included in the study had to provide one seronegative and one seropositive donor and at least 12 recipients of which 2 were seropositive.

Experimental groups

Group A, the experimental group, was composed of seronegative recipients transferred with embryos collected from seropositive donors. The objective of this group was to test that embryo transfer into seronegative recipients effectively prevented vertical transmission of *N. caninum*. Group B, the control group, was composed of seronegative recipients receiving embryos collected from seronegative donors. Group C was composed of seropositive recipients implanted with embryos collected from either seronegative or seropositive donors. Group C intended to confirm the transmission ability of the parasite from an infected recipient to her offspring in herds studied. Participant breeders received compensation for females confirmed to be infected at birth in Group C.

Embryo Transfer protocol

Table I present the values used to estimate sample size. Superovulatory treatment was either initiated between day 9 and 14 of estrous cycle when previous heat was observed and recorded or 96 hrs after administration of 3 mg estradiol 17B^d preceded by insertion

^d Denis Giroux, pharmacist, St-Hyacinthe, Québec, Canada

of a progesterone releasing device^e 24 hrs earlier. Gonadotropin treatment of donors consisted in a total of 400 mg NIH-FSH-P1^f, administered twice daily intramuscularly in a decreasing dosage schedule for 5 days. Luteolysis was induced by administration of 40 mg of dinoprost^g at 72 hrs after the first Gonadotropin treatment. Animals were artificially inseminated twice at 54 and 72 hrs after dinoprost administration.

Non surgical embryo collection was performed at day 6.5 - 7 (day 0 = estrus). The embryos were evaluated, categorized, washed and trypsin treated according to the standards set by IETS^{24,25}. Embryos of stage 4 to 7 of the quality 1 and 2 were defined as viable²⁵. Visual inspection of embryos to ensure for integrity of zona pellucida was performed before and after the washing and trypsin treatment procedure. This procedure was performed by transferring embryos through 5 washes containing a complex, serum-free solution^h, then through 2 Petri dishes containing 0.25% trypsin in Hanks' balanced salt solutionⁱ and finally through 5 washes of the same medium as in the first 5 washes²⁵.

Embryos were transferred non-surgically into synchronized recipients or frozen in 1.5M ethylene glycol plus 0.1M sucrose using a standard procedure²⁶. The direct transfer for frozen-thawed embryos already described was used for frozen embryos²⁶. After reviewing available data on serologic and synchronization status of recipients, corpus luteum (CL) was evaluated and localized and an epidural anesthesia was performed. Frozen embryos were thawed at 30°C (86°F) in a water bath for 30 seconds and transferred into cranial third of uterine horn ipsilateral to the CL.

^e CIDR, Vetrepharm Canada Inc., London, Ontario, Canada

^f Folltropin, Vetrepharm Canada Inc, London, Ontario, Canada

^g Lutalyse, The Upjohn Company-Animal Health Division, Orangeville, Ontario, Canada

^h Vigro Holding Plus, ABTechnology, Pullman, WA 99163, USA

ⁱ Life Technologies Burlington, Ontario, L7P 1A1

Recipients were examined by transrectal ultrasound at 30 ± 3 days after transfer for the presence of a conceptus and its viability assessed by observation of a heart beat. Pregnancies were reconfirmed by transrectal palpation after 60 days. Blood collection was performed monthly from pregnant recipients and sera stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for up to 30 days and then at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for permanent storage until submission to the laboratory. All samples were tested simultaneously at the end of the study.

Aborted fetuses and stillbirths were necropsied and target tissues were collected: brain, heart, diaphragm, skeletal muscle, lung, liver and kidney. Calves were blood sampled at birth, before colostrum intake, to determine pre-colostral *N. caninum* antibody level. Udder supports were provided to participant herds to avoid accidental colostrum intake. Serum concentration of GGT was measured for each calf to confirm that the sample was pre-colostral. Serum GGT values lower than 50 IU/L were interpreted as being pre-colostral²⁷.

Laboratory procedures

Serological testing was performed using an ELISA with a reported sensitivity of 88.4% and specificity of 99% at a cut-off of 0.60^j. Results are expressed as a ratio between optical density (OD) of the sample and OD of a positive standard (S/P). To maximize sensitivity and specificity, a suspect zone between S/Ps of 0.41 to 0.79 was considered. Recipients were considered as seronegative, retrospectively, if initial ELISA ratio was <0.41 and did not exceed 0.79 more than once during pregnancy. Recipients were considered seropositive, retrospectively, if initial ELISA ratio was >0.79 and did not decrease below 0.41 more than once during pregnancy. These criteria allowed for misidentification of samples. Histopathology and IHC analysis were performed on brain and heart of aborted and stillbirth calves using a standard procedure^{k,28}.

^j Biovet, St-Hyacinthe, Québec, Canada

^k Prairie Diagnostic Services, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

Statistical analysis:

Rate of vertical transmission of *N. caninum* was computed for each study group to assess impact of embryo transfer into negative recipient on the transmission of the disease. Vertical transmission rate was obtained by dividing the number of infected calves or fetuses by the number of calves and fetuses sampled in each group. A Fisher's exact test was used to compare the rate of vertical transmission between the three study groups. A 95% confidence interval (CI) was calculated for each estimated transmission rate, assuming a normal distribution. If embryo transfer is an effective control method for vertical transmission of *N. caninum*, transmission rates of groups A and B were expected to be similar and they were both expected to be lower than that of group C. Mann-Whitney and Fisher's exact tests were used to compare embryo transfer performances and fetal and embryonic losses between seropositive and seronegative recipients. A alpha level of 0.05 was used for all statistical analyses.

Results:

Screening results

Four hundred and thirty seven heifers and cows from 11 different herds were serologically tested for *N. caninum*. Two herds could not provide the minimal number of potential donor and recipients and were excluded of the study. Of all animals tested, 72 (16.5%) were rejected because their ELISA ratio was between 0.41 and 0.79. Twenty-nine (7%) had an ELISA ratio greater than 0.79 and were retained as seropositive potential donors or recipients. Three hundred and sixteen (76%) had an ELISA ratio below 0.41 and were retained as seronegative potential donors or recipients. Overall seroprevalence of the sampled animals was 9.8% (43/437), at a cut-off ratio of 0.6.

Superovulation and ET results:

Twenty-two superovulations and embryo collections were performed in 9 different herds on 11 seropositive and 11 seronegative donors. Two hundreds and nine embryos

were collected for an overall average of 9.5 viable embryos per donor including the four donors (1 seropositive and 3 seronegative) that did not produce any viable embryos. Seropositive and seronegative donors produced respectively 126 (11.5/donor) and 83 (7.5/donor) viable embryos ($p=0.25$).

Of the 209 embryos collected, 174 were transferred to constitute the study groups. Table II presents numbers of embryos transferred for each experimental group. In group C, the 16 seropositive recipients received embryos collected from 8 seronegative and 8 seropositive recipients.

Pregnancy results:

One hundred and nine pregnancies (63%) were confirmed on the recipients transferred during the study. Pregnancy loss rate for groups A and B (seronegative recipients) and group C (seropositive recipients) were respectively 6%, 11% and 30% ($p=0.07$).

Overall 87 gestations yielded study results. Eleven of the confirmed pregnancies were not sampled with blood or tissues at birth. Four pregnancies did not meet inclusion criteria determined for the study. Two recipients in group A (seronegative) had ratios S/P higher than 0.79 for, respectively, 2 and 3 of their pregnancy tests. One recipient from group A had one monthly test missing during her pregnancy and one ratio S/P higher than 0.79. One recipient from group C had 4 monthly test lower than 0.41 during her pregnancy.

All calves from groups A and B and one calf from group C were seronegative at birth. One seronegative calf with an elevated GGT (6869 IU/ml) from group B was included in calculation of vertical transmission. In group C, 5 calves were seropositive at birth with ratios S/P > 1.16. Histopathology and IHC were positive on tissues of one aborted fetus from Group C and negative on tissues of the remaining 10 calves and fetuses submitted. Based on serological or tissue analysis, all calves from groups A and B were considered to be free of the infection. Six of the 8 calves from group C were considered

to be infected at birth. Two calves of group C, one from a seropositive donor and one from a seronegative donor, were considered to be free of the infection.

Table III presents the calculated rate and 95% confidence intervals (CI) of vertical transmission observed for the 3 experimental groups. Lower limit of CI for group C is beyond upper limits of CI for groups A and B and the difference between group C and groups A and B is statistically significant ($p < 0.0001$).

Discussion

Embryo transfer into seronegative recipients is an effective way of producing calves free of *N. caninum* infection at birth. All calves born from seronegative recipients (groups A and B) were negative at birth to serological test or tissue analysis and therefore considered free of the infection.

The high rate of vertical transmission observed in seropositive recipients (group C) and the absence of vertical transmission in seronegative recipients (groups A and B) confirm that the risk of new infection is linked to the serological status of the recipients. Therefore, it appears logical and justifiable to select potential recipients free of the infection.

Seroprevalence in purchased animals has been reported previously to exceed prevalence among cattle raised on the farm³⁰. Seroprevalence in participating herds (9.8%) was similar to that of other reports¹⁶. We hypothesize that seroprevalence in the population of potential embryo transfer recipients available in the market place may be higher than reported seroprevalence for that area (16.6%)¹⁶. This increase could be the drawback of culling seropositive animals as a control measure for neosporosis in dairy herds. Breeders relying on purchased recipients without screening are at risk of increasing prevalence of infection by *N. caninum* into their replacement herd. Intensive use of embryo transfer without pre-testing recipients of unknown origin, may represent a significant biosecurity risk for the introduction of *N. caninum* into a herd and for the contamination of valuable uninfected families.

In a review of different serological tests, it was concluded that proper categorization of animals with a single test remains a challenge in field conditions²⁹. At a cut-off S/P of 0.41, the ELISA used in this study was an effective way of selecting non-infected females for use as embryo transfer recipients. To be included in calculation of vertical transmission, recipients had to maintain their pre-transfer serological status. In order to allow for misidentification errors, one test above 0.79 for seronegative or below 0.41 for seropositive was allowed if all monthly serum samples (n=9) were available. If less than 9 samples were available, all results had to maintain pre-transfer serological status for inclusion. Four recipients were excluded based on these criteria. Misidentification of the pre-transfer sample was suspected in 2 recipients of group A and the recipient of group C and the remaining recipient of group A had one missing sample along with one ratio S/P higher than 0.79 during pregnancy.

A significant portion of females (16.5%) sampled in participating herds had an S/P between 0.41 and 0.79. More research will be necessary to estimate risk of vertical transmission of *N. caninum* in this group.

Blood samples collected on calves were assayed for GGT in order to confirm their pre-colostral status. One calf had an elevated GGT above 50 IU/ml and was included in study results because of its negative serological status. Colostrum intake could not have decreased its antibody level.

Serological status to *N. caninum* did not appear to influence the donor's potential for embryo production. Number of embryos collected and pregnancy rate was not statistically different between the two groups of donors. Average number of viable embryos per donor is higher than reported average¹. Parity and reproductive status of donor may have positively influenced superovulation results. Average parity of seropositive donors was 2.8

¹ Summary of Canadian embryo transfer activity for 1998, prepared by Dr. Reuben Mapletoft, University of Saskatchewan

lactation and 3.5 lactation for seronegative. Only one seropositive donor was a repeat breeder at time of superovulation.

The reported risk of pregnancy losses is about 3 times higher for seropositive females compared to seronegative herd mates^{15,31,32} and in some situations up to 7 times higher^{32,33}. Stillbirths have been reported to increase by 2.5 times³³. Rate of losses observed in groups A and B appeared lower than in group C, but sample size in the latter likely precluded from identifying a significant difference. Based on this observation and on available data in literature, serological screening for *Neospora status* of potential embryo transfer recipients could be immediately rewarding by decreasing rate of pregnancy losses.

Despite the anecdotal reports on this subject, this is the first scientific report to confirm that an embryo transfer procedure into seronegative recipients is an effective way of preventing vertical transmission of *N. caninum* in cattle. For many breeders, this will mean important benefits by decreasing the reproduction and production losses related to *N. caninum* in their herds and by allowing for the development and marketing of non infected blood lines to the market place.

References

1. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, *et al.* Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:1269-1285.
2. Thilsted JP, Dubey JP. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diag Invest* 1989;1(3):205-209.
3. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996;67:1-59.
4. Bergeron N, Fecteau G, Paré J, *et al.* Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Can Vet J* 2000;41(6):464-467.
5. McAllister M, Huffman EM, Hietala SK, *et al.* Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diag Invest* 1996;8:355-357.
6. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, *et al.* Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998;28(9):1473-1478.
7. Anderson ML, Reynolds J, Rowe JD, *et al.* Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210:1169-1172.
8. Davison HC, Otter A, and Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 1999;29:1683-1689.
9. Schares G, Peters M, Wurm R, *et al.* The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998;80(2):87-98.

10. Hietala SK, Thurmond MC. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1669-1676.
11. Buxton DR, Caldow GL, Maley SW, *et al.* Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Vet Rec* 1997;141(25):649-651.
12. Davison HC, French NP, Trees AJ. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet Rec* 1999;144(20):547-550.
13. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora* infection in dairy cattle. *Vet Rec* 1994;134(20):531-532.
14. Bjorkman C, Johansson O, Stenlund S, *et al.* *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1996;208(9):1441-1444.
15. 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(1):82-87.
16. Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213(11):1595-1598.
17. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res* 1996;60(2):133-139.
18. Klein F, Hietala SK, Berthet H, *et al.* *Neospora caninum*: enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et charolais. *Point Vét* 1997;28(183):1283-1286.
19. Paré, J. *Epidemiology of Neospora caninum in cattle* 1996; University Davis, California; 217pp.

20. French NP, Clancy D, Davison HC, and *et al.* Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1691-1704.
21. Singh EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenol* 1987;27:9-20.
22. Wrathall AE and Sutmöller P. Potential of embryo transfer to control transmission of disease. *Manual of the International Embryo Transfer Society* 1998;3(2):17-44.
23. Riddell KP and Stringfellow DA. The use of antibiotics in media for recovery, culture, and storage of embryos. *Manual of the International Embryo Transfer Society* 1998;3(7):85-91.
24. Givens MD, Stringfellow DA. *Current Veterinary Therapy IV*. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998; 13, Potential of embryo transfer for infectious disease control. p. 592-595.
25. Robertson I and Nelson RE. Certification and identification of the embryo. *Manual of the International Embryo Transfer Society* 1998;3(9):103-134.
26. Voelkel SA, Hu YX. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenol* 1992;37(1):23-37.
27. Parish SM, Tyler JW, Besser TE, *et al.* Prediction of serum IgG1 concentration in Holstein calves using serum gamma glutamyltransferase activity. *J Vet Int Med* 1997;11(6):344-347.
28. Lindsay DS and Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res* 1989;50:1981-1983.
29. Bjorkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 1998;29(10):1497-1507.

30. Mainar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, *et al.* Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet Rec* 1999;145(3):72-75.
31. Moen AR, Wouda W, Mul MF, *et al.* Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenol* 1998;49(7):1301-1309.
32. 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(12):1381-1385.
33. Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213(5):685-690.

Acknowledgements:

Authors are grateful to the Conseil d'Orientation de la Recherche pour les Productions Animales du Québec (CORPAQ) who funded the research presented in this report, to the breeders for their enthusiastic contribution and to Dr. André Clavet who conducted activities for one of the herds included in the study.

TABLE I: Values used to estimate sample size to determine if embryo transfer is an effective method of preventing vertical transmission of *Neospora caninum*

Description	Value	Expected results
Number of donors		22
Superovulation rate	90%	20
Average number of viable embryos per collection ¹	5.75	115
Average pregnancy rate in recipients	60%	69
Average embryo loss rate in recipients	5%	66

¹ Summary of Canadian embryo transfer activity for 1998, prepared by Dr. Reuben Mapletoft, University of Saskatchewan

TABLE II : Number of embryo transfers and pregnancy outcomes for each experimental group assembled in order to determine if embryo transfer is an effective method of preventing vertical transmission of *Neospora caninum*

	Experimental group***			Total	
	A	B	C		
Transferred	101	57	16	174	
Pregnancies	Fresh embryos	30(30%)	22(38%)	9(56%)	61(35%)
	%Pregnancy	63(62%)	36(63%)	10(63%)	109(63%)
Pregnancy losses *	Fresh %pregnancy	(67%)	(68%)	(78%)	(69%)
	Frozen %pregnancy	(61%)	(60%)	(43%)	(59%)
Pregnancy losses *	4	4	3	11	
Calves tested**	Serology	43	27	6	76
	IHC	7	2	2	11

* Embryo losses and abortions

** 13 pregnancies from group A, 7 from group B and 2 from group C did not yield usable information due to lack of tissue or blood sampling of the calves or serological profile of recipients.

*** Experimental groups :

A = seronegative recipients transferred with embryos from seropositive donors.

B = seronegative recipients transferred with embryos from seronegative donors.

C = seropositive recipients transferred with embryos from seronegative and seropositive donors.

TABLE III : *Neospora caninum* rate of vertical transmission and confidence intervals for each experimental group

Group	Vertical Transmission	95% IC
A	0/50 (0%)	0 - 5.8%
B	0/29 (0%)	0 - 9.8%
C	6/8 (75%)	35.6 - 95.5%

^c Experimental groups :

A = seronegative recipients transferred with embryos from seropositive donors.

B = seronegative recipients transferred with embryos from seronegative donors.

C = seropositive recipients transferred with embryos from seronegative and seropositive donors.

Résultats

Les résultats concernant l'objectif principal de l'étude ont été présentés dans l'article scientifique annexé à ce mémoire. Des résultats complémentaires provenant des méthodes et du matériel décrit dans l'article scientifique sont présentés dans les pages suivantes et seront abordés dans la discussion y faisant suite.

Le tableau II (p.48) présente le profil sérologique des receveuses confirmées gravides dont le ratio S/P pré-implantation était $> 0,41$ et $< 0,79$. Ces receveuses ont été catégorisées dans le groupe E et ont été exclues du calcul de la transmission verticale de *N. caninum*.

Le tableau III (p.49) présente le nombre d'animaux testés et les ratios S/P moyens divisés en 4 catégories pour chacun des 11 troupeaux invités à participer à l'étude. Les 4 catégories sont:

1. $\geq 0,6$: seuil proposé pour la séropositivité avec le test ELISA utilisé^m.
2. $< 0,6$: seuil proposé pour les séronégatifs
3. $> 0,41$ & $< 0,79$: intervalle du ratio S/P pour lequel les receveuses n'étaient pas éligibles à la composition des groupes expérimentaux. Les receveuses implantées appartenant à cet intervalle ont été placés dans la catégorie E.
4. $> 0,8$: Seuil de séropositivité proposé pour l'étude.

Les troupeaux 7 et 11 n'ont pas été retenus parce qu'ils ne pouvaient fournir suffisamment d'animaux rencontrant les critères d'inclusions pour composer les groupes expérimentaux. Le tableau III présente aussi le nombre de tests effectués entre août 1998 et août 1999 et les ratios S/P moyens pour chaque catégorie d'un groupe de taures achetées sur le marché dans le but d'être implantées par transplantation embryonnaire. La différence entre les troupeaux de l'étude et le groupe de taures achetées était significative pour le nombre de taures séropositives ($p=0,0001$) et pour le nombre de taures dont le ratio S/P est $> 0,41$ et $< 0,79$ ($p=0,0018$).

^m Biovet, St-Hyacinthe, Québec, Canada

Le Tableau IV (p.50) présente les résultats d'implantation et de gestation pour les receveuses des groupes A, B, C et E. Les mêmes résultats sont présentés selon le statut sérologique des donneuses d'embryons.

Le Tableau V (p.51) donne le nombre d'évènements, le groupe d'appartenance et la décision en ce qui concerne l'exclusion/inclusion pour chaque receveuse ayant présenté des anomalies concernant le nombre de tests gestationnels disponibles et le ratio S/P obtenu pour chacun d'entre eux. Cinq receveuses (3 du groupe A, 1 du groupe B et 1 du groupe C) ont eu un test manquant et ont été incluses dans les résultats parce qu'elles satisfaisaient au critère concernant le ratio S/P (aucun des 8 résultats sérologiques disponibles ne contredisant le test sérologique pré-implantation). Une receveuse du Groupe A a été exclue de l'étude pour un test manquant et un test contredisant le test de dépistage pré-implantation. Deux receveuses du groupe A et une receveuse du groupe C ayant présenté au cours de leur gestation plus d'un test mensuel contredisant leur test pré-implantation ont été exclues de l'étude. Toutes les receveuses exclues ont vêlé de veaux séronégatifs à la naissance. Des deux receveuses ayant donné des ratio S/P positifs (en contradiction de leur test pré-implantation) seul le veau de la 135JM était toujours disponible lorsque les résultats sérologiques sont devenus disponibles. Le ratio S/P de ce veau était de 0.85 à l'âge de 6 mois.

Le résultat du test effectué à la naissance (ratio S/P ou analyse de tissus) pour chacun des veaux nés des receveuses évaluées pour leur inclusion/exclusion de l'étude est également donné dans le tableau V. Tous ces veaux sont nés séronégatifs ou négatifs à l'analyse histopathologique et immunohistochimique des tissus.

Les figures 2,3,4 et 5 (p.52 à 55) présentent sous format graphique les ratios S/P du test de dépistage et des 9 tests effectués en cours de gestation pour, respectivement, les 3 receveuses du groupe A et la receveuse du groupe C qui ont été exclues du calcul de la transmission verticale de *N. caninum*. Les tests manquants sont indiqués par « N/T ». Une étoile indique les résultats des tests qui ne respectaient pas les critères d'inclusions définis pour le ratio S/P et qui ont forcé leur exclusion de l'étude. L'intervalle entre le test de dépistage et le test effectué au 30^e jour de gestation est donné pour chaque receveuse.

Les figure 6,7 et 8 (p.56 à 58) présentent sous format graphique les ratios S/P moyens du test de dépistage (pré) et des 9 tests effectués en cours de gestation pour, respectivement les receveuses des groupes A, B et C. L'intervalle moyen entre le test de dépistage et le test de 30 jours en gestation et l'écart-type sont donnés pour chaque groupe expérimental.

Tableau II - Ratios S/P des tests effectués avant l'implantation, au cours de la gestation et sur leurs veaux pour les 6 receveuses exclues de l'étude parce que leur ratio S/P avant l'implantation les rendaient inéligibles (>0.41 et <0.79).

Ratios S/P pour chaque mois de gestation*

Receveuse	Intervalle Pré / 30 (jours)	Pré	30	60	90	120	150	180	210	240	270	Veau
125	41	0.5	0.29	0.27	0.24	0.26	0.13	0.18	0.26	0.15	0.15	0.0
286	34	0.5	0.44	0.35	0.45	0.28	0.4	0.47	0.38	0.36	0.4	IHC neg
609	68	0.55	0.48	0.22	0.18	0.21	0.22	0.4	0.26	0.18	0.45	0.00
354-R2	57	0.75	1.07	0.86	0.86	0.77	0.56	0.72	0.99	0.84	0.86	0.66
83	35	0.48	0.85	0.87	0.85	0.43	0.36	0.32	0.38	0.33	0.17	0.00
64	180	0.45	0.36	0.33	0.3	0.28	0.29	0.23	0.63	0.25	0.23	0.00

* Les ratios S/P mensuels qui contredisent le ratio S/P du test de dépistage (Pré) sont identifiés en caractères gras

Tableau III - Résultats de dépistage sérologique des anticorps contre *N. caninum* (ratio S/P moyen) pour 11 troupeaux échantillonnés au début de l'étude et pour 1 groupe de receveuses achetées sur le marché.

Troupeau	Nb test	≥ 0.40	$\geq 0.60^1$	$< 0.60^1$	$> 0,40 \& < 0.80^2$	$\geq 0.80^3$
1	42	31	8	34	4	7
2	35	30	2	33	4	1
3	100	61	9	91	32	7
4	64	51	9	55	6	7
5	56	46	4	52	9	1
6	17	11	3	14	4	2
7	25	22	1	24	2	1
8	19	17	1	18	2	0
9	39	34	1	38	4	1
10	18	12	3	15	3	3
11	22	20	2	18	2	0
Total Étude	437	335 (76.6%)	43 ^a (9.8%)	374 (89.7%)	72 ^b (16.5%)	30 (6.9%)
Receveuses achetées	268	158 (58.9%)	62 ^a (23%)	206 (76.8%)	73 ^b (27.2%)	37 (8.4%)

¹ Seuil de séropositivité et de séronégativité proposé par le laboratoire pour le test utilisé

² Zone d'exclusion pour les receveuses utilisées au cours de l'étude

³ Seuil de séropositivité utilisé pour l'étude

^a $p < 0.0001$

^b $p < 0.0018$

Tableau IV- Résultats des transferts d'embryons et des gestations confirmées au cours de l'étude selon le groupe expérimental des receveuses et selon le statut sérologique de donneuses.

	Receveuses					Donneuses		
	A	B	C	E	TOTAL	Séro+	Séro-	
Embryons implantés	101	57	16	12	186	123	63	
Gestations confirmées (%)	63 (62%)	36 (63%)	10 (63%)	10 (83%)	119 (64%)	81 (66%)	38 (60%)	
Morts embryonnaires (%)	2 (3%)	2 (5%)	1 (10%)	1 (10%)	6 (5%)	2 (2%)	3 (8%)	
Avortements (%)	2 (3%)	2 (5.8%)	2 (2%)	0	7 (6%)	4 (5%)	2 (6%)	
Mortinatalités (%)	6 (10%)	1 (3%)	0	2 (2%)	10 (9%)	6 (8%)	1 (3%)	
A naïtre	6	0	0	2	8	6	2	

^a ME : Interruption de gestation sans observation du fœtus

^b Avortement : Fœtus observé

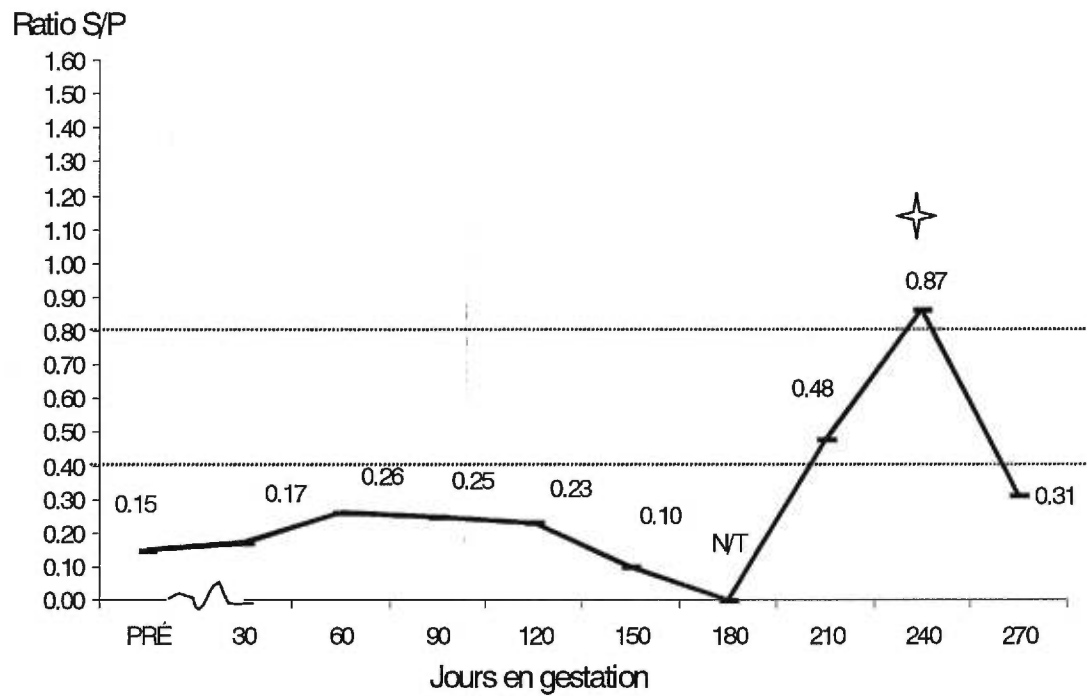
Tableau V - Receveuses de l'étude visant à déterminer si la transplantation embryonnaire est efficace pour prévenir de la transmission verticale de *N. caninum* pour lesquelles au moins un des critères d'inclusion définis dans la méthodologie était en infraction.

Groupe	Receveuse	Test manquant	Nb Ratio S/P déviant ^a	Ratio S/P pré-colostral	Exclue O / N
A	36JM	1	0	0.00	N
A	45D	1	1	0.09	O
A	1399	1	0	IHC neg	N
A	80	1	0	0.00	N
A	1387-R2	0	2	0.00	O
A	135JM	0	3	0.00 ^b	O
B	7	1	0	0.01	N
C	1477	1	0	0.00	N
C	37	0	4	0.00	O

^a Ratio S/P > 0,79 pour les groupes A et B et < 0,41 pour le groupe C

^b Le ratio S/P de ce veau était de 0.85 à l'âge de 6 mois

Figure 2 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 45D du groupe A exclue du calcul de la transmission verticale

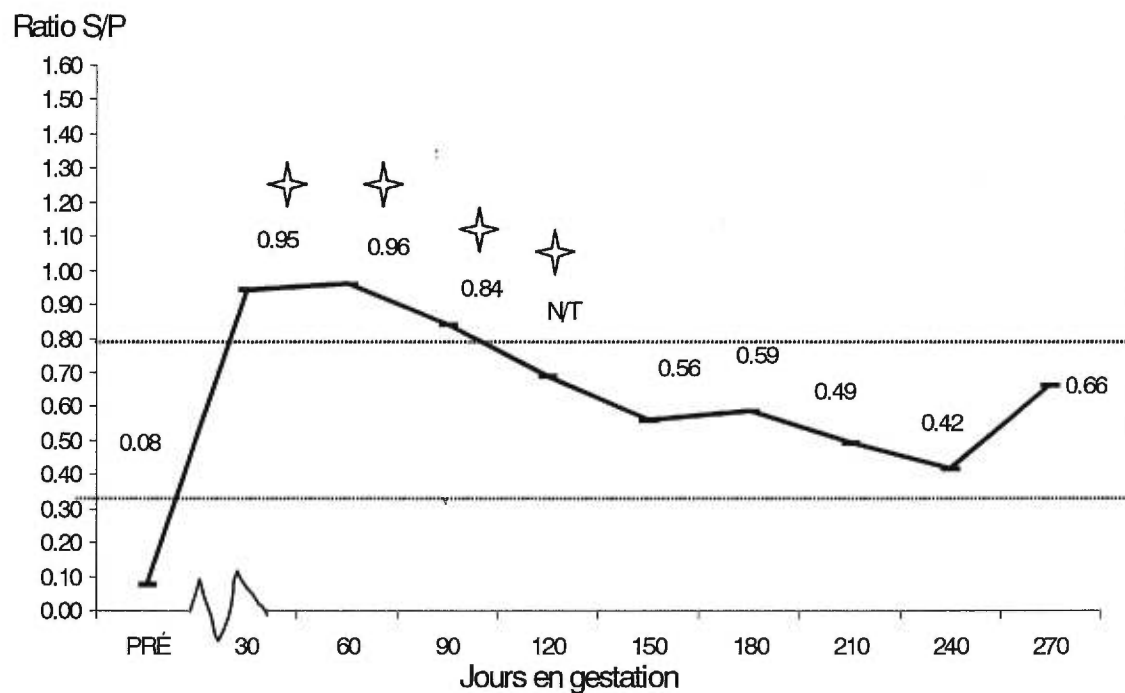


✦ Test ne respectant le critère d'inclusion défini

~ Intervalle du test Pré-implantation et du 1^{er} test à 30 jours de gestation : 34 jours

N/T Test manquant

Figure 3 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 135JM du groupe A exclue du calcul de la transmission verticale.

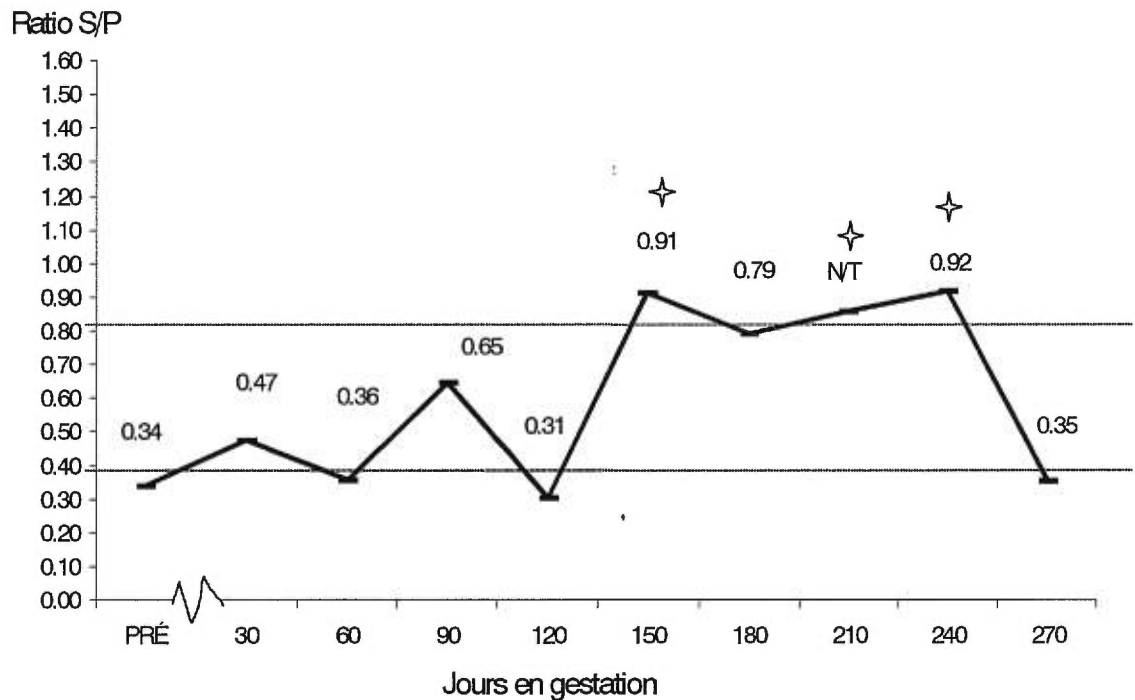


✦ Test ne respectant le critère d'inclusion défini

~ Intervalle du test Pré-implantation et du 1^{er} test à 30 jours de gestation : 151 jours

N/T Test manquant

Figure 4 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 1387-R2 du groupe A exclue du calcul de la transmission verticale.

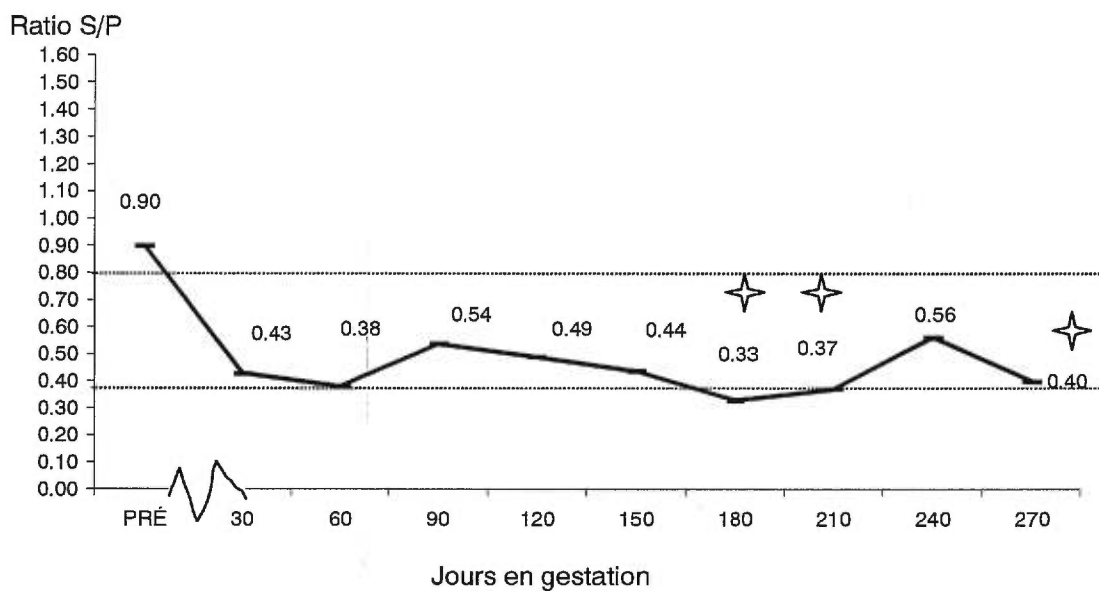


✦ Test ne respectant le critère d'inclusion défini

~ Intervalle du test Pré-implantation et du 1^{er} test à 30 jours de gestation : 22 jour

N/T Test manquant

Figure 5 - Profil sérologique avant implantation et au cours de la gestation pour la receveuse 37 du groupe C exclue du calcul de la transmission verticale.

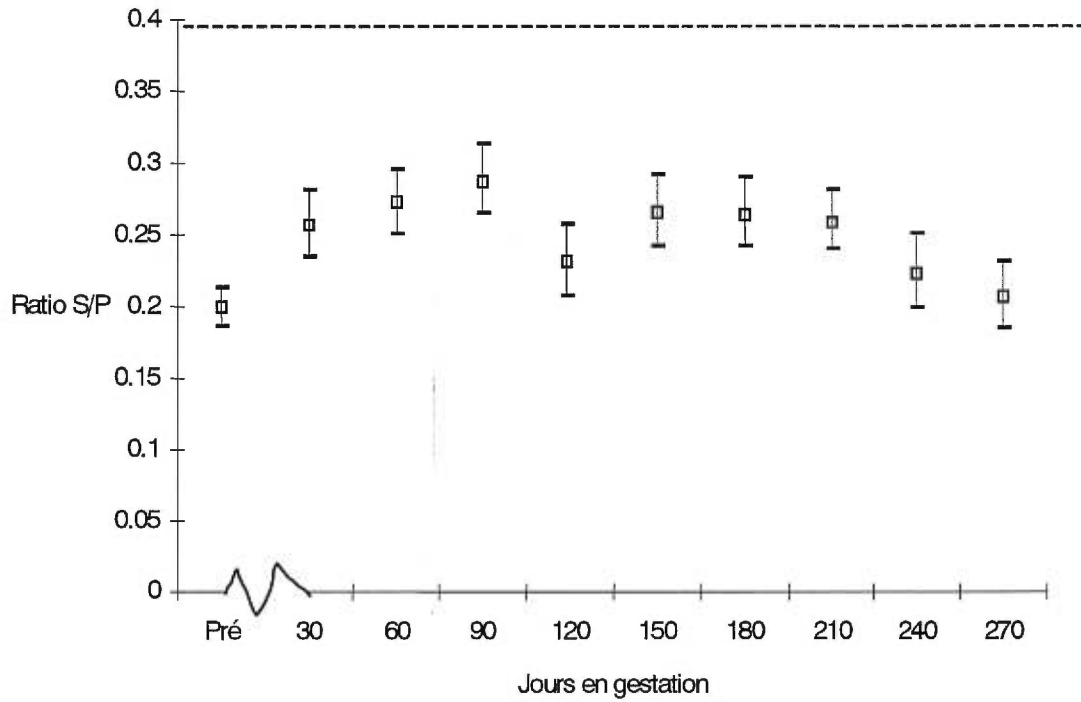


✦ Test ne respectant le critère d'inclusion défini

~ Intervalle du test Pré-implantation et du 1^{er} test à 30 jours de gestation : 50 jours

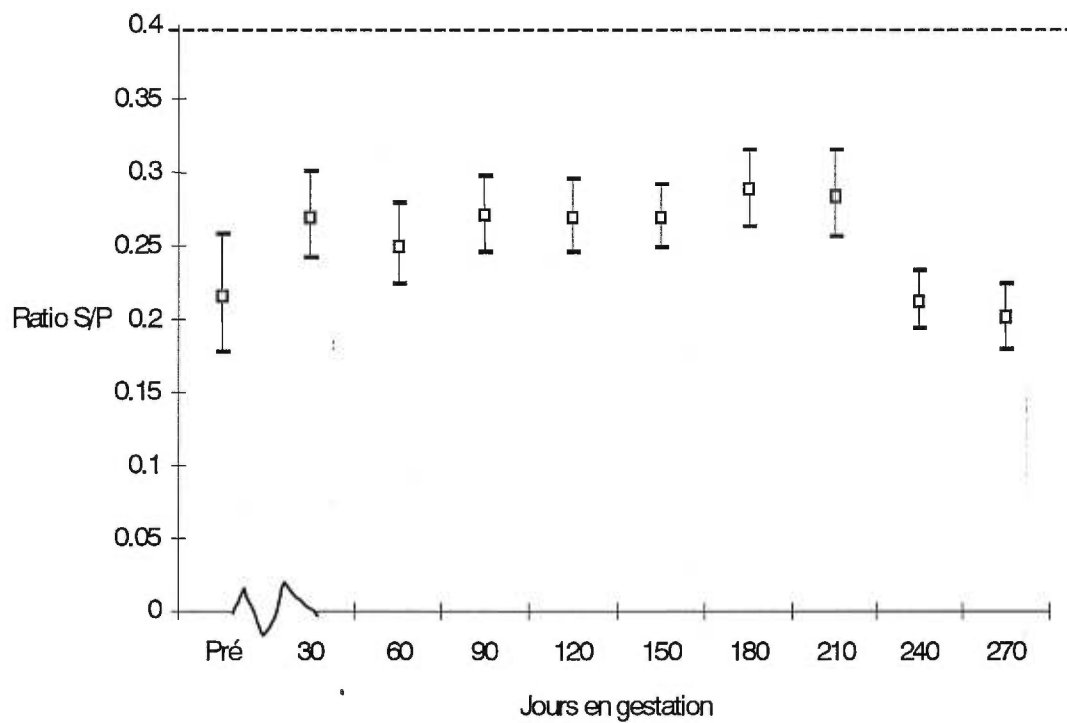
N/T Test manquant

Figure 6 - Profil sérologique mensuel moyen avec erreur type de la moyenne pour les receveuses gravides du groupe A rassemblées en vue de déterminer si la transplantation embryonnaire est une moyen efficace pour prévenir la transmission verticale de *N. caninum*.



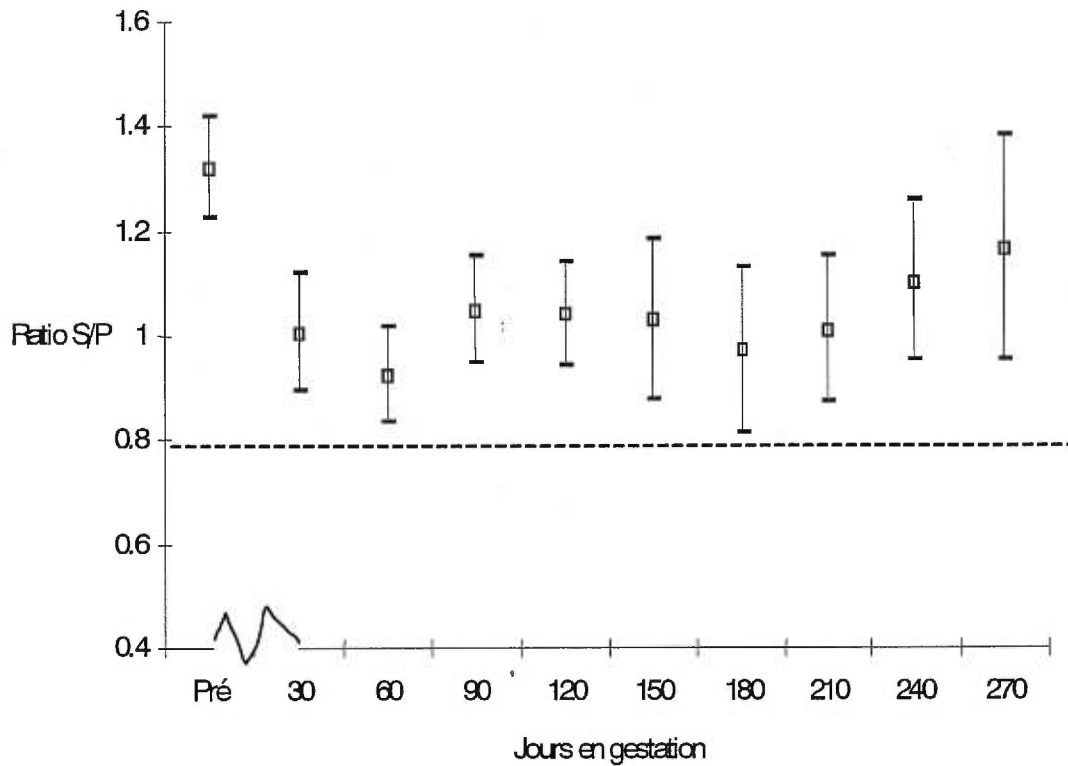
Intervalle moyen du test Pré-implantation et du 1^{er} test à 30 jours de gestation :
 97 ± 66 jours

Figure 7 - Profil sérologique mensuel moyen avec erreur type de la moyenne pour les receveuses gravides du groupe B rassemblées en vue de déterminer si la transplantation embryonnaire est une moyen efficace pour prévenir la transmission verticale de *N. caninum*.



Intervalle moyen du test Pré-implantation et du 1^{er} test à 30 jours de gestation : 105 ± 56 jours

Figure 8 - Profil sérologique mensuel moyen avec erreur type de la moyenne pour les receveuses gravides du groupe C rassemblées en vue de déterminer si la transplantation embryonnaire est une moyen efficace pour prévenir la transmission verticale de *N. caninum*.



~ Intervalle moyen du test Pré-implantation et du 1^{er} test à 30 jours de gestation :
 81 ± 59 jours

Discussion

Prévention de la transmission verticale

Les résultats obtenus au cours de cette étude confirment que la transplantation embryonnaire, incluant le lavage et le traitement à la trypsine des embryons récoltés selon la procédure recommandée par l'IETS et le dépistage sérologique des receveuses constitue une méthode efficace pour prévenir la transmission verticale de *N. caninum*. Tous les veaux nés du groupe A, constitué de receveuses négatives au test sérologique pré-implantation, ayant reçu un embryon provenant d'une donneuse séropositive, sont nés sérologiquement négatifs et ont été considérés exempts de l'infection. L'absence d'anticorps ne constitue pas une preuve absolue de l'absence de l'infection. Il serait possible qu'une infection en fin de gestation n'ait pas eu le temps de provoquer une séroconversion au moment du test pré-colostral. Cette hypothèse a été évoquée pour expliquer les séroconversions survenant en période néonatale chez des veaux nés de mères séropositives¹⁴. Paré *et al* ont observé que 5% des séronégatives de leur étude avaient donné naissance à des veaux séropositifs au test ELISA pré-colostral⁶⁵. Par contre, Anderson *et al* n'ont obtenu aucun veau séropositif à la naissance provenant de mères elles-mêmes nées séronégatives. Ces naissances confirmaient *a posteriori* l'absence d'infection de leurs mères. La littérature ne rapporte aucun cas de séroconversion en période néonatale chez des veaux nés de mères séronégatives. L'absence d'anticorps à la naissance chez des veaux provenant de mères séronégatives pourrait donc, raisonnablement, être considérée comme une preuve de l'absence d'infection.

Le groupe B, groupe contrôle de l'étude, dont les receveuses séronégatives avaient reçu les embryons de donneuses séronégatives traités selon la même procédure, n'a pas produit, comme prévu, de veaux infectés. Les embryons provenant de donneuses séropositives présentent donc un comportement biologique post-implantation identique aux embryons provenant de donneuses séronégatives. Les profils sérologiques en cours de gestation des receveuses des groupes A et B n'ont pas été différents. Le statut sérologique pour *N. caninum* des donneuses d'embryons n'a pas influencé le statut des veaux nés des receveuses séronégatives.

Dix receveuses séropositives au test de dépistage pré-implantation sont devenues gravides. Huit veaux issus de ce groupe ont été testés à la naissance par examen sérologique ou analyse histopathologique et immunohistochimique des tissus. Six veaux ont été considérés comme infectés à la naissance en s'appuyant sur ces analyses. Ce groupe a donc confirmé le risque élevé d'infection congénitale lorsque la mère porteuse est infectée par *N. caninum*. Le profil sérologique moyen des receveuses du groupe C montre que ces receveuses ont maintenu leur statut séropositif pendant toute la gestation. Cinq gestations du groupe C provenaient d'embryons dont la donneuse était séropositive et 3 gestations de donneuses séronégatives. Les résultats des groupes A et B ayant démontré l'absence d'influence du statut sérologique de la donneuse, les gestations des receveuses séropositives ont été rassemblées dans le seul groupe C. Quatre veaux provenant d'embryons de donneuses séropositives et 2 veaux provenant des donneuses séronégatives sont nés séropositifs. Un veau de chaque catégorie d'embryons est née séronégative. Les résultats de gestation du groupe C supportent ainsi les résultats observés dans les groupes A et B sur l'absence d'influence du statut sérologique de la donneuse sur le statut des veaux nés.

Le taux de transmission verticale observé au cours de l'étude parmi les receveuses infectées a été de 75%: une valeur comparable à celles qui ont été rapportées jusqu'à maintenant dans la littérature^{64,65,131,133}. Les deux veaux négatifs du groupe C sont un avorton de 141 jours négatif à l'histopathologie et à l'IHC et un mâle séronégatif à la naissance. L'étude de Hiatela a observé que 5% des veaux nés de mères séropositives ont séroconverti après la naissance pendant la période néonatale¹⁴. Les auteurs ont conclu que ces séroconversions provenaient probablement d'infections *in utero* tardives. Il est donc possible que 5% des veaux infectés *in utero* ne soient pas identifiables par un test sérologique pré-colostral. L'élimination tôt après la naissance du seul veau vivant séronégatif provenant du groupe C n'a pas permis de vérifier la possibilité d'une séroconversion post-natale qui, le cas échéant, aurait augmenté le taux de transmission verticale de ce groupe. La valeur obtenue pour le taux de transmission verticale dans cette étude doit donc être interprétée comme une valeur minimale. Le taux de transmission verticale observée à la naissance parmi les veaux issus de receveuses séronégatives, considérées exemptes de l'infection, a été nul.

Quatre receveuses ayant produit des veaux négatifs, 1 du groupe C et trois du Groupe A, ont été exclues des résultats de l'étude parce qu'elle n'ont pas respecté les critères d'inclusion fixés pour le calcul de la transmission verticale: leur statut sérologique pré-implantation n'a pas été maintenu en cours de gestation (Table 2). La première receveuse exclue du groupe A a présenté un ratio S/P supérieur à 0,79 et avait un test mensuel manquant (test 180). Son veau était séronégatif à la naissance avec un ratio S/P pré-colostral de 0,09. Les deux autres receveuses du groupe A ont eu respectivement 2 et 3 tests supérieurs à 0,79 au cours de leur gestation et ont mis bas deux veaux femelles séronégatifs à la naissance. La première génisse (Tableau II: veau de 135JM), née séronégative a été testée à l'âge de 6 mois et a présenté un ratio S/P de 0,85. L'autre génisse (veau de 1387-R2) a été éliminée en mai 2000, à l'âge de 5 mois sans avoir été testée. La séroconversion post-natale de la génisse provenant de la 135JM peut être due à une infection *in utero* tardive ou à une infection post-natale par exposition à des oocystes d'un hôte définitif. Un suivi sérologique plus serré en période néonatale aurait permis de préciser le moment de cette séroconversion mais le statu sérologique de sa mère receveuse n'a été disponible que 3 mois après sa naissance.

Trois hypothèses peuvent expliquer le comportement sérologique des deux receveuses du groupe A qui ont été exclues après avoir présenté des tests supérieurs à 0,80. Parmi les 172 génisses nées séropositives et réexaminées périodiquement par Hietala *et al* au cours de leur croissance, 4% sont devenues séronégatives durant des périodes de 9 à 18 mois entre leur naissance et l'âge de 25 mois¹⁴. Ces deux receveuses pourraient ainsi appartenir à ce groupe de 4% de séropositives qui ne maintiennent pas leur statut pendant toute leur période de croissance. Deuxièmement, le taux de transmission horizontale dans les troupeaux où l'infection existe a été estimé à moins de 2%^{13,14}. L'apparition de 1 ou 2 nouvelles infections dans le groupe de receveuses qui était à l'étude serait ainsi dans l'ordre prévisible des choses. Troisièmement, une erreur de manipulation de l'échantillon au moment du 1^{er} test de dépistage pourrait aussi avoir catégorisé ces receveuses dans le mauvais groupe expérimental. L'écart important entre le résultat du test de dépistage (0,08) et le résultat du 1^{er} échantillon en cours de gestation (0,95), séparés de 140 jours, pour une de ces 2 receveuses semble favoriser cette 3^e hypothèse. La 3^e receveuse exclue du groupe A présentait à la fois un ratio S/P plus grand que 0,79 et un test manquant en

cours de gestation. L'erreur de manipulation du test 240 est probablement en cause aussi pour cet animal.

Le veau du groupe C dont la receveuse (Figure 3, p.56 et Tableau V, p.54) a été exclue était un mâle qui a été éliminé en jeune âge. On doit noter cependant qu'aucun des sérums prélevés en cours de gestation n'a corroboré le résultat du test de dépistage. L'erreur de manipulation de l'échantillon du test de dépistage, ayant entraîné la mauvaise catégorisation de cette receveuse, est vraisemblable pour ce cas aussi.

Les résultats de cette étude confirment que le risque d'infection congénitale par *N. caninum* est lié au statut de la mère. Compte tenu des coûts engendrés par la transplantation embryonnaire et du risque élevé de transmission de l'infection, il est impératif de vérifier le statut sérologique pour *Neospora* des femelles destinées à recevoir un embryon. Les embryons transplantés lors de la récolte sont particulièrement à risque par rapport aux embryons congelés. La sélection des receveuses synchronisées avec la donneuse est souvent faite à la dernière minute selon les disponibilités et cela, au détriment des mesures de biosécurité telles que le dépistage sérologique pour la leucose et la néosporose. Les règles de biosécurité entourant les receveuses implantées avec un embryon décongelé sont plus facilement suivies compte tenu du caractère prévisible de l'événement.

Beaucoup d'éleveurs doivent acheter un certain nombre de receveuses pour répondre à leurs besoins. La séroprévalence parmi les 437 femelles réparties dans les 11 troupeaux considérés pour l'étude était de 9,8% en utilisant un ratio S/P de 0,60 pour la séropositivité (Tableau III, p.52). Paré *et al* ont observé une prévalence de 7% dans leurs troupeaux contrôle (sans avortement rapporté à *Neospora*) et de 16,6% pour l'ensemble de la population étudiée (3 059 vaches provenant de 46 troupeaux différents)⁷. À titre de comparaison, la séroprévalence chez 268 taures au moment de leur entrée dans un parc de receveuses destinées à la transplantation était de 23% en utilisant le même seuil S/P (Tableau III)⁷. Ces taures provenaient de toutes les régions du Québec et de l'Est de l'Ontario et ont été échantillonnées, au moment de leur entrée dans le troupeau, de août 1998 à août 1999. La différence de séroprévalence était significative ($p < 0,0001$) entre les troupeaux échantillonnés pour l'étude et le troupeau de taures achetées pour l'implantation d'embryons. Une observation similaire a été

⁷ Dossiers de Clinique Vétérinaire St-Louis-Embryobec

rapportée dans la littérature⁷⁹. Dans cette étude sur la séroprévalence de *N. caninum* dans 43 troupeaux d'Espagne, les chercheurs ont observé un écart de plus de 7% entre les animaux élevés sur la ferme et ceux qui avaient été achetés. L'écart de séroprévalence observé entre le groupe destiné à l'étude, composé entièrement des additions naturelles de chacun des troupeaux, et le groupe de taures obtenues de dizaines de troupeaux différents sur le marché pourrait être la conséquence de la prise de conscience croissante des éleveurs de la réalité de l'infection à *Neospora* et de leur effort pour contrôler l'infection dans leurs troupeaux. Il est même possible que cet écart de séroprévalence soit à la hausse depuis les 2 dernières années en considérant l'attention portée par un nombre croissant d'éleveurs à *N. caninum*.

Nos données suggèrent qu'au moins 1 receveuse sur 4 disponibles sur le marché, en utilisant le seuil de séropositivité proposé pour le test ELISA utilisé^o pourrait transmettre l'infection par *N. caninum* à l'embryon qu'elle aurait reçu par transplantation. Les éleveurs qui doivent acheter une partie ou la totalité de leurs receveuses sont par conséquent dans une situation délicate. Au coût déjà élevé de ces receveuses, ils doivent ajouter le coût de la sélection (coût du dépistage et d'élimination des séropositives) en vue d'éviter le risque d'introduire *Neospora* dans leur élevage, d'une part, et de diminuer le risque de pertes de gestations de leurs embryons, d'autre part.

Interprétation des résultats du test ELISA

Le dépistage des anticorps contre *N.caninum* par la technique ELISA permet l'évaluation d'un grand nombre d'animaux à un coût abordable. Dans une revue parue en 1998 des différents tests sérologiques disponibles, Bjorkman concluait que la catégorisation adéquate des animaux testés avec un seul test représentait un défi important⁹³. Le seuil d'interprétation d'une réaction positive est donc une donnée critique pour l'évaluation des femelles destinées à l'implantation d'embryons. De plus, la variabilité du titre d'anticorps contre *N. caninum* complique l'interprétation en considérant que, le plus souvent, un seul test sera effectué pour catégoriser correctement les candidates à la transplantation.

Dans le but de maximiser la sensibilité et la spécificité du test ELISA utilisé dans cette étude, le seuil S/P retenu était moins de 0,41 pour les séronégatives et plus de 0,79

^o Biovet, St-Hyacinthe, Québec, Canada

pour les séropositives. La différence significative obtenue entre les taux de transmission des groupes A ou B et C a permis de démontrer la sécurité de cette règle d'interprétation. Cependant, on doit signaler (Tableau III) que cette règle a entraîné l'exclusion de 72 (16,5%) receveuses sur les 437 testées. Dans le troupeau de taures commerciales, ce groupe représentait 27,2% des 268 taures testées (Tableau III). L'application de cette règle en pratique entraînerait une augmentation importante du coût de la transplantation embryonnaire. Néanmoins, la valeur commerciale du sujet produit par transplantation embryonnaire est le principal facteur déterminant de la décision à prendre au moment de l'implantation. La validation scientifique de ce seuil d'interprétation ($<0,41$ = exempt de l'infection) permettra tout de même de faciliter le travail des médecins vétérinaires qui ont à faire des recommandations sur cette question.

L'utilisation de receveuses dont le ratio S/P, sur la base d'un test unique, est situé dans la fourchette $>0,4$ et $<0,8$ constitue un risque difficile à évaluer. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour clarifier cette question. À titre indicatif, 6 receveuses implantées par erreur et dont le statut sérologique appartenait à cet intervalle S/P, ont produit 6 veaux au cours de l'étude (Tableau II). Cinq de ces veaux, dont 3 femelles, sont nés séronégatifs et le sixième, un mâle (veau de la 354-R2), présentait un ratio S/P de 0,66. Deux particularités concernent ce veau positif. La receveuse l'ayant porté présentait un titre de 0,75 avant l'implantation et s'est maintenue au-dessus de 0,80 pendant toute la gestation. Les autres veaux nés séropositifs au cours de cette étude présentaient un ratio S/P entre 1,16 et 1,65 : ce veau était donc le seul à présenter un ratio S/P intermédiaire à 0,66. Deux des veaux de ce groupe de 6 (receveuses 609 et 83) sont des femelles qui sont demeurées dans leurs troupeaux respectifs et seront échantillonnés pendant leur période de croissance pour déterminer leur statut sérologique.

Le risque d'utiliser une receveuse appartenant à l'intervalle 0,41-0,79 pourrait être estimé à partir du statut sérologique d'autres membres de sa famille lorsque c'est possible ou par un 2^e échantillonnage dans un intervalle de temps qui demeure à déterminer. Les résultats que nous avons obtenus laissent croire qu'un certain nombre de receveuses dont le ratio S/P se situe entre 0,41 et 0,79 ne sont pas infectées puisque 5 des 6 veaux testés au cours de l'étude étaient séronégatifs à la naissance ou négatifs à l'analyse histopathologique et immunohistochimique des tissus (Tableau II).

La présence du veau séropositif nous amène tout de même à conclure qu'elles représentent un risque de transmission de l'infection et que les conséquences de leur utilisation doivent être évaluées lucidement.

Résultats du transfert d'embryon

Le statut sérologique pour *N. caninum* des donneuses n'influence pas le nombre d'embryons viables produits. La différence dans le nombre d'embryons par récolte entre les 2 groupes de donneuses (séropositives: 11,5 embryons et séronégatives 7,5 embryons) n'est pas significative ($p=0,63$). La présence de tachyzoïtes dans les sécrétions utérines avant le 7^e jour de gestation n'a pas été investiguée. L'intégrité de la zone pellucide est aussi un élément de protection important pour la santé de l'embryon au stade morula et jeune blastocyste¹³⁷. Les résultats obtenus, bien que supérieurs à la moyenne rapportée de 5,85^p embryons par récolte, et l'absence de différence significative ($p=0,21$) entre les deux groupes de donneuses correspondent aux observations rapportées par les médecins vétérinaires praticiens du Québec impliqués en transplantation embryonnaire. L'âge et le statut reproducteur des donneuses pourrait expliquer la moyenne élevée d'embryons viables obtenue. Les donneuses séropositives avaient en moyenne 2,8 lactations et les donneuses séronégatives, 3,5 lactations. Aucune des donneuses récoltées pendant l'étude ne présentait un problème d'infertilité reconnu au moment de leur inclusion dans l'étude.

Le statut sérologique des receveuses ne semble pas influencer le taux de gestation attendu. En effet, pour les 186 embryons (Tableau IV) produits au cours des 22 récoltes effectuées pendant cette étude, 64% ont conduit à une confirmation de gestation à ± 30 jours. Il n'y avait pas de différence significative entre le taux de gestation des embryons provenant des donneuses séropositives (66%) et celui des embryons provenant des donneuses séronégatives (60%). Aucune étude n'a comparé le taux de réussite des inséminations selon le statut sérologique à *N. caninum*. La banque de données de l'association pour l'Amélioration de la Santé des Troupeaux Laitiers du Québec (ASTLQ) a rapporté un taux de réussite à la 1^{ère} insémination de 43% pour les pluripares et de 61% pour les nullipares^q. Les taux de gestation obtenus

^p Summary of Canadian embryo transfer activity for 1998, prepared by Dr. Reuben Mapletoft, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada

^q Rétrospective de la banque de données de l'ASTLQ, Février 1998

dans cette étude n'indiquent aucun effet négatif sur cet indice imputable au statut sérologique des receveuses pour *N. caninum*.

Trois (30%) gestations ont été perdues par mortalité embryonnaire ou avortement parmi les receveuses séropositives par rapport à 9% chez les receveuses séronégatives. Bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative en raison de la taille de l'échantillon, la tendance observée suggère une relation avec le statut sérologique de la mère conformément à ce qui a été rapporté précédemment^{66,76,78,80,107,134}. La plupart de ces études ont estimé que le risque d'avorter était 2 à 3 fois plus grand pour les séropositives. Thurmond *et al* ont même observé que le risque d'avorter pouvait augmenter jusqu'à 7.4 fois chez les nullipares et jusqu'à 5.6 fois après le 1^{er} vêlage⁷⁶.

La diminution des pertes en cours de gestation (mortalités embryonnaires et avortements) est donc un motif supplémentaire pour justifier le dépistage sérologique systématique parmi les candidates au transfert d'embryon. Sept des 8 mortinatalités observées pour les 3 groupes expérimentaux sont survenues chez des primipares séronégatives. Les données de notre étude ne permettent pas de relier la mortinatalité au statut sérologique des receveuses. Cette source de pertes diminue néanmoins pour l'éleveur les gains réalisés par le taux de gestation supérieur obtenu lors de l'implantation des nullipares. Elle vient aussi s'ajouter, dans le cas des receveuses achetées, aux autres pertes liées à leur statut sérologique.

La participation des producteurs

Huit des 9 troupeaux qui ont participé à cette étude sont desservis par la Clinique Vétérinaire St-Louis–Embryobec (CVSL). Le neuvième troupeau fait partie de la clientèle du Dr. André Clavet de la région du Témiscouata au Québec. Deux critères ont prévalu parmi les troupeaux de la CVSL : la disponibilité d'un dossier informatisé DSA^r sur le troupeau et la connaissance d'animaux positifs à *N. caninum* à partir des dossiers de la CVSL. Six troupeaux dont les dossiers sont informatisés et qui sont suivis mensuellement par l'auteur depuis au moins 7 ans ont participé à l'étude. Dans deux autres troupeaux identifiés au départ, le dépistage sérologique n'a pas permis de trouver suffisamment d'animaux séropositifs et disponibles pour constituer les groupes

^r Logiciel DSA, ASTLQ Inc., St-Hyacinthe, Qc

expérimentaux de l'étude. Deux troupeaux dont les dossiers ne sont pas informatisés sur DSA ont pu identifier suffisamment d'animaux séropositifs pour les objectifs de l'étude. Ces deux éleveurs, connus de l'auteur depuis longtemps, ont été retenus parce qu'ils présentaient une espérance de collaboration équivalente à celle des 6 autres troupeaux participants. Dans chacun des troupeaux, le choix des donneuses et des receveuses a été laissé à la discrétion des éleveurs à partir de la liste d'animaux qui rencontraient les critères sérologiques d'inclusion.

Toutes les receveuses implantées ont été identifiées dans un fichier DSA. Pour celles qui provenaient d'un troupeau avec un dossier DSA, la fiche était simplement transférée dans un fichier créé pour la conduite de l'étude. Celles qui provenaient d'un troupeau sans dossier DSA étaient identifiées dans le fichier de l'étude. Toutes les opérations effectuées au cours de l'étude étaient consignées dans le fichier DSA dont les fonctionnalités ont assisté à la préparation des listes d'actions à effectuer. Les résultats des tests sérologiques et des gestations y ont également été consignés.

Chaque éleveur a été informé personnellement des objectifs de l'étude et de sa contribution attendue. En plus d'assurer la disponibilité des animaux expérimentaux pour les actions prévues, ils étaient responsables de l'exécution des protocoles de superovulation et de synchronisation, de l'observation des événements (chaleur, avortement, maladies) et de transmettre l'information au chercheur. Tous ces éleveurs étaient familiers depuis longtemps avec les protocoles de synchronisation des chaleurs utilisés au cours de l'étude et 6 d'entre eux utilisent régulièrement la transplantation embryonnaire dans leur élevage et étaient donc déjà familiers avec le protocole de superovulation.

Ils ont aussi été entraînés, sur une base volontaire, à effectuer les prélèvements sanguins sur les receveuses en cours de gestation et sur les veaux à la naissance. Les prélèvements mensuels sur les receveuses ont été effectués par le producteur ou l'auteur au moment de sa visite mensuelle dans le troupeau. Un seul des éleveurs s'est chargé de tous les prélèvements à chaque fois qu'il en était avisé par l'auteur. Seulement 3 veaux sur un total de 77 nés vivants ont été prélevés par un médecin vétérinaire.

L'identification des sujets testés était effectuée sur les tubes qui étaient laissés à la température de la pièce jusqu'à leur récupération par l'auteur au cours de la journée du

prélèvement. Les échantillons étaient maintenus au réfrigérateur pendant leur transport et jusqu'à la séparation des sérums. Les tubes de sérum, à bouchon vissé pour congélateur, étaient identifiés du nom ou du numéro de l'animal et daté pour le prélèvement. Le nombre de jours en gestation et un numéro de séquence était assigné à chaque prélèvement dans la banque de sérums. À chaque mois au cours de l'étude, les sérums accumulés au congélateur à -20°C ont été transportés au Pavillon Dessaulles de la Faculté de Médecine Vétérinaire pour entreposage à -70°C .

L'éloignement entre les lieux de prélèvement et la disparité entre les moments de prélèvement pour chaque animal de l'étude a compliqué la procédure d'échantillonnage. L'utilisation du fichier DSA pour les animaux de l'étude a permis à l'auteur de tenir à jour les prélèvements à effectuer. À chaque semaine, une liste de tous les animaux à échantillonner était générée par DSA et permettait à l'auteur de vérifier les actions à effectuer (confirmations ou reconfirmations de gestation, prélèvements, vêlages à surveiller, etc.). Tous les veaux nés (incluant les avortements et les gestations interrompues sans observation de fœtus) ont été identifiés par un numéro dans un fichier DSA parallèle dans lequel étaient consignés les résultats des tests effectués à la naissance.

Des mesures compensatoires avaient été prévues pour les éleveurs participants. Premièrement, les génisses séropositives nées du groupe C étaient associées à une compensation de \$500. Deuxièmement, chaque éleveur recevait, à son choix, \$40 pour chaque sérum pré-colostral avec une GGT inférieure à 50 UI/L ou deux supports à pis pour prévenir l'ingestion de colostrum avant le prélèvement sanguin. Aucune compensation n'a été donnée pour la participation des éleveurs aux échantillonnages mensuels des receveuses gravides.

La collaboration obtenue de la part des éleveurs participants et l'utilisation du logiciel DSA ont facilité l'exécution de ce protocole qui aurait autrement nécessité des ressources budgétaires plus importantes mettant en péril sa réalisation. L'intérêt des éleveurs provenait d'abord de la valeur pour eux des sujets générés par la transplantation embryonnaire, mais aussi de la possibilité de produire des sujets exempts de l'infection dans certain cas. De plus, pour la plupart d'entre eux, la possibilité d'acquérir de nouvelles connaissances, qu'elles soient du domaine de la transplantation embryonnaire ou de la santé animale, a semblé être générateur

d'enthousiasme. Leur contribution a permis à l'étude de bénéficier de leur expertise pour effectuer un bon nombre des actions nécessaires à sa réalisation. Le fait que les animaux expérimentaux de cette étude, pour la plupart, demeurent disponibles permettra de vérifier certains éléments d'intérêt qui découlent de l'analyse des résultats.

Conclusion

La transplantation embryonnaire, incluant la procédure de lavage et de traitement à la trypsine des embryons viables, est une mesure efficace pour la prévention de la transmission *in utero* de *N. caninum*. Au-delà des rapports anecdotiques sur la question, cette étude produit la première confirmation scientifique de l'efficacité de cette méthode. De plus, la transplantation embryonnaire devient le seul moyen connu pour prévenir la transmission verticale de *N. caninum* à partir d'une femelle infectée.

□ Impact de l'étude pour l'industrie

Des familles de mérite génétique supérieur pourront assurer leur développement en évitant de maintenir ou d'introduire dans la lignée l'infection à *N. caninum*. Le commerce est le principal objectif des activités des éleveurs de bétail de race. La transplantation embryonnaire, depuis son apparition, y a d'ailleurs trouvé sa plus importante niche de marché. Cette technologie procurera dorénavant un moyen sécuritaire de mettre en marché des individus dont le mérite génétique est d'intérêt commercial.

□ Méthode de biosécurité éprouvée

Cette méthode constitue jusqu'à maintenant le seul moyen éprouvé de produire des veaux exempts de l'infection à partir de femelles infectées. La néosporose s'ajoute ainsi à la liste des maladies pour lesquelles la transplantation embryonnaire et la procédure de lavage et de trypsinisation définie par l'IETS est un moyen efficace de prévention. Compte tenu de l'importance épidémiologique de la transmission *in utero* chez les bovins et de la disponibilité de la transplantation embryonnaire au Québec, cette confirmation est un pas important dans le contrôle de l'infection à *N. caninum*.

□ Le risque d'introduction par les achats

Cette étude a permis aussi de démontrer l'importance du risque d'introduire *N. caninum* dans une lignée exempte ou d'augmenter la prévalence dans un troupeau par le biais de l'utilisation de receveuses de statut inconnu. Pour les éleveurs utilisant le transfert embryonnaire sur une grande échelle, la disponibilité des receveuses est un facteur limitant. Ces éleveurs sont donc particulièrement à risque pour les maladies comme la

néosporose, la leucose, le BVD et la paratuberculose. Pour la néosporose seulement, environ 25% des receveuses disponibles sur le marché présentent un danger potentiel. Le dépistage sérologique systématique de la néosporose est donc une mesure à recommander fermement pour tous les utilisateurs de la transplantation embryonnaire. Les producteurs qui s'approvisionnent sur le marché pour des sujets de remplacement bénéficieraient également de cette mesure de biosécurité, compte-tenu de la prévalence observée parmi ces animaux, pour diminuer les pertes de gestations dans leurs troupeaux et les conséquences qu'elles entraînent sur la production laitière.

□ Dépistage de l'infection

Les résultats de cette étude proposent les fondements scientifiques d'une stratégie de prévention de l'introduction de la néosporose. Les seuils d'interprétation du ratio S/P pour définir le statut d'une receveuse, pour le test ELISA utilisé au cours de l'étude, ont permis de classer sans erreur tous les animaux des groupes expérimentaux. L'intervalle $> 0,41$ et $< 0,79$ devra cependant recevoir l'attention des chercheurs en considérant qu'il implique de 15% à 30% des candidates à l'implantation et que les données recueillies sur 6 gestations au cours de l'étude montrent que le risque de générer des veaux infectés existe dans ce groupe.

L'interprétation du seuil de séropositivité est une décision critique pour la mise au point et l'utilisation de tout test clinique. L'analyse des données sérologiques cumulées sur chacune des receveuses au cours de cette étude permettra de mieux cerner la variabilité des niveaux d'anticorps au cours de la gestation. Elle permettra également d'apprécier la variabilité du test ELISA utilisé. En pratique, cette analyse permettra d'améliorer l'interprétation du test lui-même et les recommandations qui sont faites aux éleveurs de bovins laitiers par les médecins vétérinaires praticiens.

Le dépistage précoce de la néosporose présente un intérêt croissant pour l'ensemble de l'industrie. La confirmation des rapports liant la néosporose à d'autre type de pertes de production, comme la production laitière¹³⁸, l'élimination anticipée^{69,121} et la diminution des performances de reproduction⁶⁹ autre que l'avortement ne fera qu'augmenter cet intérêt. En 1992, les frais associés aux animaux de remplacement représentaient 27,8% (8,76\$/hl) des coûts réels totaux de la production de lait au Québec¹³⁹. L'identification précoce des animaux porteurs de l'infection et leur élimination avant d'avoir occasionné des frais d'élevage permettrait une diminution à un

coût plus acceptable de la prévalence de l'infection et des pertes qu'elle occasionne pour les troupeaux commerciaux. Les données de l'étude supportent les rapports publiés jusqu'à maintenant sur la validité de l'échantillonnage pré-colostral des veaux naissants pour le dépistage précoce de *N. caninum*¹³¹.

Orientation de la recherche sur Neospora

Les pertes causées par la néosporose pour les troupeaux dont la vocation première est la production laitière doivent être vérifiées et documentées. Les effets sur la production laitière, sur l'élimination prématurée, sur les pertes de gestation et les performances de reproduction en général ont fait l'objet de rapports contradictoires jusqu'à maintenant. Les producteurs et les intervenants en production bovine, sur la base de ces données, pourraient ainsi mieux définir les stratégies de contrôle à mettre en place ou à recommander.

La présence de tachyzoïtes de *N. caninum* dans le milieu utérin au début de la gestation n'a pas été investiguée jusqu'à maintenant. La procédure de lavage et de trypsinisation qui a été testée au cours de cette étude pourrait être évitée si la preuve de leur absence ou de l'absence de risque de contamination du liquide de récolte était faite. Cette procédure entraîne des coûts supplémentaires qui ne sont justifiés que si le risque de contamination existe à cette étape de la gestation. Les bradyzoïtes, la forme asexuée la plus résistante de *N. caninum*, meurent rapidement à -20°C ⁵⁰. Par contre, des techniques permettant la survie de tachyzoïtes après congélation sont utilisées pour leur multiplication *in vitro*. La démonstration que les méthodes de congélation utilisées en transplantation embryonnaire ne permettent pas la survie des tachyzoïtes de *Neospora* serait un atout pour la transplantation embryonnaire, compte tenu des coûts additionnels engendrés par la procédure de lavage et de traitement à la trypsine des embryons.

Références

1. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:1269-85.
2. Bjerkas I, Mohn SF, and Presthus J. Identified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 1984;70 271-4.
3. Dubey JP. A review of *Neospora caninum* and *Neospora*-like infections in animals. *J of Protoz Res* 1992;2(2):40-52.
4. Lindsay DS and Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res* 1989;50:1981-3.
5. Thilsted JP, Dubey JP. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diag Invest* 1989;1(3):205-9.
6. Shivaprasad HL, Ely R, Dubey JP. A *Neospora*-like protozoon found in an Aborted bovine placenta. *Vet Parasitol* 1989;34:145-8.
7. Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 1998;213(11):1595-8.
8. Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1999;84(3-4):349-67.
9. French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1691-704.
10. Dubey JP. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214(8):1160-3.
11. Uggla A, Stenlund S, Holmdahl OJ, Jakubek EB, Thebo P, Kindahl H, Bjorkman C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol* 1998;28(9):1467-72.

12. 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(6):464-7.
13. Davison HC, Otter A, and Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 1999;29:1683-9.
14. Hietala SK, Thurmond MC. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1669-76.
15. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998;28(9):1473-8.
16. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 1999;82(4):327-33.
17. 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(6):1072-5.
18. Lundén A, Marks J, Maley SW, Innes EA. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunology* 1998;20(11):519-26.
19. Wouda W, Bartels CJM, Moen AR. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenol* 1999;52:233-45.
20. Givens MD, Stringfellow DA. Howard JL, Smyth RA, editors. *Current Veterinary Therapy IV*. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1998; 13, Potential of embryo transfer for infectious disease control. p. 592-5.
21. Robertson I, Nelson RE. Stringfellow DA, Seidel SM, editors. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3 ed. 1111 North Dunlap Avenue, Savoy, Illinois 61874 USA: International embryo transfer Society; 1998; 9, Certification and identification of the embryo. p. 103-34.

22. Bjerkas I and Dubey JP. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1991;21:407-10.
23. Conrad PA, Barr BC , Sverlow KW, Anderson ML, Daft B, Kinde H, Dubey JP, Munson L, Ardans A. In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology* 1993;106(3):239-49.
24. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996;67:1-59.
25. O'Toole D and Jeffrey M. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet Rec* 1987;121:563-6.
26. Dubey JP. Congenital neosporosis in a calf. *Vet Rec* 1989;125:486
27. Dubey JP, Leathers CW, and Lindsay DS. *Neospora caninum*-like protozoan associated with fatal myelitis in newborn calves. *J Parasitol* 1989;75(1):146-8.
28. Parish SM, Maag-Miller L, Besser TE, Weidner JP , McElwain T, Knowles DP, and Leathers CW. Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J Am Vet Med Assoc* 1987;191(12):1599-600.
29. Jardine JE, Last RD. *Neospora caninum* in aborted twin calves. *Journal of the South African Veterinary Association* 1993;64(2):101-2.
30. Otter A, Griffiths IB, Jeffrey M. Bovine *Neospora caninum* abortion in the UK. *Vet Rec* 1993;133(15):375
31. Agerholm JS, Barr BC. Bovine abortions associated with *Neospora* in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica* 1994; 35(4):461-4.
32. Dubey JP, Hartley WJ, and Lindsay DS. Congenital *Neospora caninum* infection in calf with spinal cord anomaly. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:1043-4.
33. Wouda W, Knapen Fv , Sluyter FJH, Koeman JP, Dubey JP, Van den Ingh TS, Van-Knapen F. *Neospora* abortion in cows in the Netherlands. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 1992;117(20):599-602.

34. Obendorf DL and Mason R. *Neospora caninum* infection detected in a bovine aborted fetus. Australian Society of Veterinary Pathology Rep 1990;28 :36-7.
35. Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M, and Yamane I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. Vet Parasitol 1999;86 :71-5.
36. McIntosh DW, Haines DM. Neospora infection in an aborted fetus in British Columbia. Can Vet J 1994;35(2):114-5.
37. Duivenvoorden J, Lusi P. Neospora abortions in eastern Ontario dairy herds. Can Vet J 1995;36(10):623
38. Harmelin A, Perl S , Nyska A, Yakobson B, Shpigel N, Orgad U, Dubey JP. Neosporosis-associated bovine abortion in Israel. Vet Rec 1995;136(3):80
39. Thornton RN, Thompson EJ, Dubey JP. Neospora protozoal abortion in New Zealand cattle. NZ Vet J 1991;39(4):129-33.
40. Wouda W, Visser IJR, Knapen Fv, Van-Knapen F. Bovine protozoal [*Neospora caninum*] abortion. Vet Rec 1992;130(13):279.
41. Holmdahl OJM, Bjorkman C, Uggla A. A case of Neospora associated bovine abortion in Sweden. Acta Veterinaria Scandinavica 1995;36(2):279-81.
42. Ogino H, Watanabe E, Watanabe S, Agawa H, Narita M, Haritani M, Kawashima K. Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. Journal of Comparative Pathology 1992;107(2):231-7.
43. Jardine JE, Wells BH. Bovine neosporosis in Zimbabwe. Vet Rec 1995;137(9):223
44. Anderson ML, Barr BC, Conrad PA, Thurmond MC, Picanso JP, and Dubey JP. Bovine protozoal abortions in California. Bovine Practitioner 1991; 26:102-4.
45. 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(24):602-6.

46. Jardine JE, Last RD. The prevalence of neosporosis in aborted bovine fetuses submitted to the Allerton Regional Veterinary Laboratory. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 1995;62:207-9.
47. Bjorkman C, Alenius S, Manuelsson U, Ugglå A. *Neospora caninum* and Bovine Virus Diarrhoea Virus Infections in Swedish Dairy Cows in Relation to Abortion. *Vet J* 2000;159(2):201-6.
48. McAllister MM. Uncovering the biology and epidemiology of *Neospora caninum*. *Parasitology Today* 1999;15(6):216-7.
49. Dubey JP. *Neospora caninum*: A look at a new *Toxoplasma*-like Parasite of dogs and Other animals. *Comp on Cont Ed Pract Vet* 1990;12(5):653-60.
50. Lindsay DS, Dubey JP, Cole RA, Nuehring LP, Blagburn BL. *Neospora*-induced protozoal abortions in cattle. *Comp on Cont Ed Pract* 1993;15(6):882-9.
51. Lindsay DS, Blagburn BL, and Dubey JP. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J Parasitol* 1992;78:70-2.
52. Lindsay DS and Dubey JP. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J Parasitol* 1990;76:410-3.
53. Dubey JP and Lindsay DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in cats. *J Parasitol* 1989;75(5):765-71.
54. 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(4):441-4.
55. McAllister M, Wills RA, McGuire AM, Jolley WR, Tranas J, Williams ES, Lindsay DS, Bjorkman C, and Belden EL. Ingestion of *Neospora caninum* tissue cysts by *Mustela* species. *Int J Parasitol* 1999;29:531-6.
56. Bartels CJM, Wouda W, Schukken-YH. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenol* 1999;53:247-57.

57. Wouda W, Dijkstra T, Kramer AM, van Maanen C, Brinkhof JM. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol* 1999;29 (10):1677-82.
58. Bergeron, N. Étude épidémiologique des infections à *Neospora caninum* chez les bovins laitiers du Québec 2000; Université de Montréal;
59. Illanes O, Moore A, Pringle J, Saindon A. *Neospora*-induced congenital myelitis and polyradiculoneuritis in a one-month-old Holstein calf. *Can Vet J* 1994;35(10):653-4.
60. Dubey JP, Janovitz EB, Skowronek AJ. Clinical neosporosis in a 4-week-old Hereford calf. *Vet Parasitol* 1992;43(1-2):137-41.
61. Gunning RF, Gumbrell RC, Jeffrey M. *Neospora* infection and congenital ataxia in calves. *Vet Rec* 1994;134(21):558
62. Bryan LA, Gajadhar AA, Dubey JP, Haines DM. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *Can Vet J* 1994;35(2):111-3.
63. Okuda K, Fukutomi T, Ouchi M, Yamakawa M, Kawahara K, Maruno S, Simada A, Umemura T. *Neospora*-like protozoa in four calves with congenital abnormalities. *J Am Vet Med Assoc* 1992;45(11):833-6.
64. Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC, and DeBey B . Congenital transmission of *Neospora caninum* in herds experiencing endemic or epidemic abortion. *Proceedings, American Association of veterinary laboratory diagnosticians* 1995;197
65. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res* 1996;60(2):133-9.
66. Jensen AM, Bjorkman 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(3-4):151-63.
67. Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Bjorkman C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 1999;85(4):227-34.

68. Bjorkman 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(9):1441-4.
69. Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. J Am Vet Med Assoc 1998;213(5):685-90.
70. Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer RE, Sverlow KW, 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(1):113-7.
71. 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 Diag Invest 1992;4(2):223-6.
72. Barr BC, Anderson ML, Blanchard PC, Daft B, Kinde H, Conrad PA. Bovine fetal encephalitis and Myocarditis associated with Protozoal Infections. Vet Path 1990;27:354-61.
73. Anderson ML, Barr BC, Conrad PA. Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. Vet Clin N Am, Food Animal Practice 1994;10(3):439-61.
74. Obendorf DL, Murray N, Veldhuis G, Munday BL, Dubey JP. Abortion caused by neosporosis in cattle. Aust Vet J 1995;72(3):117-8.
75. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, *et al.* Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J Am Vet Med Assoc 1995;207(9):1206-10.
76. 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(12):1381-5.
77. Moen AR and Wouda W. Field experiences with bovine *Neospora* abortion in Dutch dairy herds. Symposium, Bovine *Neospora* abortion 1995;111-7.

78. 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(8):1189-94.
79. Mainar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, Hietala SK. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet Rec* 1999;145(3):72-5.
80. Jensen AM, Bjorkman C, Wedderkopp A, Willadsen C, Uggla A, and Lind P. Seroepidemiological study of *Neospora* infection in Danish dairy herds. Symposium, Bovine *Neospora* abortion 1995;1
81. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:241-4.
82. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Hoffman RL. A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *J Vet Diag Invest* 1990;2(4):283-7.
83. Thurmond MC, Anderson ML, Blanchard PC. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *J Parasitol* 1995;81(3):364-7.
84. Hattel AL, Castro MD, Gummo JD, Weinstock D, Reed JA, Dubey JP. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet Parasitol* 1998;31(2-4):307-13.
85. Agerholm JS, Willadsen CM, Nielsen TK, Giese SB, Holm E, Jensen L, Agger JF. Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds. *Zentralbl Veterinarmed A* 1997;44(9-10):551-8.
86. Wouda W, deGee ALW, Moen AR, and van Knapen F. Laboratory experiences with *Neospora* abortion in Dutch dairy herd. Symposium, Bovine *Neospora* abortion 1995;13-9.
87. Buxton DR, Caldow GL, Maley SW, Marks J, Innes EA. Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Vet Rec* 1997;141(25):649-51.

88. 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(1):82-7.
89. Thurmond MC, Hietala SK. Howard JL, Smyth RA, editors. *Current Veterinary Therapy*. 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999; 9, *Neospora caninum* infection and abortion in cattle. p. 425-31.
90. Fioretti DP, Rosignoli L, Ricci G, Moretti A, Pasquali P, Polidori GA. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. [In Process Citation]. *Zentralbl Veterinarmed* 2000;47(1):47-53.
91. Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diag Invest* 1991;3(1):39-46.
92. Conrad PA, Sverlow KW, Anderson ML, Rowe JD, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer RE, Plamer C, Thurmond MC, Ardans A, *et al.* Detection of serum antibody response in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diag Invest* 1993;5(4):572-8.
93. Bjorkman C, Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 1998;29(10):1497-507.
94. Atkinson R, Harper PA, Reichel MP, Ellis JT. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitology Today* 2000;16(3):110-4.
95. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988;193(10):1259-63.
96. Barr BC, Anderson ML, Sverlow KW, Conrad PA. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet Rec* 1995;137:611-3.
97. Romand S, Thulliez P, Dubey JP. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.* 1998;84(1):50-3.

98. 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 the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 1998;5(4):467-73.
99. Bjorkman C, Lunden A, Holmdahl OJM, Barber J, Trees AJ, Uggla A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology* 1994;16(12):643-8.
100. Bjorkman C, Holmdahl OJ, Uggla A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol* 1997;68(3):251-60.
101. Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diag Invest* 1995;7(3):352-9.
102. Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 1996;3(3):275-9.
103. Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister MM, Anderson-Sprecher R, Baszler TV, Kwok OC, Lally NC, Bjorkman C, Uggla A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J Parasitol* 1997;83(6):1063-9.
104. Williams DJ, McGarry J, Guy F, Barber J, Trees AJ. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet Rec* 1997;140(13):328-31.
105. Wouda W, Brinkhof J, van Maanen C, de Gee AL, Moen AR. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5(5):711-6.
106. Osawa T, Wastling J, Maley S, Buxton D, Innes EA. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet.Parasitol.* 1998;79(1):19-34.

107. Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EA, van Werven T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenol* 1998;49(7):1301-9.
108. Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thur B, Busato A, Stark KD, Muller N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int.J.Parasitol.* 1998;28(4):679-91.
109. Paré J, Fecteau G, Marsolais G, Fortin M. Résultats d'une enquête épidémiologique des infections a *Neospora caninum* dans les troupeaux laitiers du Québec. *Recueil de Conférences* 1996;XI
110. Klein F, Hietala SK, Berthet H, and Gradinaru D. *Neospora caninum*: enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et charolais. *Point Vét* 1997;28(183):1283-6.
111. Bjorkman C, Holmdahl OJ, Uggla A. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet.Parasitol.* 1997;68(3):251-60.
112. Bjorkman C, Naslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton DR, Uggla A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J Vet Diag Invest* 1999;11(1):41-4.
113. Ellis JT, McMillan D, Ryce C, ayne S, Atkinson R, and Harper PA. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int J Parasitol* 1999;29:1589-96.
114. Quintanilla-Gozaló A, Pereira-Bueno J, Tabares E, Innes EA, Gonzalez-Paniello R, Ortega-Mora LM. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol* 1999;29(8):1201-8.
115. Keefe G, VanLeeuwen J. *Neospora caninum* in Maritime Canada : historic prevalence and influence on milk production. *Conf Proc, Canadian Veterinary Medical Association* 2000;52:377-80.

116. Davison HC, French NP, Trees AJ. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet Rec* 1999;144(20):547-50.
117. McNamee P, Trees AJ, Guy F, Moffett D, Kilpatrick D. Diagnosis and prevalence of neosporosis in cattle in Northern Ireland. *Vet Rec* 1996;138:419-20.
118. Ould-Amrouche A, Klein F, Osdoit C, Mohammed HO , Touratier A, Sanaa M, Mialot JP. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Veterinary Research* 1999;30(5):531-8.
119. Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 1999;29 (8):1195-200.
120. Barr BC, Dubey JP , Lindsay DS, and *et al.* Neosporosis: its prevalence and economic impact. *Comp on Cont Ed Pract* 2000;20(Veterinary Exchange):1-16.
121. Thurmond MC, Hietala SK. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am J Vet Res* 1996;57(11):1559-62.
122. Kasari TR, Barling K, and McGrann JM. Estimated Production and Economic losses from *Neospora caninum* Infection in Texas beef herds. *Bovine Practitioner* 1999;33:113-20.
123. De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, and Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol* 1999;29:1647-57.
124. Conraths FJ, Schares G. Diagnosis and epidemiology of *Neospora caninum*-associated abortions in cattle. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 1999;27(3):145-53.
125. Yaeger MJ, Shawd-Wessels S, Leslie-Steen P. *Neospora* abortion storm in a midwestern dairy. *J Vet Diag Invest* 1994;6(4):506-8.
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 Diag Invest* 1996;8:355-7.

127. Dubey JP and Lindsay DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res* 1989;50(9):1578-9.
128. Dubey JP, Morales JA, Villalobos P, Lindsay DS, Blagburn BL, and Topper MJ. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J Am Vet Med Assoc* 1996;208(2):263-5. .
129. Cole RA, Lindsay DS, Blagburn BL, and Dubey JP . Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J Parasitol* 1995;81:730-2.
130. Dubey JP, Lindsay DS, Anderson ML, Davis SW, Shen SK. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1992;201(5):709-13.
131. Anderson ML, Reynolds J, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210:1169-72.
132. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora* infection in dairy cattle. *Vet Rec* 1994;134(20):531-2.
133. Schares G, Peters M, Wurm R, Barwald A, Conraths FJ. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 1998;80(2):87-98.
134. Wouda W, Moen AR, Schukken YH. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenol* 1998;49(7):1311-6.
135. Barber JS, Trees AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int J Parasitol* 1998;28(1):57-64.
136. Lindsay DS and Dubey JP. Evaluation of Anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *J Parasitol* 1989;75(6):990-2.
137. Stringfellow DA; Seidel SM. Stringfellow DA and Seidel SM, editors. Manual of the International embryo transfer Society. 3 ed. Savoy, Illinois 61874 USA: International Embryo Transfer Society; 1998.

138. Thurmond MC, Hietala SK. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. J Am Vet Med Assoc 1997;210(5):672-4.
139. Pellerin D, Bigué J, Martin R, Perrier J-P, Roy R, Gilbert D. L'élevage des génisses: la modération a bien meilleur coût. Recueil des Conférences, Symposium des Bovins Laitiers 1993;13-57.