

NÉOSPOROSE BOVINE : DE L'ÉTUDE DU CYCLE PARASITAIRE À LA DÉFINITION DES MÉTHODES DE LUTTE

BOVINE NEOSPOROSIS : FROM LIFE CYCLE TO PROPHYLAXIS

Par Pierre-Hugues PITEL⁽¹⁾, Loïc LEGRAND⁽²⁾, Stéphane PRONOST⁽³⁾, Karine MAILLARD⁽⁴⁾,
Christel MARCILLAUD-PITEL⁽⁵⁾, Eric RICHARD⁽⁶⁾, Guillaume FORTIER⁽⁷⁾
(Communication présentée le 5 novembre 2009)

RÉSUMÉ

Le parasite *N. caninum* est un protozoaires identifié il y a une vingtaine d'années. Bien que l'infection par *Neospora caninum* puisse se manifester par des symptômes neurologiques en pathologie bovine néonatale, sa principale répercussion économique et sanitaire en élevage est due aux avortements. Son cycle parasitaire est encore imparfaitement connu. Ses hôtes définitifs actuellement identifiés avec certitude sont le chien, le coyote et le dingo, mais le renard est aussi fortement suspecté. Une bonne connaissance du cycle évolutif du parasite et de la physiopathologie de la néosporose est indispensable pour définir des méthodes de lutte efficaces. À ce jour, il n'existe pas de traitement. De nombreux essais vaccinaux sont réalisés avec différentes stratégies. Seules des méthodes de lutte sanitaire sont envisageables avec un rôle essentiel de conseil pour le vétérinaire sanitaire.

Mots-clés : *Neospora caninum*, bovins, signes cliniques, cycle parasitaire, traitement, prophylaxie.

SUMMARY

Neospora caninum is an apicomplexan parasite, identified about twenty years ago. Although it can cause neurological symptoms in newborn cattle, its main economic and health repercussion in breeding is due to abortions. The life cycle of *N. caninum* is not yet fully understood. Its currently identified final hosts are dogs and coyotes, but foxes are also strongly suspected. To be effective, treatment and prophylaxis must be based on sound knowledge of the life cycle and pathophysiology of this protozoosis. There is no treatment currently available. Many vaccine studies are being performed using various strategies, but only disease control methods are possible for the moment, alongside the crucial advisory role of veterinary practitioners.

Key words : *Neospora caninum*, cattle, symptoms, parasite life cycle, treatment.

(1) DVM, PhD; Laboratoire Frank Duncombe; 14053 Caen cedex 4; ph.pitel@cg14.fr.

(2) Laboratoire Frank Duncombe; 14053 Caen cedex 4.

(3) Laboratoire Frank Duncombe; 14053 Caen cedex 4;

(4) DVM; Laboratoire Frank Duncombe; 14053 Caen cedex 4.

(5) DVM; Laboratoire Frank Duncombe; 14053 Caen cedex 4.

(6) DVM, PhD; Laboratoire Frank Duncombe; 14053 Caen cedex 4.

(7) DVM, PhD; Laboratoire Frank Duncombe; 14053 Caen cedex 4.

INTRODUCTION

Après l'éradication de la brucellose, la détermination de l'étiologie des avortements en élevage bovin a fréquemment engendré de la frustration chez les vétérinaires et leurs éleveurs. Ces 20 dernières années, l'amélioration des outils de diagnostic a permis l'identification de nouveaux agents abortifs dans l'espèce bovine, parmi lesquels *Neospora caninum* dont le rôle n'est plus contesté. Des avancées importantes concernant cet agent et l'infection qu'il provoque ont été réalisées tant sur le plan fondamental qu'épidémiologique. Même s'il reste encore des zones d'ombre, elles ont permis de mieux comprendre les modalités de contamination in utero mais aussi à l'échelle d'un troupeau, ainsi que la pathogénie des avortements. La bonne connaissance des modalités de transmission de ce parasite est essentielle à l'établissement des stratégies de gestion des cas, de la lutte et de la prévention.

IMPORTANCE ÉCONOMIQUE DE LA NÉOSPOROSE BOVINE

Le parasite *N. caninum* est un protozoaire identifié pour la première fois à la fin des années 1980 chez des chiots présentant des troubles neurologiques (Dubey *et al.* 1988). Son implication dans des avortements chez des bovins date de 1989 (Shivaprasad *et al.* 1989; Thilsted & Dubey, 1989). Depuis lors, *N. caninum* est considéré dans la plupart des pays du monde comme un agent abortif majeur dans l'espèce bovine.

Des cas de néosporose ont été rapportés dans des élevages laitiers comme dans des élevages de vaches allaitantes (Wouda 2000; Dubey 2003).

L'implication de *Neospora caninum* en tant qu'agent abortif a été mise en évidence dans la plupart des pays du monde. On lui attribue de cinq à 25 % des avortements. Ce pourcentage varie très fortement d'un pays à l'autre, voire d'un élevage à l'autre. Les élevages laitiers seraient plus fréquemment et fortement atteints.

Les conséquences économiques ont été évaluées (Dubey *et al.* 2007). Elles comprennent les frais vétérinaires, les pertes de production de lait induites par les avortements, le coût du diagnostic, les frais d'insémination artificielle, l'accroissement de la période de lactation, l'achat d'animaux de renouvellement si besoin et enfin, les frais liés à l'élimination éventuelle des bovins séropositifs et à leur remplacement par l'achat d'animaux séronégatifs (Dubey 2003). Dans une étude menée au Canada, les pertes imputables à l'infection par *Neospora caninum* sont estimées à 2304 dollars pour un élevage de 50 bovins (Chi *et al.* 2002). L'âge de réforme des animaux séropositifs est inférieur de six mois à celui des animaux séronégatifs (Thurmond & Hietala, 1996). Le coût de la néosporose vient après celui de l'infection par le virus BVD mais précède celui de la paratuberculose ou de la leucose bovine enzootique.

LE PARASITE ET SON CYCLE

Le parasite *N. caninum* faisant partie du groupe des Apicomplexa, l'intervention d'un hôte intermédiaire (assurant la multiplication asexuée du parasite) et d'un hôte définitif (hébergeant la multiplication sexuée) a été très rapidement suspectée. L'identification d'hôte(s) intermédiaire(s) est orientée par la présence d'anticorps sériques et affirmée par la découverte de stades asexués (tachyzoïtes ou kystes à bradyzoïtes) dans les tissus. Dans le cas de *N. caninum*, ces formes asexuées ont été mises en évidence chez des fœtus ou de très jeunes animaux, d'où une suspicion de transmission verticale *in utero* (mère-fœtus). Elles ont été détectées chez le chien, les bovins, le mouton, la chèvre, le renard et le cerf (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey *et al.* 2007).

La présence d'anticorps a été décrite dans d'autres espèces telles que le chat, les félinés sauvages, les mammifères marins, les opossums, le buffle d'eau, le chameau, le lama et l'alpaga et les ruminants sauvages. Elle est en faveur du rôle d'hôtes intermédiaires que pourraient jouer ces animaux (Dubey 1999).

La mise en évidence de la transmission verticale ne permettant pas à elle seule de boucler le cycle biologique d'un sporozoaire tel que *N. caninum*, l'identification d'un hôte définitif a rapidement été entreprise. Deux voies de recherche ont alors été explorées: la mise en évidence de facteurs de risque associés à la présence d'avortements dus à *N. caninum* et l'infection expérimentale par voie orale d'hôtes définitifs potentiels.

Les kystes à bradyzoïtes sont résistants à une solution de pepsine-HCl, ce qui suggère qu'un carnivore pourrait intervenir dans le cycle comme pour de nombreux autres sporozoaires (Lindsay & Dubey 1990a). La répartition du (ou des) hôte(s) définitif(s) potentiel(s) doit être très large sur la planète pour rendre compte de la répartition mondiale des cas de néosporose bovine. Des enquêtes sérologiques ont mis en évidence une association entre la présence de certaines espèces animales dans les fermes et l'infection du cheptel bovin par *N. caninum*. Ainsi, la séroprévalence de *N. caninum* est plus élevée chez les chiens de ferme que chez les chiens citadins aux Pays-Bas, en Argentine, en Espagne et au Mexique (Wouda *et al.* 1999; Basso *et al.* 2001 a; Moore *et al.* 2002; Sanchez *et al.* 2003; Collantes-Fernandez *et al.* 2008). La présence de chiens dans les fermes est significativement associée à une augmentation de la prévalence sérologique chez des bovins au Canada, en France, en Espagne, aux Pays-Bas, au Mexique, en Italie et en Jordanie (Dubey *et al.* 2007; Gonzalez-Warleta *et al.* 2008; Abo-Shehadeh & Abu-Halaweh, 2010). Dans les fermes où aucun chien n'est présent, la séroprévalence chez les bovins est significativement plus basse, sans pour autant être nulle (Wouda *et al.* 1999b). Quelques études vont à l'encontre de ces observations: la présence d'un chien de troupeau dans des élevages de vaches allaitantes au Texas serait associée à une diminution de la séroprévalence et trois études menées en Suisse, aux États-Unis et au Brésil font ressortir que la présence d'un chien en élevage bovin n'est pas un facteur de risque d'infection des bovins par *N. caninum* (Rodriguez *et al.* 2002; Fischer *et al.* 2003; Aguiar *et al.* 2006).

Dans une étude réalisée aux Pays-Bas, la séroprévalence est significativement plus élevée chez les chiennes que chez les mâles vivant dans les fermes, alors qu'aucune différence significative entre les sexes n'est observée dans un travail mené au Mexique (Wouda *et al.* 1999b; Sanchez *et al.* 2003).

De même, il a été observé que les bovins se contaminent vraisemblablement en ingérant des aliments contaminés par des oocystes dans les ensilages d'herbe ou de maïs ou dans les aires d'alimentation des bovins (Dijkstra *et al.* 2002b). L'infection par *N. caninum* est aussi significativement associée à l'introduction d'un nouveau chien ou à la naissance d'une portée de chiots dans les 18 mois précédant l'apparition des troubles abortifs (Dijkstra *et al.* 2002 b). Enfin, dans les élevages présentant un profil de contamination horizontale, il a été plus fréquemment noté que les chiens consomment des placentas et défèquent sur les stocks d'ensilage (Dijkstra *et al.* 2002a). Le chien a donc été identifié comme un hôte définitif potentiel. Cependant, d'autres espèces comme les volailles et le chat ont été associées à la présence de *N. caninum* dans les élevages (Dubey 2003). Récemment, le poulet a été identifié comme hôte intermédiaire de *Neospora caninum* (Costa *et al.* 2008), pouvant jouer le rôle de réservoir.

Des infections expérimentales de diverses espèces ont été réalisées afin de mettre en évidence des oocystes de *Neospora* dans les fèces, sans succès chez des chats, des rats laveurs et des oiseaux (Dubey 2003). Il faut attendre 1998 pour observer la présence d'oocystes dans les fèces de chiots ayant ingéré des souris expérimentalement contaminées (McAllister *et al.* 1998). L'excrétion d'oocystes de *N. caninum* par le chien est faible et la quantité d'oocystes excrétés varie en fonction de la souche infectante, de la quantité de parasites ingérés, de leur nature (tachyzoïtes ou kystes à bradyzoïtes) et du statut immunitaire du chien (Schaes *et al.* 2001). Certains chiens infectés n'excrètent pas d'oocystes (Schaes *et al.* 2001; Dijkstra *et al.* 2001). Dans le cas d'excrétion après l'ingestion de placenta, il apparaît qu'une quantité d'environ 400 g de placenta est nécessaire, l'infection par 60 g n'étant pas suivie d'excrétion (Dijkstra *et al.* 2001). Il est intéressant de noter que malgré une faible teneur en parasites, le placenta peut être infectant (Bergeron *et al.* 2001). Un nouveau repas de placenta contaminant ne semble pas capable d'induire une nouvelle excrétion (Dijkstra *et al.* 2001). Après une infection expérimentale, la séroconversion n'est pas systématique bien que l'excrétion soit démontrée (Schaes *et al.* 2001a). De rares cas d'excrétion naturelle ont été rapportés chez le chien (Basso *et al.* 2001 b; Slapeta *et al.* 2002).

Le rôle du chien comme hôte définitif éclaire un peu plus le cycle parasitaire de *N. caninum* et son épidémiologie. Cependant, quelques points restent non élucidés, dont la présence d'avortements attribués à *N. caninum* dans des élevages bovins ne possédant pas de chien et la faible quantité d'oocystes excrétés, comparée à la quantité nécessaire pour contaminer un bovin (De *et al.* 1999); l'ingestion de 105 à 137 oocystes suffit pour obtenir une contamination (Williams *et al.* 2009).

Les faits précédents, associés à la présence d'anticorps anti-*N. caninum* chez des animaux sauvages, laissent supposer l'existence d'un cycle sylvestre de *N. caninum*. Cette suspicion est renforcée par des considérations épidémiologiques. En effet, la proximité de la faune sauvage est considérée comme un facteur associé à la présence de sérologies positives dans les élevages bovins (Barling *et al.* 2001). Notamment, la présence de canidés sauvages (coyotes et renards gris) à proximité des élevages bovins allaitants au Texas est un facteur de risque (Barling *et al.* 2000).

Les recherches sérologiques, effectuées chez des animaux sauvages terrestres, suggèrent que de nombreuses espèces sauvages sont en contact avec *N. caninum* et pourraient jouer le rôle d'hôte intermédiaire (Rosypal & Lindsay, 2005). C'est le cas de ruminants sauvages comme de canidés sauvages.

Si des oiseaux carnivores ont été testés sans succès en tant qu'hôtes définitifs, des infections expérimentales ont été obtenues chez le pigeon et le diamant mandarin, un Passériforme originaire d'Australie (McGuire *et al.* 1999). Les résultats d'analyses histologiques, immunohistochimiques et moléculaires démontrent que le pigeon peut être infecté avec succès, alors que le diamant mandarin semble réfractaire à l'infection.

Deux cas de néosporose avérée ont été rapportés chez des Cervidés, ce qui semble accréditer l'hypothèse suivant laquelle les ruminants sauvages jouent le rôle d'hôtes intermédiaires. Le premier cas est un avortement chez un Cervidé sauvage (*Cervus eldi siamensis*) présent à la ménagerie du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris, chez lequel des lésions d'encéphalite multifocale non suppurative et un marquage positif par un sérum polyclonal de lapin anti-*N. caninum* ont été rapportés (Dubey *et al.* 1996). Même si cet animal vivait en captivité dans une ville européenne, ce cas démontre la possibilité d'un passage transplacentaire de *N. caninum* chez des Cervidés. Un autre cas de néosporose avérée a été rapporté chez un faon de deux mois, trouvé mort en Californie (Woods *et al.* 1994).

L'existence d'une transmission verticale a été mise en évidence chez d'autres espèces sauvages que les ruminants. Ainsi, les renards comme les chiens peuvent transmettre le parasite à leur descendance (Schaes *et al.* 2001b). De l'ADN de *N. caninum* a été amplifié à partir de prélèvements de tissus nerveux de renards sauvages en Espagne (Almeria *et al.* 2002). Ces résultats viennent confirmer les observations des enquêtes sérologiques qui démontrent la présence d'anticorps anti-*N. caninum* chez des renards mais aussi chez d'autres carnivores sauvages aux États-Unis et en Europe (Dubey 2003). En revanche, la prévalence sérologique de *N. caninum* chez le renard est nulle en Suède (Jakubek *et al.* 2001), ce qui est à rapprocher de la prévalence déjà très faible de l'infection chez les bovins suédois par rapport aux bovins élevés dans d'autres pays européens. Les résultats obtenus chez les Canidés sauvages se rapprochent de ceux obtenus chez le chien. Dès lors, il a très rapidement été proposé que tout comme le chien, les carnivores sauvages puissent jouer le double rôle d'hôtes intermédiaires et/ou d'hôtes définitifs.

Récemment, l'excrétion d'oocystes par des coyotes (*Canis latrans*) et des dingos (*Canis lupus dingo*) a été observée dans les conditions de contamination expérimentale (Gondim *et al.* 2004, King *et al.* 2010). Les mêmes auteurs s'interrogent aussi sur le rôle potentiel des loups (*Canis lupus*), génétiquement plus proches du chien que le coyote. Des oocystes morphologiquement et génétiquement proches de ceux de *Neospora caninum* ont été identifiés sur une île canadienne (Wapenaar *et al.* 2006). Récemment, il a été démontré que le rat gris (*Rattus norvegicus*) pouvait naturellement être infecté par *N. caninum* (Huang *et al.* 2004).

Le sperme peut révéler des traces d'ADN de *Neospora caninum* et s'avérer infectant, sans pour autant générer d'avortements. L'excrétion dans le sperme semble très faible et inconstante, ce qui laisse penser qu'il s'agit d'une voie mineure de contamination (Dubey *et al.* 2007).

En fonction des connaissances actuelles, un cycle évolutif (figure 1) peut être élaboré avec le chien comme hôte définitif, mais aussi intermédiaire. Les bovins, tout comme les ruminants sauvages, y interviennent en tant qu'hôtes intermédiaires. Avec la découverte de l'excrétion d'oocystes par des coyotes, l'existence d'un cycle sylvestre est de plus en plus probable. De plus amples travaux sont nécessaires afin de mieux comprendre le rôle exact des micromammifères.

PHYSIOPATHOLOGIE DE LA NÉOSPOROSE

La physiopathologie de la néosporose reste mal connue. Il n'existe pas de modèle expérimental probant d'infection par *N. caninum* à partir d'oocystes. L'injection sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale de tachyzoïtes est le mode d'infection expérimentale le plus courant, mais n'est pas un mode de contamination naturel. On distingue classiquement les infections verticales endogènes (infection du fœtus lors d'une gestation chez une femelle préalablement infectée), les infections verticales exogènes (infection du fœtus lors d'une gestation chez une femelle préalablement indemne) et la voie horizontale (infection d'un animal après sa naissance).

Il est admis que l'avortement est la résultante de la mort fœtale. La différence d'intensité et de type de réponse inflammatoire observée entre avortons et veaux vivants infectés pourrait être expliquée par une différence de sensibilité à l'infection (Ogino *et al.* 1992). Cette modulation serait liée à la compétence immunitaire du fœtus. Une autre explication fait appel à un effet dose infectante, puisqu'en cas de contamination horizontale, il y aurait plus de parasites infectants qu'en cas de contamination verticale. C'est ce que pourrait expliquer le fait que l'on observe plus de tachyzoïtes dans le foie, associés à des lésions d'hépatite nécrotique, dans le cas d'une flambée d'avortements par rapport aux avortements sporadiques (Wouda *et al.* 1997).

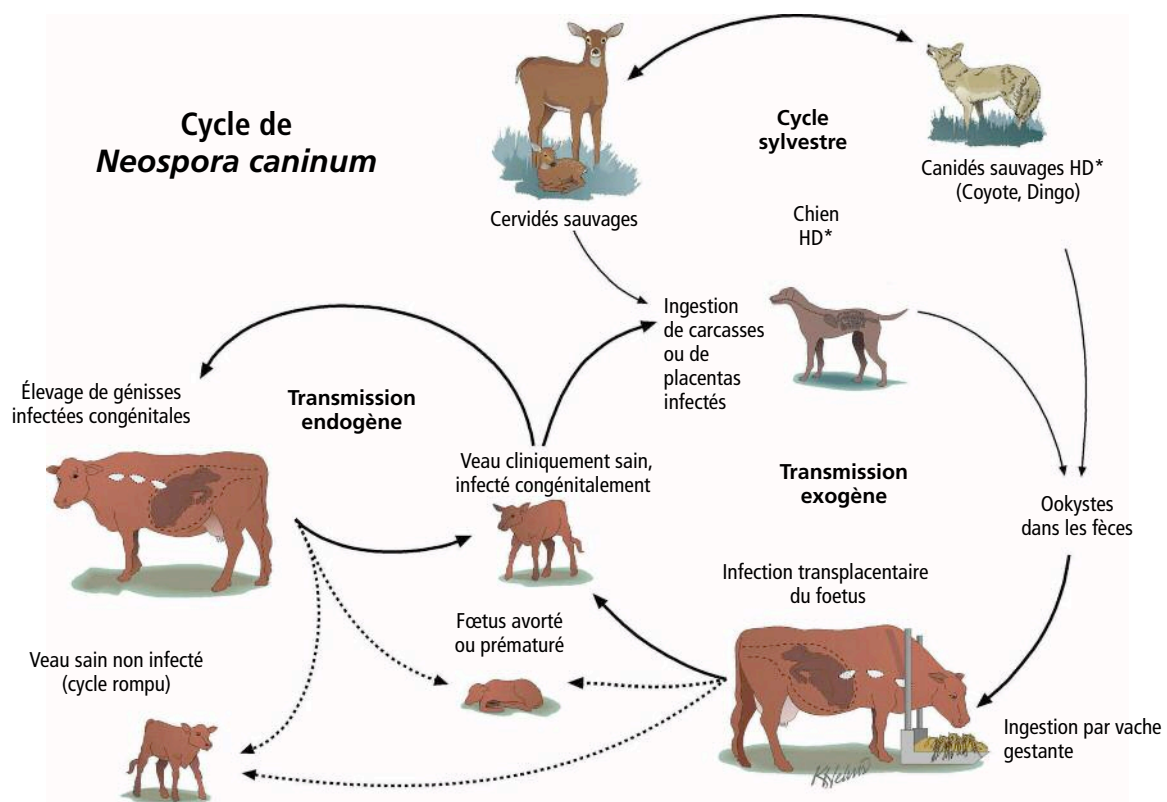


Figure 1 : Cycle évolutif de *Neospora caninum* (d'après McAllister *et al.* 1998).

* HD=Hôte Définitif

Des vaches ont été infectées à différents moments de leur gestation, afin de mieux comprendre le mécanisme du passage transplacentaire de *N. caninum* (Williams *et al.* 2000). L'infection expérimentale avant l'insémination a été suivie de la naissance de six animaux vivants, non infectés. L'infection à 30 semaines de gestation a été suivie de la naissance de six veaux vivants, viables, mais infectés par le parasite. Enfin, l'infection à 10 semaines a entraîné une fœtopathie et une résorption fœtale dans cinq cas sur six. L'infection s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'INF γ , d'une réponse de prolifération lymphocytaire et d'une réponse anticorps de type IgG2 associée à une augmentation des lymphocytes T auxiliaires. Des résultats similaires ont été observés lors de l'infection expérimentale de brebis (Buxton *et al.* 1998). Plus les animaux sont infectés tôt pendant la gestation, plus on observe de résorptions embryonnaires et d'avortements. Plus les animaux sont infectés tardivement, plus on note de produits infectés mais vivants. Dans tous les cas, des parasites et des lésions microscopiques placentaires sont observés. Dans une étude expérimentale de la réaction immunitaire de femelles infectées à 110 jours de gestation, Almeria *et al.* (2003) montrent que trois semaines après la contamination maternelle par voie intraveineuse, le fœtus est déjà contaminé. Des modifications des sous-populations lymphocytaires sont observées chez les mères, accompagnées d'une augmentation des lymphocytes T chez les fœtus contaminés.

En ce qui concerne la transmission verticale chez des animaux chroniquement infectés, il semble que la modulation physiologique de la réponse immunitaire au cours de la gestation rende la mère plus vulnérable à l'infection et favorise la transmission du parasite au fœtus (Hemphill & Gottstein 2000). Au cours de trois gestations successives chez trois vaches chroniquement infectées, aucune de ces gestations n'a été interrompue par un avortement mais le parasite a été isolé à partir du placenta lors de chaque vêlage (Piergili *et al.* 2003). De même, le parasite a été identifié dans l'encéphale des neuf veaux, nés cliniquement sains de ces gestations. Le suivi sérologique mensuel des femelles gestantes montre une augmentation des anticorps IgM et IgG au cours du troisième trimestre de gestation. Chez les veaux, un pic d'IgM est observé au moment de la naissance, puis une augmentation des IgG liée à la prise du colostrum maternel. Ces faits sont en faveur d'une contamination tardive du fœtus au cours de la gestation. Dans le même temps, l'étude sérologique menée sur les 38 autres bovins de la même étable, ainsi que les recherches sérologiques et parasitologiques négatives chez les chiens de la ferme, permettent de conclure que l'infection des fœtus est bien liée à leur contamination par voie verticale, à partir d'une recrudescence de l'infection chronique de leur mère en fin de gestation. La transmission verticale asymptomatique semble donc être une voie de contamination efficace d'un cheptel au fil du temps.

Les infections verticales exogènes d'animaux naïfs aboutiraient principalement à des avortements et à une absence de transmission endogène lors des gestations suivantes (Williams *et al.* 2009). Les animaux infectés après la naissance représentent un risque plus limité que ceux infectés par voie verticale.

De nombreux travaux restent à mener sur le suivi de l'immunité de bovins infectés à différents âges et à différents stades de gestation ainsi que sur leur devenir lors de plusieurs gestations successives.

SIGNES CLINIQUES DE LA NÉOSPOROSE BOVINE

La néosporose bovine se manifeste sous deux formes principales : des avortements, forme la plus fréquente, et des troubles neurologiques chez les veaux dans les premières semaines de vie.

Avortements

Le premier avortement bovin attribué à *N. caninum* date de 1989 (Thilsted & Dubey, 1989). Dans un premier temps, le parasite incriminé était un agent de type « *Toxoplasma gondii-like* ». Ce n'est qu'avec la production de sérum anti-*N. caninum* que des analyses immunohistochimiques ont confirmé le diagnostic d'avortement dû à *N. caninum* (Lindsay & Dubey, 1989).

La prévalence, appréciée à partir de l'analyse des avortons, varie de 0 à plus de 30 % selon les études, les pays et les techniques de diagnostic (Dubey *et al.* 2007).

Aucun autre signe clinique n'est associé aux avortements qui sont apyrétiques : les animaux expulsent leur placenta sans difficulté, aucune métrite n'est rapportée après les avortements. Le retour en chaleurs se fait dans de bonnes conditions avec une bonne fertilité lors de l'ovulation suivante. L'état des avortons est très variable. Ils peuvent être momifiés, autolysés, en bon état, voire vivants lors d'une expulsion juste avant terme.

Les avortements imputés à *N. caninum* surviennent toute l'année (Anderson *et al.* 1991). Cependant des études rapportent une prévalence plus importante pendant quelques mois de l'année : les cas surviennent plus en hiver qu'en été ou au début de l'automne en Californie (Anderson *et al.* 1991) et plus en été et au début de l'automne aux Pays-Bas (Wouda *et al.* 1999a). Ces variations peuvent être liées à des facteurs climatiques affectant la survie des oocystes, mais aussi à des facteurs alimentaires et de logement (pâturage ou stabulation). En Europe, une planification des naissances en début d'automne est de plus en plus pratiquée. Dans ce cas, un nombre plus grand d'animaux se retrouvent simultanément au même stade de gestation et en cas de survenue préférentielle des avortements à un stade de gestation donné, la prévalence est accrue à cette période.

S'il existe des différences dans la survenue des avortements entre les élevages laitiers et ceux de vaches allaitantes, elles ne seraient pas liées à une prédisposition raciale, la race n'étant pas un facteur de risque selon deux études menées au Danemark et en France (Dubey *et al.* 2007).

Il est vraisemblable que la mort fœtale survienne à tous les stades de gestation mais aucun cas d'avortons de moins de trois mois infectés par *N. caninum* n'a jamais été rapporté. Toutes causes confondues, l'expulsion d'un produit d'avortement au cours des

trois premiers mois de gestation, est rare puisqu'il survient plutôt une résorption embryonnaire. Globalement, les avortements à *Neospora* sont observés le plus souvent entre le 5^{ème} et le 7^{ème} mois de gestation (Dubey & Lindsay, 1996). Cette influence du stade de gestation pourrait être liée à une susceptibilité foetale, corroborée par des études histologique et sérologique : avant six à sept mois de gestation, le foetus bovin est considéré comme totalement immuno-incompétent et les études histologiques ont montré des lésions plus sévères chez les jeunes foetus que chez les foetus plus âgés (Ogino *et al.* 1992). Chez les mères infectées chroniquement, il semble que la production d'anticorps sériques augmente entre le 3^{ème} et le 7^{ème} mois de gestation, puis diminue jusqu'au terme (Hemphill & Gottstein, 2000). Cette stimulation de la réponse immunitaire humorale pourrait correspondre à une recirculation du parasite et à une contamination du foetus. Les titres d'anticorps observés chez les vaches avorteuses sont statistiquement plus élevés que chez les non-avorteuses.

Des flambées d'avortements dans des élevages bovins sont abondamment décrites (Bartels *et al.* 1999; Wouda *et al.* 1999a). Une étude, menée aux Pays-Bas dans 50 élevages montre que ces épisodes d'avortements durent de 6 à 65 jours avec une moyenne de 41,5 jours. De 11 à 57 % des femelles gestantes sont touchées. Ces flambées sont attribuées soit à une nouvelle contamination (McAllister *et al.* 1996), soit à une recrudescence sur un fond de transmission verticale (Wouda *et al.* 1999b). Ces deux hypothèses sont corroborées par une enquête épidémiologique réalisée dans les mêmes élevages (Bartels *et al.* 1999) : la survenue de ces flambées est corrélée à la présence de chien(s) et de volailles et à la distribution d'ensilage moisi (présence probable de mycotoxines). Aucune association n'a été trouvée avec une autre maladie intercurrente telles que la leptospirose, la salmonellose, l'herpesvirose bovine de type 1 et la pestivirose de la maladie des muqueuses liée à l'agent de la diarrhée virale bovine (BVDV). L'influence du BVDV a été suspectée en Suède (Bjorkman *et al.* 2000).

Globalement, il est estimé que moins de 5 % des avortements à répétition sont liés à *N. caninum* (Moen *et al.* 1998; Wouda *et al.* 1999a). Leur rareté peut s'expliquer soit par l'acquisition d'une immunité protectrice empêchant la mort foetale et non par la transmission verticale, soit par le nombre important de bovins éliminés de la reproduction après avortement.

Troubles nerveux

Des cas de pathologie néonatale, notamment à manifestation neurologique, sont rapportés, moins nombreux que les cas d'avortements (Dubey 2003). Ils résulteraient d'une infection *in utero*. Dans la plupart des cas, les signes cliniques surviennent dans les premières semaines de vie (moins de deux mois) et elles.

TRAITEMENT

À ce jour, il n'existe aucun traitement systématiquement efficace de la néosporose. Quelques essais ont eu lieu avec plus ou moins de réussite chez des chiots présentant des troubles neurologiques ou cutanés en utilisant notamment des sulfamides, la pyriméthamine et la clindamycine (Crookshanks *et al.* 2007; Dubey 2003; Dubey *et al.* 2007). L'effet d'autres molécules, comme le toltrazuril, le ponazuril et le sulfonamide, a été évalué *in vivo* chez des modèles murins de néosporose : elles se sont révélées d'une efficacité intéressante (Lindsay & Dubey, 1990 b; Gottstein *et al.* 2001).

La plupart des molécules n'ont actuellement été testées qu'*in vitro* (Lindsay *et al.* 1994; Kim *et al.* 2002; Gupta *et al.* 2002). Une molécule active contre la coccidiose aviaire, le décoquinat, n'agirait que sur les parasites intracellulaires et non sur les formes extracellulaires (Lindsay *et al.* 1997). Un autre anti-coccidien, dérivé de composants de l'armoise de la pharmacopée végétale traditionnelle chinoise, l'artémisine, entraîne une complète élimination du parasite *in vitro* à la concentration de 10 à 20 µg/ml (Kim *et al.* 2002). Des extraits alcooliques d'herbes médicinales asiatiques, autrefois utilisées comme antiparasitaires en médecine humaine, ont aussi montré une activité *in vitro* contre *N. caninum* (Youn *et al.* 2003; 2004). La dépudécine (0,5 mg/ml) posséderait aussi des propriétés anti-*neospora in vitro* (Kwon *et al.* 2003).

L'extrapolation de ces résultats aux situations *in vivo* est risquée. Plusieurs paramètres décisifs interviennent *in vivo* : le passage de la barrière digestive par la molécule ou ses métabolites, les possibles différences entre la molécule native utilisée en culture cellulaire et ses métabolites dans l'organisme et enfin, le passage de la barrière hémato-méningée si l'on souhaite agir sur les stades évolutifs du parasite dans les cellules du système nerveux central. Une approche alternative de l'expression abortive de la maladie serait de n'éviter que le passage transplacentaire. Restent pour l'instant à déterminer la période à laquelle il faut traiter, les animaux à traiter et la rémanence du principe actif dans l'organisme. Ces dernières années, des résultats encourageants ont été obtenus chez la souris avec le toltrazuril (Gottstein *et al.* 2005; Strohbusch *et al.* 2009). Dans une première étude, l'essai a consisté à traiter des femelles expérimentalement infectées à 10 jours de gestation, soit par le toltrazuril (52,5 mg/kg/j), soit par l'enrofloxacin (16,77 mg/kg/j) pendant les six jours consécutifs à l'infection et de comparer les résultats à ceux obtenus chez des souris infectées recevant un placebo. Le nombre d'avortements mais aussi la mortalité dans le groupe traité par le toltrazuril ont sensiblement diminué, par rapport au groupe traité par l'enrofloxacin et le groupe placebo. Des analyses par la technique PCR et des examens histologiques menés sur les encéphales des mères et des

souriceaux ont montré une diminution significative des réactions positives et des lésions dans le groupe traité par le toltrazuril. Enfin, aucun des souriceaux nés de mères traitées par le toltrazuril n'a été trouvé infecté et ce résultat est constant au fur et à mesure des gestations successives. Les auteurs concluent à une efficacité de 87 % du toltrazuril (contre 17 % pour l'enrofloxacin) sur l'infection aiguë mais aussi à l'absence de contamination transplacentaire lors des gestations suivantes. Dans le second essai, le toltrazuril a été administré à la dose de 31,25 mg/kg en une fois ou de façon répétée pendant trois jours de suite à des souriceaux infectés congénitalement par le parasite. Aucun effet secondaire n'a été observé. Quel que soit le mode de traitement, le toltrazuril allonge significativement le délai d'apparition des signes cliniques chez les nouveau-nés et génère un taux de survie significativement supérieur dans les lots traités en comparaison des lots témoins. Ce taux de survie n'est pas significativement modifié par les modalités d'administration de la molécule. Le groupe de souriceaux recevant le traitement répété pendant trois jours présente cependant un nombre de sujets malades et encore infectés, significativement plus faible que le groupe traité en une fois. Ce sont aussi ceux qui ont pu développer une immunité humorale plus élevée. Les résultats positifs de ces deux essais sont vraisemblablement favorisés par les propriétés pharmacocinétiques de la molécule dont le passage de la barrière placentaire et la très courte demi-vie ont été démontrés.

PROPHYLAXIE

Prophylaxie médicale

La prophylaxie médicale repose essentiellement sur la vaccination. Les vaccins anti-protistes sont de plus en plus étudiés. Il semble qu'une réponse de type Th1 avec production d'interféron γ (INF γ) et d'interleukine 12 (IL12) soit essentielle dans la prévention d'une néosporose aiguë expérimentale chez la souris. L'objectif étant d'aboutir à une protection de l'infection verticale du fœtus au cours de la gestation, plusieurs approches sont actuellement utilisées: injection de tachyzoïtes virulents tués ou non et vecteurs viraux porteurs de séquences recombinées de *N. caninum* (vaccins à ADN). Des résultats encourageants ont été obtenus chez la souris immunisée avant la gestation par des tachyzoïtes de *N. caninum* et infectée en début de gestation (6-9 jours), stade auquel elles sont les plus sensibles (Liddell *et al.* 1999). Les résultats obtenus chez les bovins en utilisant des tachyzoïtes comme antigènes sont plus contrastés. Les immunités cellulaires et humorales sont bien stimulées, mais le passage vertical du parasite persiste (Andrianarivo *et al.* 1999; 2000). Innes *et al.* (2001) ont bien observé la stimulation de l'immunité à médiation cellulaire avec une augmentation significative de la production d'INF γ après

l'infection, mais aussi une protection contre le passage vertical du parasite. Des résultats encourageants ont été obtenus chez des bovins immunisés avant la mise à la reproduction et ayant subi une infection expérimentale à 140 jours de gestation (Innes *et al.* 2001), la période de gestation entre quatre et six mois étant le plus critique dans la survenue des avortements chez les bovins (Thurmond & Hietala 1998; Thurmond *et al.* 1997; Moen *et al.* 1998). Récemment, un vaccin préparé à partir de tachyzoïtes a reçu une autorisation temporaire de mise sur le marché aux États-Unis (Neoguard®, Intervet USA). Son innocuité a été évaluée en élevage bovin (Barling *et al.* 2003). Il permet d'obtenir une séroconversion vis-à-vis de *N. caninum* dans 76,6 % des cas sans provoquer d'effets secondaires néfastes sur la production lactée ou sur la qualité de la viande des animaux immunisés. Des résultats encourageants ont aussi été obtenus chez des brebis gestantes vaccinées aux jours 1 et 126 par une préparation de tachyzoïtes de *N. neospora* tué (O'Handley *et al.* 2003). Une réponse immunitaire humorale est obtenue chez plus de 80 % des brebis. Aucune trace d'ADN parasitaire n'est observée chez 10 fœtus examinés, alors que des lésions histologiques sont rapportées chez tous les agneaux examinés (quatre sur quatre). L'utilisation de ce vaccin dans un modèle ovin d'infection conférerait une protection partielle.

Une autre voie d'immunisation fait appel à des vaccins recombinés. Les principaux travaux portent actuellement sur le peptide NcSRS2 aussi appelé Ncp43 impliqué dans l'adhésion et l'invasion parasitaire (Hemphill & Gottstein, 1996). Les souris immunisées sont moins infectées que les témoins. Lors de stimulation *in vitro* de splénocytes par des antigènes de *N. caninum*, il a été observé une réponse proliférative plus importante chez les souris vaccinées, ainsi qu'une production accrue d'INF γ ($p < 0.001$) (Nishikawa *et al.* 2000a; 2001). En revanche, aucun changement de la production d'IL12 n'a été observé. Les souris vaccinées par le peptide NcSRS2 recombiné produisent de forts taux d'anticorps IgG1 pendant l'immunisation et l'infection d'épreuve (Andrianarivo *et al.* 1999; Choromanski & Block, 2000; Nishikawa *et al.* 2000a; Nishikawa *et al.* 2001). La même étude montre que les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle important dans la prévention de l'infection lors des étapes terminales. Cet essai d'immunisation et de protection contre *N. caninum* accorde un rôle majeur des IgG1 en début d'infection, alors que la réponse des lymphocytes T CD4+ agirait plutôt en fin d'infection. Les effets de la vaccination par le peptide recombiné sur la protection de la transmission verticale du parasite chez la souris ont été également étudiés lors de contamination expérimentale en début de gestation (6-9 jours) (Nishikawa *et al.* 2001): les souris vaccinées, puis infectées, ont des portées plus nombreuses que les souris témoins et le taux de survie de leurs souriceaux est plus élevé. Aucun signal n'est détecté par la technique de PCR dans les organes des souriceaux

morts issus de mères vaccinées. La réaction des souris vaccinées à l'infection expérimentale se caractérise par une augmentation très rapide du taux d'IgG1 et une augmentation significative de la prolifération des splénocytes en présence d'antigènes de *N. caninum*. L'efficacité de NcSRS2C recombiné a aussi été comparée à celle de la protéine recombinée NcSAG-1 seule ou associée à NcSRS2 et à celle d'une vaccination par ADN codant ces deux protéines (Cannas *et al.* 2003a). Aucun des animaux vaccinés n'a développé de symptôme après infection expérimentale. L'infection tissulaire par *N. caninum* évaluée par une technique de PCR quantitative révèle que la quantité d'ADN parasitaire est moindre après un vaccin à ADN qu'en utilisant les protéines recombinées seules ou associées.

Une protéine de micronèmes recombinée, NcMIC3, a été testée dans un modèle murin (Cannas *et al.* 2003b). Les souris sont infectées après immunisation par injection intrapéritonéale de 2×10^6 tachyzoïtes. L'efficacité de l'immunisation est évaluée par l'observation clinique et par la recherche quantitative d'ADN parasitaire dans les tissus. Aucun des animaux ayant reçu la protéine recombinée ou l'adjuvant seul n'a développé de symptôme 21 jours après l'infection. De l'ADN parasitaire n'a été observé dans aucun tissu autre que l'encéphale. L'étude quantitative de l'ADN de *N. caninum* montre une infection moins importante chez les souris immunisées par NcMIC3 que chez celles ayant reçu de l'adjuvant seul. La protection partielle (75 %) est associée à une réaction immunitaire Th2 avec une réponse IgG1 dirigée contre la protéine native NcMIC3 et une réponse mixte IgG1 et IgG2 contre la protéine recombinée.

Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire se décompose formellement en une prophylaxie défensive et une prophylaxie offensive. Elles sont en général fondées sur la connaissance des cycles parasitaires et des données épidémiologiques.

Mesures défensives

Les mesures de prophylaxie défensives visent à éviter qu'un cheptel ou un animal ne s'infecte ou ne se réinfecte. Actuellement, sont conseillées quelques mesures simples et peu onéreuses : limiter l'accès des chiens et de tous animaux autres que les bovins aux aires de stockage et de distribution des aliments, éviter l'ingestion de produits de mise bas ou d'avortement par les chiens ou les coyotes (aux États-Unis), éliminer avortons et placentas même en cas de vêlage à terme d'un veau vivant (Wouda *et al.* 2000). Il est aussi conseillé de lutter contre les rongeurs et d'éviter la présence d'oiseaux sauvages et d'oiseaux d'élevage dans les locaux d'élevage et de stockage des aliments (Anderson 2000; Dijkstra *et al.* 2002b). Ces mesures sont aussi recommandées pour le contrôle d'autres maladies infectieuses (brucellose, chlamydie, fièvre Q).

Il existe aussi une voie intéressante, qui permet au vétérinaire praticien de valoriser son conseil et son acte : la transplantation embryonnaire. L'objectif est de transplanter des embryons de donneuses séropositives chez des receveuses séronégatives (Baillargeon *et al.* 2001; Bielanski *et al.* 2002; Landmann *et al.* 2002). On obtient ainsi des produits séronégatifs. Cette technique, si elle est effectuée suivant les recommandations établies par l'*Embryo Transfer Society*, donne de bons résultats (Bielanski *et al.* 2002). Dans ces conditions de bonnes pratiques, le lavage des embryons et l'intégrité de la zone pellucide sont primordiales (Bielanski *et al.* 2002). La transplantation embryonnaire représente un surcoût pour l'éleveur, mais elle lui permet de préserver la qualité génétique de son cheptel en produisant des animaux de renouvellement séronégatifs. La seule limite, encore incertaine à ce jour, est le risque d'une nouvelle contamination du cheptel (les receveuses devant demeurer séronégatives) et le risque de contamination des produits obtenus entre leur naissance et leur mise à la reproduction ou leur commercialisation.

Mesures offensives

Les mesures de prophylaxie offensives consistent à éliminer l'agent infectieux responsable ou les animaux qui en sont porteurs. L'élimination définitive des femelles séropositives de la reproduction est une possibilité. Pour des raisons financières et génétiques, elle n'est pas adaptée aux élevages où une forte séroprévalence est observée (Wouda 2000). De plus, en l'absence de vaccin reconnu comme efficace, une nouvelle contamination d'un cheptel ne peut être exclue. Il semble même, que si une nouvelle contamination survient, les animaux séronégatifs subissent significativement plus d'avortements que ceux qui étaient déjà séropositifs, une infection antérieure par *N. caninum* entraînant une protection vis-à-vis des avortements en cas de nouvelle contamination (McAllister *et al.* 2000). Une possibilité intermédiaire est l'utilisation, en filière de production de veau, de femelles séropositives de race laitière croisées avec des taureaux de race allaitante. On limite ainsi la pérennisation de l'infection dans le cheptel, on valorise les femelles séropositives et leur descendance et on limite le coût économique en cas d'avortement.

L'élimination des chiens des cheptels où sévissent des problèmes de néosporose ne paraît pas utile. En effet, selon les données épidémiologiques, le risque est accru après l'introduction d'un nouveau chien ou après la naissance d'une portée (Dijkstra *et al.* 2002b). Enfin, en l'état actuel des connaissances, il est quasiment impossible de savoir si un chien, qu'il soit séropositif ou séronégatif, excrète ou va excréter des oocystes de *N. caninum*. En effet, de nombreux chiens excréteurs n'ont pas montré de seroconversion dans les 40 jours suivant le repas infectant (McAllister *et al.* 1998; Schares *et al.* 2001a).

Un résumé des mesures envisageables est proposé dans la **figure 2**.

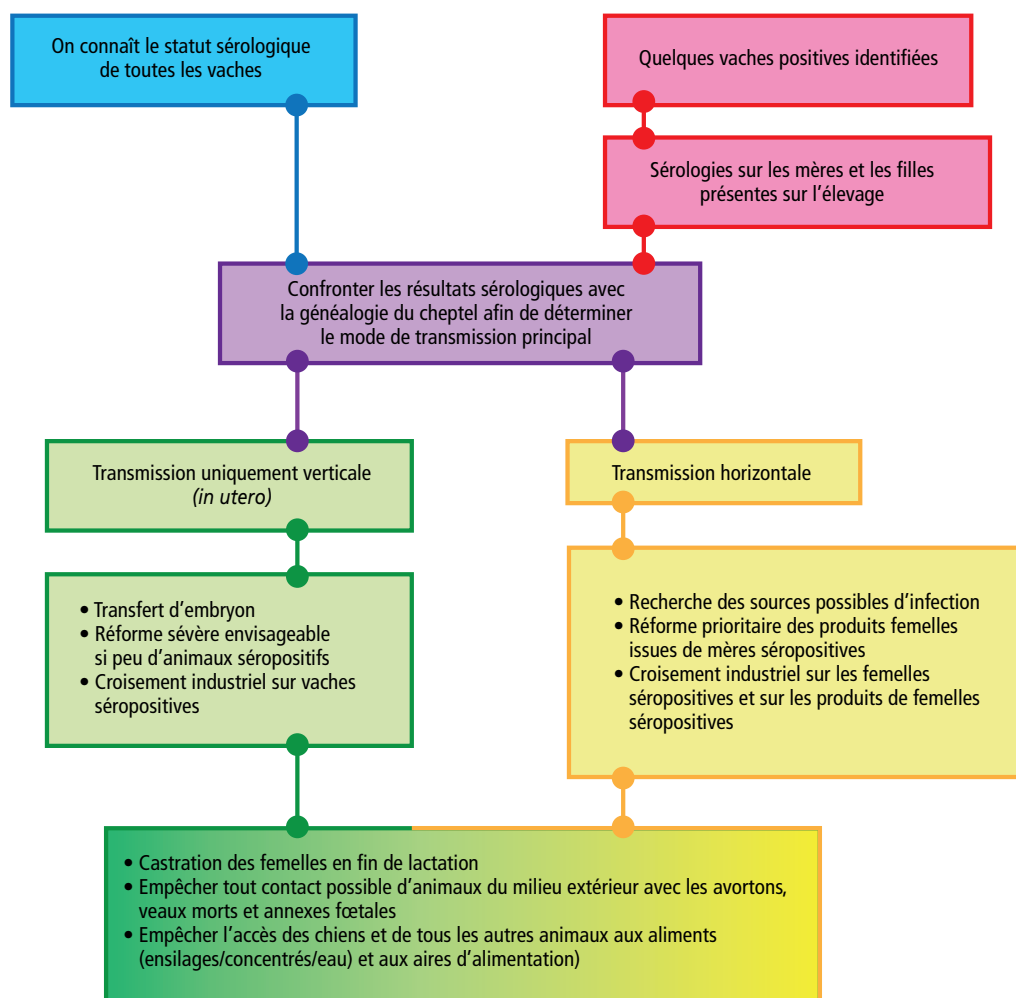


Figure 2 : Schéma des mesures de prophylaxie sanitaires envisageables dans le cas de néosporose en élevage bovin.

CONCLUSION

Actuellement, en dépit de très nombreux travaux et d'avancées significatives, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre la néosporose bovine est inexistant. La lutte en élevage ne repose que sur la mise en place de mesures de prophylaxie sanitaire défensives et offensives. La stratégie d'approche devra être modu-

lée au cas par cas en fonction de la motivation de l'éleveur, de ses moyens financiers, de la valeur économique et génétique de son cheptel, de la séroprévalence et du mode de contamination dominant. Une bonne connaissance du cycle épidémiologique de *N. caninum* est donc essentielle afin de pouvoir adapter les mesures les plus pertinentes.

BIBLIOGRAPHIE

- Abo-Shehada MN & Abu-Halaweh MM. 2010. Flock-level seroprevalence of, and risk factors for, *Neospora caninum* among sheep and goats in northern Jordan. *Prev Vet Med.* 93(1):25–32.
- Aguiar, D. M., Cavalcante, G. T., Rodrigues, A. A., Labruna, M. B., Camargo, L. M., Camargo, E. P., and Gennari, S. M. 2006. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle and dogs from Western Amazon, Brazil, in association with some possible risk factors. *Vet Parasitol.* 142(1-2): 71–77.
- Almeria, S., De, M. T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J. P., Gasbarre, L. C. 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25(7): 383–392.
- Almeria, S., Ferrer, D., Pabon, M., Castella, J., Manas, S. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 107(4): 287–294.
- Anderson, B. C. 2000. Contamination of feed-stuffs caused by farm dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 217(9): 1294.
- Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L., Conrad, P. A. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 198(2): 241–244.
- Andrianarivo, A. G., Choromanski, L., McDonough, S. P., Packham, A. E., Conrad, P. A. 1999. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int J Parasitol.* 29(10): 1613–1625.
- Andrianarivo, A.G., Rowe, J.D., Barr, B.C., Anderson, M.L., Packham, A.E., Sverlow, K.W., Choromanski, L., Loui, C., Grace, A., Conrad, P.A. 2000. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int J Parasitol.* 30(9): 985–990.
- Baillargeon, P., Fecteau, G., Pare, J., Lamothe, P., Sauve, R. 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 218(11): 1803–1806.
- Barling, K. S., Lunt, D. K., Graham, S. L., Choromanski, L. J. 2003. Evaluation of an inactivated *Neospora caninum* vaccine in beef feedlot steers. *J Am Vet Med Assoc.* 222(5): 624–627.
- Barling, K. S., McNeill, J. W., Paschal, J. C., McCollum, F. T., III, Craig, T. M., Adams, L. G., Thompson, J. A. 2001. Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Prev Vet Med.* 52(1): 53–61.
- Barling, K. S., Sherman, M., Peterson, M. J., Thompson, J. A., McNeill, J. W., Craig, T. M., Adams, L. G. 2000. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *J Am Vet Med Assoc.* 217(9): 1361–1365.
- Bartels, C. J., Wouda, W., Schukken, Y. H. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52(2): 247–257.
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M. C., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J. M., Campero, C., Bacigalupe, D., Dubey, J. R. 2001 a. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J Parasitol.* 87(4): 906–907.
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M. C., Hill, D. E., Kwok, O. C., Shen, S. K., Dubey, J. P. 2001 b. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol.* 87(3): 612–618.
- Bergeron, N., Girard, C., Pare, J., Fecteau, G., Robinson, J., and Baillargeon, P. 2001. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J Vet Diagn Invest.* 13(2): 173–175
- Bielanski, A., Robinson, J., Phipps-Todd, B. 2002. Effect of *Neospora caninum* on *in vitro* development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. *Vet Rec.* 150(10): 316–318.
- Bjorkman, C., Alenius, S., Manuelsson, U., Uggla, A. 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet J.* 159(2): 201–206.
- Buxton, D., Maley, S. W., Wright, S., Thomson, K. M., Rae, A. G., Innes, E. A. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol.* 118(4): 267–279.
- Cannas, A., Naguleswaran, A., Muller, N., Eperon, S., Gottstein, B., Hemphill, A. 2003a. Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcSAG1 and NcSRS2-based recombinant antigens and DNA vaccines. *Parasitology* 126(Pt 4): 303–312.
- Cannas, A., Naguleswaran, A., Muller, N., Gottstein, B., Hemphill, A. 2003b. Reduced cerebral infection of *Neospora caninum*-infected mice after vaccination with recombinant microneme protein NcMIC3 and ribi adjuvant. *J Parasitol.* 89(1): 44–50.
- Chi, J., Vanleeuwen, J. A., Weersink, A., Keefe, G. P. 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Prev Vet Med.* 55(2): 137–153.
- Choromanski, L. & Block, W. 2000. Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora* vaccines. *Parasitol Res.* 86(10): 851–853.
- Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Miró, G., Alvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C., Ortega-Mora, L.M. 2008. Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Vet Parasitol.* 25:152(1-2):148–151.
- Costa, K. S., Santos, S. L., Uzeda, R. S., Pinheiro, A. M., Almeida, M. A., Araujo, F.R., McAllister, M. M., Gondim, L. F. 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 38(2): 157–159.
- Crookshanks, J. L., Taylor, S. M., Haines, D. M., Shelton, G. D. 2007. Treatment of canine pediatric *Neospora caninum* myositis following immunohistochemical identification of tachyzoites in muscle biopsies. *Can Vet J.* 48(5): 506–508.
- De, M. T., Liddell, S., Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Gasbarre, L. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol.* 29(10): 1647–1657.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Eysker, M., Hesselink, J. W., Wouda, W. 2002. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet Parasitol.* 105(2): 99–104.
- Dijkstra, T., Barkema, H. W., Hesselink, J. W., Wouda, W. 2002. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet Parasitol.* 105(2): 89–98.
- Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F. J., Wouda, W., Barkema, H. W. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 31(8): 747–752.

- Dubey, J. P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 84(3-4): 349–367.
- Dubey, J. P. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 41(1): 1–16.
- Dubey, J. P. & Lindsay, D. S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *VetParasitol.* 67(1-2): 1–59.
- Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S., Topper, M. J. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc.* 193(10): 1259–1263.
- Dubey, J. P., Rigoulet, J., Lagourette, P., George, C., Longeart, L., LeNet, J. L. 1996. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*). *J Parasitol.* 82(2): 338–339.
- Dubey, J. P., Schares, G., Ortega-Mora, L. M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 20(2): 323–367.
- Fischer, I., Furrer, K., Audige, L., Fritsche, A., Giger, T., Gottstein, B., and Sager, H. 2003. [The importance of bovine neosporosis for abortion in Switzerland]. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 145(3): 114–123.
- Gondim, L. E., McAllister, M. M., Pitt, W. C., Zemlicka, D. E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 34(2): 159–161.
- Gonzalez-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A., Carro-Corral, C., Cortizo-Mella, J., Mezo, M. 2008. Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Parasitol Res.* 102(2): 243–249.
- Gottstein, B., Eperon, S., Dai, W. J., Cannas, A., Hemphill, A., Greif, G. 2001. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol Res.* 87(1): 43–48.
- Gottstein, B., Razmi, G. R., Ammann, P., Sager, H., Muller, N. 2005. Toltrazuril treatment to control diaplacental *Neospora caninum* transmission in experimentally infected pregnant mice. *Parasitology* 130(Pt 1): 41–48.
- Gupta, G. D., Lakritz, J., Kim, J. H., Kim, D. Y., Kim, J. K., Marsh, A. E. 2002. Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. *Vet Parasitol.* 106(3): 193–201.
- Hemphill, A. & Gottstein, B. 1996. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol Res.* 82(6): 497–504.
- Hemphill, A. & Gottstein, B. 2000. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 30(8): 877–924.
- Huang, C. C., Yang, C. H., Watanabe, Y., Liao, Y. K., Ooi, H. K. 2004. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Vet Res.* 35(3): 283–290.
- Innes, E. A. Wright, S.E., Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E., Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 31(13): 1523–1534.
- Jakubek, E. B., Brojer, C., Regnersen, C., Uggla, A., Schares, G., and Bjorkman, C. 2001. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Parasitol.* 102(1-2): 167–172.
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A. 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 40(8): 945–950.
- Kim, J. T., Park, J. Y., Seo, H. S., Oh, H. G., Noh, J. W., Kim, J. H., Kim, D. Y., Youn, H. J. 2002. *In vitro* antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 103(1-2): 53–63.
- Kwon, H. J., Kim, J. H., Kim, M., Lee, J. K., Hwang, W. S., Kim, D. Y. 2003. Anti-parasitic activity of depudecin on *Neospora caninum* via the inhibition of histone deacetylase. *Vet Parasitol.* 112(4): 269–276.
- Landmann, J. K., Jillella, D., O'Donoghue, P. J., McGowan, M. R. 2002. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust Vet J.* 80(8): 502–503.
- Liddell, S., Jenkins, M. C., Collica, C. M., Dubey, J. P. 1999. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J Parasitol.* 85(6): 1072–1075.
- Lindsay, D. S., Butler, J. M., Blagburn, B. L. 1997. Efficacy of decoquinat against *Neospora caninum* tachyzoites in cell cultures. *Vet Parasitol.* 68(1-2): 35–40.
- Lindsay, D. S. & Dubey, J. P. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am J Vet Res.* 50(11): 1981–1983.
- Lindsay, D. S. & Dubey, J. P. 1990 a. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J Parasitol.* 76(3): 410–413.
- Lindsay, D. S. & Dubey, J. P. 1990b Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J Parasitol.* 76(2): 177–179.
- Lindsay, D. S., Rippey, N. S., Cole, R. A., Parsons, L. C., Dubey, J. P., Tidwell, R. R., Blagburn, B. L. 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. *Am J Vet Res.* 55(7): 976–981.
- McAllister, M. M., Bjorkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D. G. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J Am Vet Med Assoc.* 217(6): 881–887.
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., McGuire, A. M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 28(9): 1473–1478.
- McAllister, M. M., Huffman, E. M., Hietala, S. K., Conrad, P. A., Anderson, M. L., Salman, M. D. 1996. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diagn Invest.* 8(3): 355–357.
- McGuire, A. M., McAllister, M., Wills, R. A., and Tranas, J. D. 1999. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 29(10): 1525–1529.
- Moen, A. R., Wouda, W., Mul, M. F., Graat, E. A., van Werven, T. 1998. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49(7): 1301–1309.
- Moore, D. P., Campero, C. M., Odeon, A. C., Posso, M. A., Cano, D., Leunda, M. R., Basso, W., Venturini, M. C., Spath, E. 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol.* 107(4): 303–316.
- Nishikawa, Y., Ikeda, H., Fukumoto, S., Xuan, X., Nagasawa, H., Otsuka, H., Mikami, T. 2000 a. Immunization of dogs with a canine herpesvirus vector expressing *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2. *Int J Parasitol.* 30(11): 1167–1171.
- Nishikawa, Y., Kousaka, Y., Fukumoto, S., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., Mikami, T. 2000 b. Delivery of *Neospora caninum* surface protein, NcSRS2 (Nc-p43), to mouse using recombinant vaccinia virus. *Parasitol Res.* 86(11): 934–939.
- Nishikawa, Y., Kousaka, Y., Tragoolpua, K., Xuan, X., Makala, L., Fujisaki, K., Mikami, T., Nagasawa, H. 2001. Characterization of *neosporea caninum* surface protein ncsrs2 based on baculovirus expression system and its application for serodiagnosis of *neosporea* infection. *J Clin Microbiol.* (11): 3987–3991.
- Nishikawa, Y., Xuan, X., Nagasawa, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Otsuka, H., and Mikami, T. 2001 Prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice by recombinant vaccinia virus carrying NcSRS2 gene. *Vaccine* 19(13-14): 1710–1716.

- O'Handley, R. M., Morgan, S. A., Parker, C., Jenkins, M. C., Dubey, J. P. 2003. Vaccination of ewes for prevention of vertical transmission of *Neospora caninum*. *Am J Vet Res.* 64(4): 449–452.
- Ogino, H., Watanabe, E., Watanabe, S., Agawa, H., Narita, M., Haritani, M., Kawashima, K. 1992. Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf. *J Comp Pathol.* 107(2): 231–237.
- Piergili, F. D., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, L. 2003. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50(8): 399–404.
- Rodriguez, I., Choromanski, L., Rodgers, S. J., and Weinstock, D. 2002. Survey of *Neospora caninum* antibodies in dairy and beef cattle from five regions of the United States. *Vet Ther.* 3(4): 396–401.
- Rosypal, A. C. & Lindsay, D. S. 2005. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol.* 21(10): 439–440.
- Sanchez, G. F., Morales, S. E., Martinez, M. J., Trigo, J. F. 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can J Vet Res.* 67(2): 142–145.
- Schares, G., Heydorn, A. O., Cuppers, A., Conraths, F. J., Mehlhorn, H. 2001a. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitol Res.* 87(10): 873–877.
- Schares, G., Wenzel, U., Muller, T., Conraths, F. J. 2001b. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Parasitol.* 31(4): 418–423.
- Shivaprasad, H. L., Ely, R., Dubey, J. P. 1989. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet Parasitol.* 34(1-2): 145–148.
- Slapeta, J. R., Modry, D., Kyselova, I., Horejs, R., Lukes, J., Koudela, B. 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet Parasitol.* 109(3-4): 157–167.
- Strohbusch, M., Muller, N., Hemphill, A., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B. 2009. Toltrazuril treatment of congenitally acquired *Neospora caninum* infection in newborn mice. *Parasitol Res.* 104(6): 1335–1343.
- Thilsted, J. P. & Dubey, J. P. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1(3): 205–209.
- Thurmond, M. C. & Hietala, S. K. 1996. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res.* 58(12): 1381–1385.
- Thurmond, M. C., Hietala, S. K., Blanchard, P. C. 1997. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest* 9(1): 44–49.
- Wapenaar, W., Jenkins, M. C., O'Handley, R. M., Barkema, H. W. 2006. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *J Parasitol.* 92(6): 1270–1274.
- Williams, D. J., Guy C.S., McGarry J.W., Guy F., Tasker L., Smith R.F., MacEachern K., Cripps P.J., Kelly D.F., Trees A.J. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121 (Pt 4): 347–358.
- Williams, D. J., Hartley, C. S., Bjorkman, C., Trees, A. J. 2009. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136(14): 1895–1900.
- Woods, L. W., Anderson, M. L., Swift, P. K., Sverlow, K. W. 1994. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *J Vet Diagn Invest.* 6(4): 508–510.
- Wouda, W. 2000. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. *Vet Q.* 22(2): 71–74.
- Wouda, W., Bartels, C. J., Moen, A. R. 1999. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52(2): 233–245.
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A.M., van Maanen, C., Brinkhof, J. M. 1999b. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 29(10): 1677–1682.
- Wouda, W., Moen, A. R., Visser, I. J., van Knapen, F. 1997. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest.* 9(2): 180–185.
- Youn, H. J., Lakritz, J., Kim, D. Y., Rottinghaus, G. E., Marsh, A. E. 2003. Anti-protozoal efficacy of medicinal herb extracts against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 116(1): 7–14.
- Youn, H. J., Lakritz, J., Rottinghaus, G. E., Seo, H. S., Kim, D. Y., Cho, M. H., Marsh, A. E. 2004. Anti-protozoal efficacy of high performance liquid chromatography fractions of *Torilis japonica* and *Sophora flavescens* extracts on *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.* 125(3-4): 409–414.