

Résumé de thèse de doctorat

Aspects diagnostiques et épidémiologiques de la néosporose bovine (*Neospora caninum*) en Belgique

Diagnosis and epidemiology of neosporosis in belgian cattle

CANDIDAT : **François De Meerschman**

PROMOTEUR : **Professeur B. Losson**

Département et Service

Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service de Parasitologie et Pathologie des Maladies parasitaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 29 septembre 2004

Composition du Jury

• MEMBRES EXTÉRIEURS À LA FACULTÉ :

Professeur J. Vercruysse, Universiteit Gent, Belgique,
Docteur G. Schares, Institute of Epidemiology, Allemagne

• MEMBRES INTERNES À LA FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE :

Professeur J.-F. Beckers, Professeur F. Coignoul, Professeur Chr. Hanzen, Professeur J. Mainil, Docteur F. Farnir

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Neospora caninum est un protozoaire de la famille des *Sarcocystidae* (*Phylum apicomplexa*). Ce parasite a été, à l'origine, décrit chez le chien chez qui il est responsable de paralysie, de mortalité et d'atteintes neurologiques sévères (Bjerkas et Presthus, 1984). Récemment décrite chez le bétail, la néosporose bovine s'est avérée être une cause importante d'avortements et de mortalités néonatales. En Belgique, l'incidence réelle des avortements dus à *N. caninum* chez les bovins était inconnue. Une étude réalisée sur des sérums de renard (*Vulpes vulpes*) avait montré que 17 % des animaux testés présentaient un titre supérieur à 1/64 (Buxton *et al.*, 1997). En outre, la néosporose canine a été formellement décrite en Belgique (Poncellet *et al.*, 1990). Dans

la région de Gand et d'Anvers, 300 sérums ont été testés par IFAT; 11 % des chiens étaient séropositifs avec un titre variant de 1/50 à 1/800.

Ce travail a été consacré à l'étude du diagnostic et de l'épidémiologie de la néosporose chez le bovin en Belgique. Les buts de l'étude étaient les suivants. D'une part, des outils de diagnostic applicables à la fois à la vache durant la gestation ou en dehors de celle-ci, aux avortons et aux veaux atteints de néosporose (clinique ou asymptomatique) devaient être développés et caractérisés. D'autre part, un protocole cohérent pour le diagnostic des avortements à *Neospora caninum* devait être mis au point. En outre, la démonstration de la présence et l'évaluation de l'impact de la néosporose bovine en Belgique ainsi que l'étude de certains aspects épidémiologiques de l'affection figuraient également comme objectifs à atteindre

RÉSULTATS

Le sérum de veau fœtal est un élément indispensable à la culture cellulaire. Cependant, il s'est avéré qu'un grand nombre de produits commercialisés à base de sérum de veau fœtal présentait des titres élevés en anticorps anti-*N. caninum*. Une alternative intéressante à l'utilisation de sérum de veau fœtal est l'emploi d'additif exempt de sérum. Lors de la première étude, une évaluation quantitative et qualitative de la production de cellules Vero dans un milieu complété en sérum de veau fœtal, de cheval ou bien avec un additif (DefCell) exempt de sérum, a été réalisée. Les trois types de milieu de culture ont également été employés et comparés dans le cadre de la production sur cellules Vero de tachyzoïtes de *T. gondii* (souche RH) et de *N. caninum* (isolat NC-1). Le milieu complété en sérum de veau

foetal s'est révélé être le plus adéquat pour la croissance de cellules Vero et la production de tachyzoïtes de *N. caninum*. Cependant, ce milieu s'est avéré incapable d'assurer une production optimale de tachyzoïtes de *T. gondii*. La production de cellules Vero, ainsi que de tachyzoïtes de *T. gondii* et de *N. caninum*, a présenté des caractéristiques communes en milieu complémenté en sérum de cheval et en DefCell. Ce dernier s'est révélé être une bonne alternative au sérum de veau foetal pour compléter les milieux de culture et lors de la mise au point de tests sérologiques.

Afin d'estimer l'incidence du parasite en terme d'avortements chez le bétail en Belgique, une étude épidémiologique rétrospective a été réalisée conjointement avec le centre de Guidance Vétérinaire de Loncin. En utilisant un home-made IFAT ainsi qu'un ELISA commercial (Idexx), il a été possible de démontrer que 12 % des avortements dans la province de Liège sont imputables à *N. caninum* et que la séroprévalence chez les vaches de plus de 24 mois était de 6,5 %. En outre, 3 % et 9,7 % des bovins laitiers et viandeux se sont révélés séropositifs. Lorsque les séroprévalences laitière et viandeuse issues de la population contrôles ont été comparées aux prévalences des vaches ayant avorté, des différences significatives ont été observées.

Par la suite, afin de caractériser le diagnostic sérologique de bovins infestés chroniques à différents moments de leur gestation, une exploitation de bovins de races Blanc Bleu belge et Pie noire Holstein présentant un taux d'avortements important a été étudiée. Pour ce faire, une prise de sang a été réalisée avant la prise du colostrum à chaque veau nouveau-né ainsi qu'à leurs mères respectives. En outre, plusieurs échantillonnages transversaux ont été réalisés au cours du suivi de 25 mois. L'ensemble des avortons collectés ont été analysés via un protocole défini. Les taux d'infestations au sein des troupeaux laitier et viandeux ont été respectivement de 52,7 et 63,9 %. Une diminution de la séroprévalence en fonction de l'âge a été observée. En outre, aucune différence entre les taux d'infestation des cheptels laitier et viandeux n'a pu être mise en évidence. Les taux de passage transplacentaire observés au sein des deux cheptels ont respectivement été de 90,2 et de 90,3 %. La race de la mère ne semble pas influencer la probabilité de contamination du fœtus. Cependant, les données suggèrent que le risque de contamination du fœtus est lié à l'âge de la mère. En effet, un bovin âgé présente un risque moins élevé de contamination du fœtus comparativement à un animal plus jeune. Une sensibilité de 75 % lors d'un échantillonnage transversal

a été obtenue. Au vêlage, une valeur de 81 % a été observée. Lorsque le statut sérologique de la vache a été déterminé en utilisant uniquement les résultats du veau nouveau-né, la sensibilité du test a été de 93 %. La spécificité du test est restée constante (95 %) indépendamment du type d'échantillonnage réalisé.

L'aspect du diagnostic sérologique de la néosporose chez les avortons a également été investigué lors de l'analyse d'une banque d'avorton. D'une part, la recherche de la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des avortons présente un intérêt non négligeable. En effet, la probabilité d'observer des lésions au sein des tissus d'avortons s'est avérée directement liée à la présence d'anticorps. D'autre part, lorsque les titres en anticorps maternels ont été comparés chez des vaches ayant expulsé des fœtus présentant ou non des lésions compatibles avec la néosporose, une association hautement significative entre l'importance du titre et l'observation des lésions a été mise en évidence.

Lors de l'analyse histo-pathologique de la banque d'avortons, des lésions compatibles avec la néosporose ont été observées chez 7,6 % des fœtus (6,1 % chez les viandeux et 10,5 % chez les laitiers). L'organe le plus intéressant à analyser s'est avéré être le cerveau. Les lésions rencontrées y étaient très caractéristiques et présentes dans tous les cas de néosporose où le cerveau était disponible. Aucune partie du cerveau ne s'est montrée plus propice qu'une autre lors de la recherche des lésions. Cependant, il est apparu très clairement que les lésions étaient beaucoup plus étendues et disséminées dans le cerveau de fœtus laitiers. En effet, 83 % et seulement 27 % des coupes réalisées respectivement à partir d'encéphale de fœtus laitiers et viandeux ont été déclarées positives. Lors de l'analyse des coupes du myocarde et du foie respectivement 5,8 % et 2,2 % se sont révélées positives. Aucune analyse immuno-histochimique ne s'est révélée positive vis-à-vis de *T. gondii*. Lors de la recherche d'antigènes de *N. caninum*, la présence de structures parasitaires a pu être confirmée chez tous les fœtus laitiers excepté un. Cependant, seulement 5 des fœtus viandeux sur les 9 présentant des lésions ont été déclarés positifs en immunohistochimie.

Figure : *Neospora caninum*, agent abortif important chez les bovins



La dernière étude consistait à analyser des veaux présentant des symptômes nerveux issus de l'exploitation suivie. Cette étude a permis de mettre en évidence les limites d'utilisation des outils de diagnostic, entre autres, la PCR. Elle a cependant montré certaines limites notamment en terme de sensibilité. L'analyse histopathologique restant l'outil de prédilection.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, les différentes études menées ont permis d'estimer l'impact de la néosporose et de mieux évaluer les outils de diagnostic disponibles.

Il serait intéressant d'étudier plus précisément la détection d'animaux porteurs chroniques, notamment via l'utilisation de l'ELISA avidité (Björkman *et al.*, 1999). En effet, ce dernier permet de faire la différence entre les animaux néo-infectés et les animaux infectés chroniques. Il présente un intérêt évident lors de l'évaluation d'une éventuelle transmission horizontale au sein d'un cheptel. La caractérisation de cet outil pourrait se faire d'une part à partir des sérums de veaux nouveau-nés avant la prise de colostrum et d'autre part sur les mères jugées positives et qui par la suite présentent des fluctuations d'anticorps. L'intérêt de cette approche serait d'évaluer si le test est capable de

faire la distinction entre un animal néo-infecté et un bovin infecté qui présente une fluctuation d'anticorps. En outre, il serait très intéressant d'évaluer les différents ELISA disponibles sur le marché. En effet, il semblerait que les chercheurs dont les outils sont destinés à la commercialisation ont une certaine propension à vouloir limiter leurs évaluations à des situations très éloignées des conditions de terrain.

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce au financement du Ministère de l'Agriculture et des Classes Moyennes (Belgique).

RÉFÉRENCES

- BJERKAS I., MOHN S.F., PRESTHUS J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.*, 1984, **70**, 271-274.
- BUXTON D., MALEY S.W., PASTORET P.P., BROCHIER B., INNES E.A.. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Vet. Rec.*, 1997, **141**, 308-309.
- PONCELET L., BJERKAS I., CHARLIER G., COIGNOUL F., LOSSON B., BALLIGAND M. Confirmation de la présence de *Neospora caninum* en Belgique. *Ann. Med. Vet.*, 1990, **134**, 501-503.
- BJORKMAN C., NASLUND K., STENLUND S., MALEY S.W., BUXTON D., UGGLA A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1999, **11**, 41-44.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- DE MEERSCHMAN F., LOSSON B. *Neospora caninum* et la néosporose : biologie et description de la maladie chez le chien. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 247-253.
- DE MEERSCHMAN F., LOSSON B. *Neospora caninum* : un nouvel agent abortif chez le bovin et autres espèces domestiques. *Ann. Méd. Vét.*, 1998, **142**, 299-305.
- DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., BOREUX R., LECLIPTEUX T., LOSSON B. Cattle neosporosis in Belgium : a case-control study in dairy and beef cattle. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 887-890.
- DE MEERSCHMAN F., RETTIGNER C., FOCANT C., BOREUX R., PINSET C., LECLIPTEUX T., LOSSON B. Use of a serum-free medium to produce in vitro *Neospora caninum* tachyzoites on Vero cells. *Vet. Res.*, 2002, **33**, 159-168.
- DE MEERSCHMAN F., SPEYBROECK N., BERKVEN D., RETTIGNER C., FOCANT C., LECLIPTEUX T., CASSART D., LOSSON B. *Neospora caninum* fetal infection in dairy and beef belgian cattle. *Theriogenology*, 2002, **58**, 933-945.