

## Diagnostic et surveillance épidémiologique de *Neospora caninum*

GHALMI F.<sup>1,3</sup>, CHINA B.<sup>2</sup>, LOSSON B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Liège, Faculté de Médecine vétérinaire, Département des maladies infectieuses, Laboratoire de Parasitologie, Bât. B43, 4000 Liège, Belgique

<sup>2</sup> Institut scientifique de Santé publique, section Épidémiologie, Avenue de la Couronne, 310, 1050 Bruxelles, Belgique

<sup>3</sup> Ecole nationale vétérinaire d'Alger, BP 161 Hassen Badi El-Harrach, Alger, Algérie

Correspondance : Prof. Bertrand Losson Email : blossom@ulg.ac.be

**RESUME :** *Neospora caninum* est un parasite pathogène principalement chez les bovins et le chien mais qui peut infecter d'autres animaux (petits ruminants, équidés, ruminants sauvages). Chez la vache, la manifestation clinique la plus souvent observée est l'avortement. Les méthodes de diagnostic de cette pathologie comprennent : la sérologie, la recherche du parasite au sein des tissus par immunohistochimie ou des lésions par examen anatomopathologique. La réaction de polymérisation en chaîne est aussi applicable sur différents tissus. Des tests statistiques permettent de comparer les performances de ces différentes techniques. Les méthodes sérologiques ont été utilisées pour évaluer la prévalence de *N. caninum* chez différentes espèces animales. Ces études montrent notamment que la prévalence est plus élevée chez le chien de ferme que chez le chien de ville ou chez les vaches qui avortent par rapport à celles qui n'avortent pas. En ce qui concerne l'isolement du parasite, il est le plus couramment réalisé à partir du cerveau des avortons bovins bien que ce ne soit pas une technique de routine. Il est clair que l'amélioration des techniques de diagnostic permettra de mieux comprendre les voies de transmission du parasite et de lutter plus efficacement contre ce pathogène récemment découvert.

### 1. INTRODUCTION

Depuis sa découverte en 1984 chez des chiots en Norvège (Bjerkas *et al.*, 1984) et sa description comme une nouvelle espèce de parasite (*Neospora caninum*) (Dubey *et al.*, 1988), la néosporose a émergé comme une maladie importante du bétail (Thilsted et Dubey, 1989 ; Dubey, 2003) et du chien (Dubey *et al.*, 1988 ; Mc Allister *et al.*, 1998 ; Lindsay *et al.*, 1999) partout dans le monde. De plus, *N. caninum* a été identifié chez les ovins (Dubey *et al.*, 1990 ; O'Handley *et al.*, 2002), les caprins (Dubey *et al.*, 1996), le cheval (Dubey et Porterfield, 1990) et certains animaux sauvages comme le cerf de Virginie (*Odocoileus*

*virginianus*) (Vianna *et al.*, 2005) ou le rhinocéros (*Ceratotherium simum*) (Williams *et al.*, 2002). Enfin, de nombreuses espèces animales sont porteuses d'anticorps contre *N. caninum* (tableau I). L'infection expérimentale a été réalisée avec succès chez le chat (Dubey et Lindsay, 1989), le rat (Lindsay et Dubey, 1990), la souris (Lindsay et Dubey, 1989), la gerbille (*Meriones unguiculatus*) (Dubey et Lindsay, 2000), le singe rhésus (*Macaca mulatta*) (Barr *et al.*, 1994), le chien (Cole *et al.*, 1995), le renard roux (*Vulpes vulpes*) (Almeria *et al.*, 2002), la chèvre (Dubey *et al.*, 1992a ; Lindsay *et al.*, 1995) le mouton (Mac Allister *et al.*, 1996), le coyote (*Canis latrans*) (Lindsay *et*

*al.*, 1996), le lapin (Dubey *et al.*, 1992b) et même le pigeon (McGuire *et al.*, 1999). Actuellement, l'infection par *N. caninum* a été identifiée dans de nombreux pays. Elle constitue la principale cause d'avortement chez les bovins en Californie, Nouvelle-Zélande et aux Pays-Bas (Anderson *et al.*, 2000).

Cet article vise à synthétiser les données sur les principales méthodes de diagnostic de l'infection par *N. caninum* : les méthodes sérologiques et les méthodes de détection du parasite, ainsi qu'à résumer les données récentes sur la séroprévalence vis-à-vis de ce protozoaire dans le monde.

**Tableau I : Séroprévalence des anticorps anti-N. caninum depuis 2000.**

Année	Pays	Espèce	Technique	Prévalence	Référence
2000	Corée	Bovins	ELISA	23 %	Bae <i>et al.</i> , 2000
2000	USA	Bovins (veau)	IFAT	13 %	Dyer <i>et al.</i> , 2000
2000	USA	Bovins (génisse)	IFAT	26,20 %	Dyer <i>et al.</i> , 2000
2000	USA	Bovins (vache laitière)	IFAT	39,07 %	Dyer <i>et al.</i> , 2000
2000	Suède	Bovins (vache laitière)	ELISA	22,50 %	Frössling <i>et al.</i> , 2005
2000	Italie	Buffles	IFAT	34,60 %	Guarino <i>et al.</i> , 2000
2000	USA	Bovins (vache avortée)	IFAT/ELISA	80 %	Jenkins <i>et al.</i> , 2000
2000	Chili	Bovins (vache laitière)	IFAT	22,40 %	Moore, 2005
2000	Pérou	Bovins (vache laitière)	IFAT	62,10 %	Moore, 2005
2000	USA	Bovins (vache laitière)	ELISA	24 %	Sanderson <i>et al.</i> , 2000
2000	Nouvelle-Zélande	Bovins	ELISA	2,80 %	Tennent-Brown <i>et al.</i> , 2000
2001	USA	Bovins (veau)	agglutination	13 %	Barling <i>et al.</i> , 2001
2001	Belgique	Bovins (vache laitière)	IFAT	29 %	De Meerschman <i>et al.</i> , 2002
2001	Belgique	Bovins viandeux	IFAT	14 %	De Meerschman <i>et al.</i> , 2002
2001	Argentine	Chien de fermes (vaches)	IFAT	48%	Basso <i>et al.</i> , 2001b
2001	Argentine	Chiens de fermes ( bœufs)	IFAT	54,20 %	Basso <i>et al.</i> , 2001b
2001	Argentine	Chiens de la clinique	IFAT	26,20 %	Basso <i>et al.</i> , 2001b
2001	Suède	Bovins (vache laitière)	ELISA	37,90 %	Frössling <i>et al.</i> , 2006
2001	Brésil	Buffles	Agglutination	53 %	Fujii <i>et al.</i> , 2001
2001	USA	Renard gris	Agglutination	15,40 %	Lindsay <i>et al.</i> , 2001
2001	Brésil	Bovins (vache laitière)	IFAT/ELISA	34,80 %	Locatelli-Dittrich <i>et al.</i> , 2001
2001	Brésil	Chiens de ville	IFAT	6,70 %	Mineo <i>et al.</i> , 2001
2001	Chili	Chiens ruraux	IFAT	26 %	Moore <i>et al.</i> , 2005
2001	Chili	Chiens urbains	IFAT	12,50 %	Moore <i>et al.</i> , 2005
2001	France	Bovins (vaches mères)	ELISA	20,19 %	Pitel <i>et al.</i> , 2001
2001	France	Bovins (vaches laitières)	ELISA	18,30 %	Pitel <i>et al.</i> , 2001
2001	France	Chiens de ferme	ELISA	23,07 %	Pitel <i>et al.</i> , 2001
2001	Suisse	Bovins (vache témoin)	ELISA	28 %	Sager <i>et al.</i> , 2001
2001	Suisse	Bovins (vaches mères)	ELISA	44 %	Sager <i>et al.</i> , 2001
2002	Thaïlande	Bovins (vache laitière)	ELISA	15 %	Chanlun <i>et al.</i> , 2002
2002	Canada	Bovins	ELISA	19,20 %	Chi <i>et al.</i> , 2002
2002	Brésil	Bovins (vache laitière)	IFAT	11,20 %	Corbellini <i>et al.</i> , 2002
2002	Italie	Chiens	IFAT	6,40 %	Cringoli <i>et al.</i> , 2002
2002	Pays-bas	Bovins (vache laitière)	ELISA	55,10 %	Dijkstra <i>et al.</i> , 2002
2002	Suède	Bovins (vache laitière)	ELISA	22,60 %	Frössling <i>et al.</i> , 2006
2002	Mexico	Bovins (vache laitière)	ELISA	59 %	Garcia-Vazques <i>et al.</i> , 2002
2002	Brésil	Chiens	Agglutination	10 %	Gennari <i>et al.</i> , 2002
2002	Brésil	Chien errants	Agglutination	25 %	Gennari <i>et al.</i> , 2002
2002	RU	Ovins	ELISA	4,24 %	Helmick <i>et al.</i> , 2002
2002	RU	Ovins	IFAT	0,45 %	Helmick <i>et al.</i> , 2002
2002	RU	Porc	ELISA	8,80 %	Helmick <i>et al.</i> , 2002
2002	RU	Porc	IFAT	0 %	Helmick <i>et al.</i> , 2002
2002	Taiwan	Bovins	IFAT IgG-IgM	52,60 %	Huang <i>et al.</i> , 2004a
2002	Taiwan	Bovins	IFAT IgG	13,20 %	Huang <i>et al.</i> , 2004a
2002	Taiwan	Bovins	IFAT IgM	10,50 %	Huang <i>et al.</i> , 2004a
2002	Corée	Bovins viandeux	IFAT	4,10 %	Kim <i>et al.</i> , 2002
2002	USA	Chevaux sains	IFAT	8 %	McDole et Gay, 2002
2002	USA	Juments avortées	IFAT	13 %	McDole et Gay, 2002
2002	Argentine	Bovins (vache laitière)	IFAT	43,10 %	Moore <i>et al.</i> , 2002
2002	Paraguay	Bovins (vache laitière)	ELISA	36 %	Osawa <i>et al.</i> , 2002
2002	Paraguay	Bovins (bœuf)	ELISA	26,60 %	Osawa <i>et al.</i> , 2002
2002	Costa Rica	Bovins	ELISA	39,70 %	Romero <i>et al.</i> , 2002

Année	Pays	Espèce	Technique	Prévalence	Référence
2002	Brésil	Chiens de ferme	IFAT	21,60 %	Moore <i>et al.</i> , 2005
2003	Corée	Bovins	ELISA	12,10 %	Ahn <i>et al.</i> , 2003
2003	Nouvelle- Zélande	Chiens de ferme	IFAT	96,80 %	Antony et Williamson, 2003
2003	Brésil	Chiens urbains	IFAT	8,30 %	Canon-franco <i>et al.</i> , 2003
2003	Pays-bas	Bovins (vache laitière)	ELISA	35,90 %	Dijkstra <i>et al.</i> , 2005
2003	USA	Mammifères marins dont	Agglutination	13,60 %	Dubey <i>et al.</i> , 2005
2003	USA	Dauphins	Agglutination	91,40 %	Dubey <i>et al.</i> , 2005
2003	USA	Otaries	Agglutination	36,70 %	Dubey <i>et al.</i> , 2005
2003	USA	Phoques	Agglutination	12,50 %	Dubey <i>et al.</i> , 2005
2003	Italie	Lièvre ( <i>Lepus europaeus</i> )	Agglutination	8 %	Ezio et Anna, 2003
2003	Suède	Bovins (vache laitière)	ELISA	27 %	Frössling <i>et al.</i> , 2006
2003	Corée	Chiens urbains	IFAT	8,30 %	Kim <i>et al.</i> , 2003
2003	Corée	Chiens de ferme	IFAT	21,60 %	Kim <i>et al.</i> , 2003
2003	Brésil	Poulains	IFAT	61 %	Locatelli-Dittrich <i>et al.</i> , 2006
2003	Espagne	Bovins (vache laitière)	ELISA	15,10 %	Lopez-Gatius <i>et al.</i> , 2005
2003	Argentine	Bovins	IFAT	20,30 %	Moore <i>et al.</i> , 2003
2003	Argentine	Bovins	IFAT	4,90 %	Moore <i>et al.</i> , 2003
2003	Argentine	Bovins	IFAT	16,70 %	Moore <i>et al.</i> , 2003
2003	Argentine	Bovins	IFAT	3,90 %	Moore <i>et al.</i> , 2003
2003	Italie	Bovins (vache laitière)	ELISA	16 %	Otranto <i>et al.</i> , 2003
2003	France	Juments	Agglutination	50 %	Pitel <i>et al.</i> , 2003
2003	France	Juments	Agglutination	22,70 %	Pitel <i>et al.</i> , 2003
2003	Costa Rica	Bovins (vache laitière)	ELISA	39,70 %	Romero et Frankena, 2003
2003	Mexique	Chiens de ferme	ELISA	57 %	Sanchez <i>et al.</i> , 2003
2003	Mexique	Chiens urbains	ELISA	20 %	Sanchez <i>et al.</i> , 2003
2003	Allemagne	Bovins (vache laitière)	ELISA	7,90 %	Schares <i>et al.</i> , 2003
2003	Tchéquie	Bovins (vache laitière)	ELISA/IFAT	3,19 %	Vaclavec <i>et al.</i> , 2003
2004	Portugal	Bovins (vache normale)	Agglutination	28 %	Canada <i>et al.</i> , 2004
2004	Portugal	Bovins (vache avortées)	Agglutination	13,70 %	Canada <i>et al.</i> , 2004
2004	Italie	Chiens	ELISA	10,90 %	Capelli <i>et al.</i> , 2004
2004	Espagne	Bovins (taureaux)	IFAT	13,70 %	Caetaeno-da-Silva <i>et al.</i> , 2004
2004	Italie	Chevaux	IFAT	28 %	Ciaramella <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Chiens urbains	IFAT	10,20 %	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Chiens péri-urbains	IFAT	18,90 %	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Chiens ruraux	IFAT	21,70 %	Fernandes <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Bovins (vache laitière)	IFAT	14,30 %	Guimaraes <i>et al.</i> , 2004
2004	Uruguay	Bovins (vache laitière)	IFAT	56,70 %	Kashiwazaki <i>et al.</i> , 2004
2004	Thaïlande	Bovins (vache laitière)	ELISA	5,50 %	Kyaw <i>et al.</i> , 2004
2004	Thaïlande	Chiens	ELISA	1,20 %	Kyaw <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Poulains	IFAT	47,20 %	Locatelli-Dittrich <i>et al.</i> , 2006
2004	Allemagne	Bovins (vache laitière)	IFAT	15,10 %	Lopez-Gatius <i>et al.</i> , 2004
2004	Espagne	Bovins (vache laitière)	ELISA	15,10 %	Lopez-Gatius <i>et al.</i> , 2004
2004	Argentine	Renards	Sérologie	44 %	Martino <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Bovins (vache laitière)	ELISA	18,40 %	DeMelo <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Bovins	ELISA	12,61 %	DeMelo <i>et al.</i> , 2004
2004	Iran	Bovins (vache laitière)	IFAT	15,18 %	Sadrebazzaz <i>et al.</i> , 2004
2004	Brésil	Loups	IFAT	8,60 %	Vitaliano <i>et al.</i> , 2004
2005	Nouvelle- Zélande	Chien de ferme	IFAT	74,50 %	Antony et Williamson, 2003
2005	Nouvelle-Zélande	Chien de ville	IFAT	30,80 %	Antony et Williamson, 2003
2005	Brésil	Chien	IFAT	8,40 %	Azevedo <i>et al.</i> , 2005
2005	Pays-Bas	Bovins (lait)	ELISA	76 %	Bartels <i>et al.</i> , 2005
2005	Pologne	Bisons	ELISA	7,30 %	Cabaj <i>et al.</i> , 2005
2005	Italie	Chiens	IFAT	11 %	Capelli <i>et al.</i> , 2006

Année	Pays	Espèce	Technique	Prévalence	Référence
2005	USA	Bisons	Agglutination	0,02 %	Dubey et Thulliez, 2005
2005	USA	Caribou	Agglutination	0,03 %	Dubey et Thulliez, 2005
2005	USA	Élan	Agglutination	0,02 %	Dubey et Thulliez, 2005
2005	USA	Loups communs	Agglutination	0,03 %	Dubey et Thulliez, 2005
2005	USA	<i>Ovibos maschatus</i>	Agglutination	0,00 %	Dubey et Thulliez, 2005
2005	USA	Ours noir	Agglutination	0 %	Dubey et Thulliez, 2005
2005	Italie	Chats <6 mois	agglutination	32,50 %	Ferroglio <i>et al.</i> , 2005
2005	Italie	Chats > 6 mois	Agglutination	23,60 %	Ferroglio <i>et al.</i> , 2005
2005	Mexique	Bovins	ELISA	42 %	Garcia-Vazques <i>et al.</i> , 2005
2005	Brésil	Bovins	ELISA	32,50 %	Gaturaga <i>et al.</i> , 2005
2005	Brésil	Buffles	IFAT	70,90 %	Gennari <i>et al.</i> , 2005
2005	RU	Renards roux	IFAT	20 %	Hamilton <i>et al.</i> , 2005
2005	Japon	Bovins (vache laitière)	IFAT	20 %	Koiwai <i>et al.</i> , 2005
2005	Italie	Bovins	ELISA	30,80 %	Rinaldi <i>et al.</i> , 2005
2005	Brésil	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	ELISA	8,50 %	Silva <i>et al.</i> , 2005
2005	Brésil	<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	IFAT	38,46 %	Tiemann <i>et al.</i> , 2005
2005	Canada	Bovins (vache laitière)	ELISA	5,60 %	VanLeuwen <i>et al.</i> , 2005
2005	USA	Cerf à queue blanche	Agglutination	25,40 %	Vianna <i>et al.</i> , 2005
2005	Autriche	Chiens urbains	IFAT	2,10 %	Wanha <i>et al.</i> , 2005
2005	Autriche	Chiens ruraux	IFAT	5,30 %	Wanha <i>et al.</i> , 2005
2005	Autriche	Renards	IFAT	0 %	Wanha <i>et al.</i> , 2005
2005	Pérou	Alpaga	immunoblot	2 %	Wolf <i>et al.</i> , 2005
2005	Pérou	Lama	immunoblot	2,75 %	Wolf <i>et al.</i> , 2005
2006	Allemagne	Bovins viandeux	ELISA	41 %	Bartels <i>et al.</i> , 2006
2006	Espagne	Bovins viandeux	ELISA	41 %	Bartels <i>et al.</i> , 2006
2006	Pays-bas	Bovins viandeux	ELISA	41 %	Bartels <i>et al.</i> , 2006
2006	Allemagne	Bovins (vache laitière)	ELISA	13,70 %	Bartels <i>et al.</i> , 2006
2006	Espagne	Bovins (vache laitière)	ELISA	13,70 %	Bartels <i>et al.</i> , 2006
2006	Pays-bas	Bovins (vache laitière)	ELISA	13,70 %	Bartels <i>et al.</i> , 2006
2006	Suède	Bovins (vache laitière)	ELISA	13,70 %	Bartels <i>et al.</i> , 2006
2006	Suède	Bovins (vache laitière)	ELISA	12 %	Frössling <i>et al.</i> , 2006
2006	Hongrie	Chiens	IFAT	1,20 %	Hornok <i>et al.</i> , 2006
2006	Japon	Bovins viandeux	IFAT	1,50 %	Koiwai <i>et al.</i> , 2006
2006	Tchéquie	Animaux de Zoo	IFAT	5,60 %	Sedlak et Bartova, 2006
2006	Israël	Chiens en meute	IFAT	29,30 %	Steinman <i>et al.</i> , 2006
2006	Israël	Chacal	IFAT	0,02 %	Steinman <i>et al.</i> , 2006
2006	Israël	Renards roux	IFAT	0,04 %	Steinman <i>et al.</i> , 2006
2006	Israël	Loup s	IFAT	0,11 %	Steinman <i>et al.</i> , 2006
2006	Italie	Bovins (vache laitière)	ELISA	55 %	Varcasia <i>et al.</i> , 2006
2007	USA	Boeuf	ELISA	9,7 %	Scott <i>et al.</i> , 2007
2007	Canada	Bovins (vache laitière)	ELISA	6,4 %	Wapenaar <i>et al.</i> , 2007a

## 2. BIOLOGIE

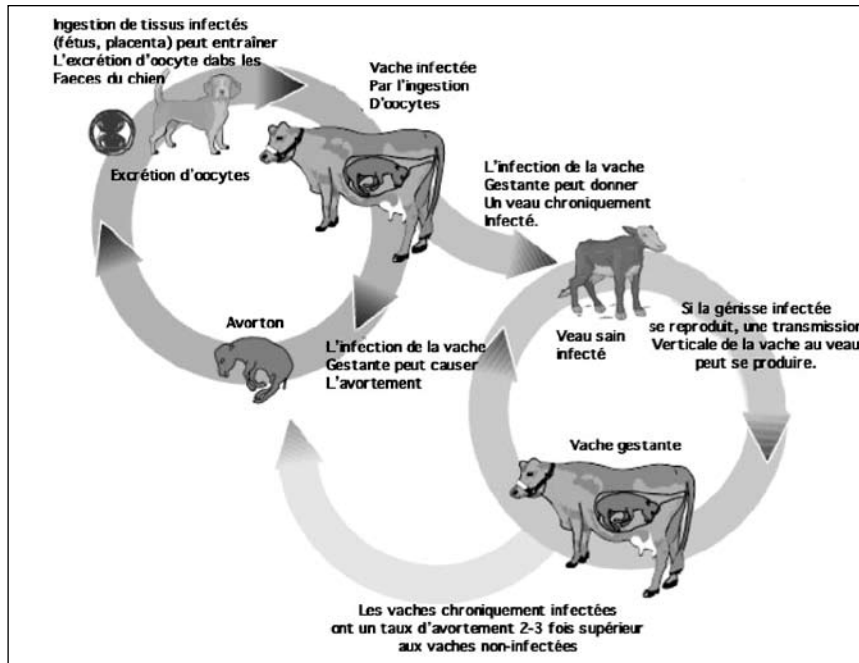
Le cycle de *N. caninum* est hétéroxène, il nécessite l'infection d'un hôte définitif et d'un hôte intermédiaire. Le chien a été identifié en premier lieu comme hôte définitif du parasite (Mc Allister *et al.*, 1998 ; Gondim *et al.*, 2002). Par la suite, on a montré que le coyote pouvait jouer ce rôle (Gondim *et al.*, 2004) et de grosses présomptions indiquent que le renard pourrait aussi jouer le rôle d'hôte définitif (Wapenaar *et al.*, 2006), c'est-

à-dire celui qui excrète le résultat de la reproduction sexuée (oocystes) du parasite. Les paramètres d'excrétion au cours du temps sont méconnus. Néanmoins, il semblerait que l'élimination d'oocystes puisse perdurer pendant au moins 4 mois (McGarry *et al.*, 2003).

Outre son rôle d'hôte définitif, le chien fait fréquemment office d'hôte intermédiaire pour *N. caninum* (McAllister *et al.*, 1998 ; Dubey, 1999a ; Dubey, 2003).

Le boeuf quant à lui est l'hôte intermédiaire principal de *N. caninum*. Le cycle du parasite peut se résumer de la manière suivante (figure 1) : les oocystes sont excrétés non sporulés dans les fèces par le chien et le coyote. Peu de choses sont connues sur la durée de survie des oocystes dans l'environnement (Lindsay *et al.*, 1999). Après une sporulation dans le milieu extérieur de 24 h environ et consommation par les herbivores, les oocystes sporulés libèrent des sporozoïtes qui pénètrent

**Figure 1.** Le cycle de vie de *Neospora caninum* (modifié de <http://www.idexx.com/production/ruminant/6163301m.pdf>, consulté le 5/03 :2006)



Les oocystes excrétés par le chien sont ingérés par la vache qui peut contaminer son veau conduisant soit à l'avortement soit à un veau infecté. Le chien peut se réinfecter par ingestion de tissus bovins contaminés.

les cellules du tractus digestif d'un hôte intermédiaire et se transforment en tachyzoïtes ; cette voie de contamination est la voie horizontale. Ces derniers se multiplient rapidement par endodyogénie dans de nombreux types cellulaires, entraînant la lyse de la cellule et l'infection des cellules voisines ce qui permet la dissémination des tachyzoïtes dans tout l'organisme.

Les tachyzoïtes peuvent alors se différencier en une forme se répliquant plus lentement : le bradyzoïte qui s'enkyste dans les tissus. Cette forme peut persister plusieurs années chez l'hôte infecté (Lindsay *et al.*, 1992). Elle constitue alors un réservoir pour l'infection du fœtus, d'autres hôtes intermédiaires ou bien celle de l'hôte définitif (chien) via la consommation de tissus infectés. Les kystes sont surtout présents au niveau du système nerveux central, et au sein des muscles squelettiques du chien et du veau infectés naturellement.

Le chien s'infecte par ingestion de tissus contaminés (viande ou autre) provenant d'un hôte intermédiaire (Basso *et al.*, 2001a ; Dijkstra *et al.*, 2001 ; Gondim *et al.*, 2002 ; Dubey *et al.*, 2004 ; Rodrigues *et al.*, 2004 ; Gondim *et al.*, 2005) ou de tissus placentaires

(Dijkstra *et al.*, 2001 ; Fioretti *et al.*, 2003 ; Dubey *et al.*, 2006).

Néanmoins, la consommation d'avortons infectés n'apparaît pas comme une source d'infection importante pour le chien (Bergeron *et al.*, 2001 ; Dijkstra *et al.*, 2002).

La principale voie de transmission du parasite est la voie transplacentaire, ou verticale (figure 1). Elle a été reproduite expérimentalement chez le chien (Dubey et Lindsay, 1990), le bœuf (Dubey *et al.*, 1992c), le mouton (Mac Allister *et al.*, 1996), la souris (Long et Baszler, 1996). En outre, les infections transplacentaires peuvent se répéter chez un même animal (Dubey *et al.*, 1988 ; Barr *et al.*, 1993). Plusieurs études ont démontré l'importance de la transmission verticale chez les bovins. En effet, au cours de la gestation des taux de passage transplacentaire allant de 80 à 100 % ont été rapportés (Paré *et al.*, 1996 ; 1997 ; Wouda *et al.*, 1998 ; Davison *et al.*, 1999a).

En l'absence de néosporose avérée, des anticorps contre *N. caninum* ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces animales (tableau I) indiquant un contact avec le parasite et comprenant des carnivores sauvages

comme le renard roux (*Vulpes vulpes*), le renard gris (*Urocyon cinereoargenteus*), le loup commun (*Canis lupus*), le loup à crinière (*Chrysocyon brachyurus*), le chacal doré (*Canis aureus*), l'ours noir (*Ursus americanus*), ainsi que des ongulés comme le buffle (*Bubalus bubalis*), le bœuf musqué (*Ovibos moschatus*), le lama (*Lama glama*), l'alpaga (*Lama pacos*), le cerf des pampas (*Ozotoceros bezoarticus*), le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*), l'élan (*Alces alces*), le caribou (*Rangifer tarandus*). Ceci suggère qu'à côté d'un cycle domestique, pourrait exister un cycle sylvaïque de propagation du parasite. Ceci est confirmé par le fait que le coyote peut excréter des oocystes de *N. caninum* dans ses matières fécales et que le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus*) est un hôte intermédiaire naturel du parasite (Rosypal et Lindsay, 2005).

### 3. DIAGNOSTIC

#### 3.1. Lésions et signes cliniques

Chez le chien, la néosporose peut entraîner une atteinte grave du système nerveux central.

Elle se manifeste le plus souvent chez le chiot suite à une infection congénitale. Néanmoins des cas cliniques graves ont été observés chez des chiens adultes voire âgés (Dubey *et al.*, 1988 ; Hoskins *et al.*, 1991 ; Dubey *et al.*, 1995).

Les signes neurologiques sont les plus fréquemment observés et consistent le plus souvent en une parésie progressive des membres postérieurs. Ceux-ci sont souvent tenus en hyperextension et l'animal présente alors la position dite du phoque. Cette hyperextension est sans doute due à une atteinte combinée des neurones moteurs et des muscles ce qui conduit à une contracture associée à de la fibrose progressive (De Meerschman et Losson, 1998).

D'autres atteintes existent pouvant se manifester par une paralysie de la mâchoire, des difficultés de déglutition (Barber et Trees, 1996), de la flaccidité ou de la fibrose musculaire et de l'insuffisance cardiaque (Hay *et al.*, 1990 ; Odin et Dubey, 1993). Dans certains cas, on note une atteinte généralisée et la plupart des organes peuvent alors être atteints. Une localisation cutanée est même décrite qui consiste en une atteinte ulcérateuse très riche en parasites (Greig *et al.*, 1995 ; Poli *et al.*, 1998).

Chez la vache, *N. caninum* est responsable d'avortements (Dubey et Lindsay, 1996). L'avortement survient en général à partir du troisième mois de la gestation ; la plupart des avortements se manifestent au cours des 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> mois (Rettigner *et al.*, 2004 ; Georgieva *et al.*, 2006). Le fœtus peut mourir *in utero*, être résorbé, momifié ou autolysé. Le veau peut être mort-né ou naître vivant. Dans ce dernier cas, l'animal est soit cliniquement atteint soit cliniquement normal mais infecté de manière chronique. Les avortements dus à *N. caninum* peuvent survenir durant toute l'année (Anderson *et al.*, 1991 ; Thurmond *et al.*, 1995 ; Wouda *et al.*, 1998).

Si une vache non-immune est infectée par *N. caninum* alors qu'elle n'est pas pleine, l'infection ne produit en général pas de signes cliniques mais une séroconversion a lieu accompagnée d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Si l'infection à lieu chez une vache non-immune pleine depuis moins de 3 mois, l'infection conduit à une mort rapide de l'embryon. Si la vache est en milieu de gestation (3-7 mois), l'infection conduit soit à l'avortement soit à la naissance d'un veau faible et anormal en fonction du mois de l'infection. Si la vache non-immune est infectée en fin de gestation, un veau faible ou normal naîtra qui sera séropositif pour *N. caninum*. En effet, le système immunitaire du veau est déjà fonctionnel et est donc plus apte à combattre l'infection (Dubey *et al.*, 2006 ; Georgieva *et al.*, 2006).

Les veaux infectés à la naissance peuvent être cliniquement normaux ou, au contraire, manifester des signes nerveux, être incapables de se lever ou encore présenter un retard de croissance important. L'examen clinique peut révéler de l'ataxie, une perte de proprioception, une diminution du réflexe rotulien, de l'exophtalmie, une déviation du globe oculaire, des déformations diverses telles que la contraction des membres antérieurs ou postérieurs (Dubey *et al.*, 1990 ; Barr *et al.*, 1991 ; Dubey et de Lahunta, 1993 ; Dubey *et al.*, 1998 ; De Meerschman *et al.*, 2005).

Cependant, comme la plupart des animaux infectés ne développent pas de signes cliniques, il est important de pouvoir réaliser un diagnostic différentiel par des examens complémentaires. Ainsi, des méthodes de diagnostic performantes ont dû être développées.

Outre les signes cliniques et l'examen lésionnel, le diagnostic repose sur la sérologie ou sur la recherche du parasite par immunohistochimie, PCR ou par des tests sur animaux.

### 3.2. La sérologie

La mise en évidence d'anticorps spécifiques anti-*N. caninum* au niveau du sérum d'une vache ayant avorté indique seulement une exposition au parasite. Les méthodes sérologiques sont des méthodes indirectes car on ne recherche pas le parasite mais bien une trace de son passage chez l'individu. En effet, suite au contact avec le parasite, l'animal va développer des anticorps spécifiques présents dans le sérum. Les méthodes sérologiques visent à rechercher la présence de ces anticorps.

La détection d'anticorps spécifiques dans le sérum des vaches peut se révéler utile pour le diagnostic des avortements à *N. caninum* et pour étudier l'épidémiologie du parasite au sein des troupeaux. Plusieurs techniques immunoenzymatiques (ELISA ou *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays*) (Bjerkas *et al.*, 1994 ; Jenkins *et al.*, 1997 ; Schares *et al.*, 2000 ; Baszler *et al.*, 2001 ; Alvarez-Garcia *et al.*, 2002 ; Reichel et Pfeiffer, 2002), et plusieurs tests d'immunofluorescence indirecte (IFAT) (Conrad *et al.*, 1993 ; Barr *et al.*, 1995 ; Paré *et al.*, 1995 ; Gondim *et al.*, 1999 ; Moore *et al.*, 2002), ainsi qu'un test d'agglutination (Packham *et al.*, 1998 ; Romand *et al.*, 1998) ont été développés.

Cependant, il est important de souligner que l'absence d'anticorps spécifiques chez le fœtus n'exclut pas la présence du parasite : le fœtus peut être trop jeune et par conséquent immuno-incompétent ou bien l'infection peut être trop récente donnant des tests sérologiques négatifs (Barr *et al.*, 1995 ; Slotved *et al.*, 1999). D'autre part, en cas d'infection chronique sous forme de bradyzoïtes, la sérologie peut se révéler négative en raison du faible degré de stimulation antigénique des formes enkystées. Enfin, les réactions croisées éventuelles sont souvent liées à la nature de la préparation antigénique ainsi qu'à la dilution du sérum utilisée (Hanukoglu, 1990).

*N. caninum* possède de nombreux antigènes comme le démontrent les profils obtenus par *immunoblot* (Barta et Dubey, 1992). Cependant, les anti-

gènes immunodominants sont l'antigène p29 ou NcSAG1 qui est similaire à l'antigène SAG1 de *Toxoplasma gondii* et l'antigène p35 homologue à l'antigène SRS2 de *T. gondii* (Howe *et al.*, 1998).

#### 3.2.1. Indirect Fluorescence Antibody Test (IFAT)

L'IFAT a été le premier test utilisé pour la recherche d'anticorps spécifiques vis-à-vis de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1988). Cette méthode représente d'ailleurs la méthode de référence lors de l'évaluation de nouveaux tests de diagnostic. Malheureusement, aucune dilution limite de référence (*cut-off*) n'a pu être déterminée de façon absolue pour le sérodiagnostic de l'infection par *N. caninum* par la méthode IFAT. La variabilité du taux d'anticorps circulants observée chez les animaux infectés (Stenlund *et al.*, 1999) ainsi que la prévalence élevée de l'infection au sein des exploitations rendent parfois difficile l'obtention de sérums négatifs de contrôle.

Le principe de l'IFAT est le suivant : les tachyzoïtes de *Neospora caninum* sont fixés sur une lame porte-objet. Les sérums sont incubés en présence des tachyzoïtes immobilisés. Après lavage, les anticorps spécifiquement fixés sont mis en évidence par un anticorps secondaire conjugué à l'isothiocyanate de fluoréscéine. Les lames sont alors examinées en microscopie à fluorescence. En pratique, on teste différentes dilutions du sérum afin de déterminer le titre en anticorps de celui-ci. L'IFAT est très spécifique de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1996). Cependant, la comparaison des résultats entre les laboratoires est difficile car la préparation des antigènes, la composition des réactifs, les dilutions des sérums utilisées et la détermination du seuil de détection peuvent varier (Rettigner, 2004).

Il est également nécessaire de prendre en considération l'âge de l'animal testé. Ainsi, pour les bovins adultes on considère des titres de 1/200 à 1/640 comme signant une infection (Conrad *et al.*, 1993 ; Haddad *et al.*, 2005) alors que des valeurs plus basses de 1/80 sont recommandées pour une infection chez le fœtus (Barr *et al.*, 1995 ; Haddad *et al.*, 2005).

L'espèce animale entre aussi en ligne de compte dans la mesure où les seuils de positivité peuvent varier d'une

espèce à l'autre toute chose étant égale en fonction notamment des anticorps secondaires conjugués qui sont spécifiques de l'espèce étudiée.

La spécificité de l'IFAT est considérée comme élevée, aucune réaction croisée n'ayant été observée vis-à-vis de *Babesia divergens*, *Sarcocystis* sp, *Eimeria bovis* et *Cryptosporidium parvum*. Par contre, certains auteurs ont mis en évidence une réactivité croisée avec *T. gondii* (Dubey *et al.*, 1996).

Lors de la lecture des lames, une attention toute particulière doit être portée à la distribution de la fluorescence. En effet, dans le cas d'une réponse humorale anti-*N. caninum*, l'entièreté de la surface du parasite est fluorescente ; lorsque seule une fluorescence apicale est observée, elle traduit une réaction non-spécifique. Cette réaction pourrait être due à l'existence de multiples contacts antigéniques de l'animal avec différents pathogènes au cours de son existence, ce type de réaction n'étant jamais observé avec les sérums fœtaux (Barr *et al.*, 1995).

Les lames pour l'IFAT pour *N. caninum* sont vendues sous forme commerciale (par exemple, VMRD Inc., USA). De plus, il existe aussi de nombreux tests non commerciaux ce qui rend aussi la comparaison des études difficile.

### 3.2.2. Tests immuno-enzymatiques (ELISA)

L'ELISA est, avec la PCR, la méthode de diagnostic qui a connu les développements les plus importants au cours des dernières années.

Il existe de nombreuses variantes de la technique mais le principe de base est le suivant : l'antigène est déposé dans un puit d'une plaque multi-puits, le sérum est ajouté et après lavage, la présence d'anticorps spécifique est mise en évidence grâce à un anticorps anti-espèce conjugué à une enzyme (peroxydase, phosphatase alcaline). La liaison de l'antigène conjugué est mise en évidence par une réaction enzymatique qui génère un produit coloré. La densité optique (DO) à la longueur d'onde adéquate est alors déterminée. Un seuil de positivité (*cut off*) est déterminé pour différencier les positifs des négatifs. Les antigènes peuvent être de composition variée : des tachyzoïtes entiers (Williams *et al.*, 1997), des tachyzoïtes lysés (Paré *et al.*, 1995 ; Schares *et al.*, 1999), divers extraits antigéniques (Osawa

*et al.*, 1998 ; Wouda *et al.*, 1998), des antigènes associés à des complexes stimulants ou iscoms (Björkman *et al.*, 1994 ; Björkman *et al.*, 1997) et des protéines recombinantes (Louie *et al.*, 1997).

#### Tachyzoïte complet

L'ELISA le plus simple est basé sur l'utilisation de tachyzoïtes entiers comme antigène. C'est le cas notamment de la trousse commerciale CHEKIT (Bommeli diagnostics, Bern). Ce test a été utilisé pour suivre la sérologie des vaches laitières durant la gestation (Häsler *et al.*, 2006).

#### Lysat de tachyzoïtes

Un ELISA utilisant un extrait brut de tachyzoïtes de *N. caninum* a été développé, il s'est montré plus sensible et plus spécifique que l'IFAT (Paré *et al.*, 1995).

Ce test a servi de base aux trousse commerciales IDEXX (IDEXX Laboratories) et Biovet (Biovét Laboratories). Ces deux tests ont été validés par rapport à l'*immunoblot*. Les performances de ces deux tests étaient comparables (Wu *et al.*, 2002).

#### Immunostimulating complex (ISCOM)

Les ISCOM sont des particules sphériques de 30-40 nm de diamètre composées de saponine, de phospholipides de cholestérol et de protéines. Elles sont amphiphyles (hydrophiles à l'extérieur et hydrophobes à l'intérieur) mimant la structure de la membrane plasmique. Ils sont surtout utilisés pour solubiliser les antigènes et pour servir d'adjuvant lors des immunisations. Mais les antigènes portés par les ISCOM peuvent aussi être utilisés en ELISA (Björkman et Lunden, 1998). Cette technique permet de bien solubiliser les protéines de membrane et de diminuer le bruit de fond ainsi que les réactions croisées avec d'autres parasites (Björkman *et al.*, 1997). Un tel ELISA a d'abord été développé pour la sérologie chez le chien (Björkman *et al.*, 1994) et ensuite pour la sérologie chez les bovins (Björkman *et al.*, 1997). Récemment ce test a été utilisé pour la détection d'anticorps spécifiques de *N. caninum* dans le lait de vache (Frössling *et al.*, 2006).

#### Antigène recombinant ou purifié

Une partie d'un cadre de lecture

codant pour un antigène est amplifiée par PCR et clonée dans un vecteur d'expression en fusion avec un cadre de lecture codant pour un peptide facilement purifiable (Glutathion-S-tranférase, His-Tag). Après induction, la protéine de fusion formée est purifiée par chromatographie d'affinité et utilisée comme antigène en ELISA. Une telle approche a été utilisée pour réaliser un ELISA basé sur l'antigène NcSAg1 (Chahan *et al.*, 2003).

De façon alternative, l'antigène peut être purifié par chromatographie d'affinité en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène. Cette approche a été appliquée pour l'antigène p38 de *N. caninum* (Schaes *et al.*, 2000). Le problème de l'utilisation d'antigènes purifiés réside dans le choix d'un antigène qui doit être exprimé de façon constitutive par les différentes formes du parasite. Certains auteurs recommandent l'utilisation d'un mélange d'antigènes purifiés afin d'augmenter la sensibilité du test (Gross *et al.*, 2004).

#### ELISA par compétition

Plusieurs ELISA dits de compétition (Baszler *et al.*, 1996 ; McGarry *et al.*, 2000) ont été développés afin d'éliminer la nécessité d'un anticorps secondaire spécifique de l'espèce testée. Dans un tel test, les sérums à tester sont ajoutés aux plaques recouvertes d'antigène. Après incubation, les plaques sont lavées. Les anticorps spécifiques présents dans le sérum se seront liés aux antigènes fixés dans le puits. Ensuite, des anticorps spécifiques de *N. caninum* et conjugués à la peroxydase sont ajoutés. Les anticorps conjugués fixés sont révélés par réaction immuno-enzymatique. Plus il y a d'anticorps spécifique de *N. caninum* dans le sérum moins la réaction sera importante en raison de la compétition plus grande entre les anticorps du sérum et les anticorps conjugués pour les antigènes de *Neospora caninum* (Hemphill *et al.*, 2000).

#### ELISA d'avidité

La distinction entre les infections récemment acquises et celles plus anciennes, peut être réalisée grâce à l'incorporation d'une étape d'incubation en présence d'urée, celle-ci éliminant les anticorps de faible avidité produits au cours de la phase aiguë de l'infection (Björkman et Ugglä, 1999 ; Schares *et al.*, 2002).

La réactivité d'un anticorps se caractérise par son affinité et son avidité. L'affinité d'un anticorps pour l'antigène spécifique caractérise l'intensité des forces de liaison du complexe Ag-Ac. Elle est mesurée par la constante d'association intrinsèque  $K = [Ag \cdot Ac] / [Ag][Ac]$ . L'avidité d'un anticorps pour l'antigène spécifique conditionne la rapidité de l'apparition d'une réaction antigène-anticorps. Elle dépend de la constante d'association, de la valence de l'anticorps, du nombre d'épitopes, de la température, du pH et de la force ionique du milieu. C'est donc une valeur expérimentale. Au cours d'une immunisation, l'affinité et l'avidité des anticorps augmentent car les anticorps qui apparaissent ont des sites des plus en plus étroitement complémentaire des épitopes (Assim, 1989).

L'ELISA d'avidité est basé sur cette propriété. Un ELISA classique est effectué, ensuite les anticorps de faible avidité sont détachés par traitement à l'urée. L'absorbance est de nouveau mesurée et l'avidité est calculée (Björkman et Ugglä, 1999). Björkman et al., 1999 ont montré lors d'une infection expérimentale chez le veau qu'après trois semaines d'infection, l'avidité était de 9 à 18 %, alors que 24 semaines après l'infection elle était supérieure à 50 %. Une telle approche a aussi été menée avec un ISCOM-ELISA (Björkman et al., 2005) ou avec un ELISA contre l'antigène P38 purifié (Schaes et al., 2002).

#### Caractéristiques de l'ELISA

La spécificité du test ELISA est tributaire du type d'antigènes parasitaires utilisés. En effet, il apparaît que des réactions croisées sont plus fréquemment observées lors de l'utilisation d'antigènes totaux (Dubey et Lindsay, 1996) tandis que seule une faible réaction croisée avec des anticorps anti-*S. cruzi* a été observée lorsque des antigènes hydrosolubles étaient utilisés. En outre, dans ces conditions aucune réaction croisée vis-à-vis de *T. gondii*, *C. parvum* et *E. bovis* n'a été observée (Paré et al., 1995).

En général, tous les tests ELISA présentent une bonne sensibilité si les sérums testés contiennent des taux moyens ou élevés d'anticorps. Cette situation correspond aux animaux primo-infectés, à ceux dont l'infection latente a été réactivée, aux vaches venant d'avorter et aux animaux testés durant la

période de mise bas. Néanmoins, un faible taux d'anticorps spécifiques est fréquemment observé chez les animaux infectés par *N. caninum* car ces derniers peuvent montrer des fluctuations importantes du taux d'anticorps (Quintanilla-Gozalo et al., 2000). Le taux d'anticorps tend également à diminuer fortement plusieurs mois après l'avortement (Stenlund et al., 1999). Il est également faible chez les animaux infectés depuis moins de 2 semaines (Lunden et al., 1998) et, plusieurs mois après leur naissance, chez les veaux congénitalement infectés (Hietala et Thurmond, 1999). Il est donc nécessaire d'adapter le choix du test et la dilution du sérum à tester aux conditions de terrain.

D'autre part, on peut modifier la valeur du « cut off » si on veut réaliser un diagnostic de séroprévalence dans un cas d'avortement chez la vache par rapport à une surveillance de séroprévalence normale (Vaclavik et al., 2003)

#### **3.2.3. Immunoblot**

L'immunoblot est aussi utilisé dans le cadre de la détection d'anticorps spécifiques (Schaes et al., 1999 ; Atkinson et al., 2000 ; Söndgen et al., 2001).

Cette technique consiste à réaliser une séparation des protéines en SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane. La membrane est bloquée, puis hybridée avec le sérum. La présence d'anticorps fixés est ensuite mise en évidence par un anticorps conjugué à une enzyme dont l'activité génère un précipité coloré au niveau des protéines du parasite reconnues par les anticorps du sérum.

La technique de *Western blot* ou *Immunoblot* est utilisée au sein de plusieurs laboratoires de recherche pour le diagnostic de l'infection par *N. caninum*. Le poids moléculaire des antigènes reconnus par les anticorps spécifiques du sérum testé varie selon les conditions de préparation des antigènes (Barta et Dubey, 1992). Un animal est considéré comme infecté si au moins 3 des 5 antigènes immunodominants (IDA ; 17, 29, 30, 33 et 37 kDa) sont reconnus (Schaes et al., 1998 ; Schaes et al., 1999). Chez les avortons, un antigène de 40 kDa est également pris en compte, la reconnaissance de 2 de ces 6 IDA rend la

sensibilité et la spécificité du test supérieures à celles de l'IFAT lorsque des échantillons de fluide péritonéal, pleural ou abomasal sont analysés (Söndgen et al., 2001).

Les principaux antigènes de *N. caninum* ont un poids moléculaire apparent en *immunoblot* variant de 11 à 175 kDa (Baszler et al., 1996). Les antigènes immuno-dominants sont p29 et p35 (Howe et al., 1998). L'*immunoblot* est souvent utilisé comme méthode complémentaire aux autres tests (Atkinson et al., 2000) même si des études sérologiques sur des troupeaux bovins ont été menées par *immunoblot* (Schaes et al., 1998 ; Atkinson et al., 2000).

Un *immunoblot* anti-p17, un antigène immunodominant, a récemment été développé pour une étude de séroprévalence chez les bovins (Alvarez-Garcia et al., 2006).

C'est une technique malgré tout lourde et difficile à mettre en œuvre pour du diagnostic de routine surtout sur des cheptels. Par conséquent, il s'agit surtout d'une technique de confirmation en cas de test sérologique classique (ELISA, IFAT, DAT) positif ou douteux.

#### **3.2.4. L'agglutination directe**

Il s'agit d'un test de détection d'anticorps anti-*N. caninum* basé sur l'agglutination de tachyzoïtes de *N. caninum* intacts et formolés. Ce test détecte les IgG et les IgM spécifiques avec une prédilection pour les IgM.

Deux tests utilisant des isolats différents de *N. caninum* ont été décrits : le test décrit par Romand et collaborateurs (1998) qui fait intervenir l'isolat canin NC-1 alors que le test de Packham et collaborateurs (1998) utilise l'isolat bovin BPA-1.

Ce test à l'avantage de ne pas faire appel à un conjugué spécifique de l'hôte testé, l'agglutination directe permet de tester des sérums issus de n'importe quelle espèce sous réserve d'établir des seuils de positivité pour chaque espèce.

Par rapport à l'IFAT, la sensibilité relative de ce test est bonne mais pas la spécificité relative car des faux-positifs sont observés sur les fluides fœtaux contenant du pus ou sur des sérums hémolysés (Dubey et Schaes, 2006).

Ce test est hautement reproductible, facile à mettre en œuvre et ne



nécessite pas de matériel particulier. L'utilisation de plaques 96 puits permet de tester simultanément un grand nombre de sérums et de dilutions.

### 3.3. Les méthodes de détection du parasite

Lorsque le résultat des tests sérologiques s'avère négatif, cela n'exclut pas la possibilité que l'animal soit effectivement infecté par *N. caninum*. La mise en place d'une réponse humorale dépend de l'âge du fœtus, plus précisément de la maturité de son système immunitaire au moment de l'infection, mais aussi du temps écoulé entre le moment de l'infection et le prélèvement (Lunden *et al.*, 1998 ; Maley *et al.*, 2001) chez le fœtus. D'autre part, en cas d'infection chronique, il est possible que le parasite sous forme enkystée ne stimule plus suffisamment le système immunitaire donnant une sérologie négative alors que la recherche du parasite au niveau des organes se révèle positive. La détection du parasite est aussi indiquée pour les sérologies positives en cas d'avortement compte tenu de la forte prévalence sérologique et du « portage » chronique du parasite.

Il est donc important de pouvoir mettre en évidence le parasite directement à partir d'un tissu. Pour ce faire, plusieurs approches sont utilisées : l'immunohistochimie, l'amplification génétique ou encore les inoculations d'animaux.

#### 3.3.1. L'immunohistochimie

Une autre méthode de diagnostic fréquemment utilisée est l'immunohistochimie, elle permet de mettre en évidence la présence d'antigènes parasitaires au sein des tissus infectés. Les tachyzoïtes sont fréquemment observés au sein du cerveau (85 % des fœtus examinés) mais ils peuvent aussi être détectés dans le foie (26 %) et le cœur (14 %) (Wouda *et al.*, 1997). Néanmoins cette technique reste assez peu sensible (Dubey, 2003) et nécessite donc la réalisation de plusieurs coupes à différents endroits de l'organe.

Le tissu infecté est enrobé en bloc de paraffine et de fines sections sont réalisées. Les coupes sont déparaffinées et un sérum spécifique de *Neospora caninum* est appliqué sur la lame. Les anticorps fixés sont révélés par un anticorps conjugué à une enzyme. La

réaction enzymatique provoque la formation d'un précipité coloré à l'endroit de fixation des anticorps conjugués.

Cette approche a été utilisée pour mettre en évidence *N. caninum* dans des sections de cerveaux d'avortons bovins (De Meerschman *et al.*, 2002) ou dans d'autres espèces ou d'autres tissus (Buxton *et al.*, 1997 ; 1998).

La qualité dépend de la spécificité des anticorps. D'autre part, si on utilise un anticorps à la peroxydase il faut éliminer la peroxydase endogène au tissu avant de réaliser le marquage.

#### 3.3.2. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La présence d'ADN parasitaire peut être mise en évidence au sein des tissus. Bien que cette technique ne soit pas toujours utilisée en routine partout dans le monde, elle a été largement développée et de nombreuses méthodes de PCR reposant sur l'utilisation de séquences spécifiques à *N. caninum* sont disponibles.

En 1983, un processus simple dans le concept d'amplification du nombre de fragments d'ADN présents dans un échantillon fut développé par Mullis (1990). Ce processus est appelé « Polymerase Chain Reaction » (PCR). Très rapidement, la PCR est devenue la méthode de choix pour l'amplification de l'ADN. La technique est basée sur la polymérisation cyclique de la séquence d'ADN choisie grâce à deux oligonucléotides bordant la séquence à amplifier et à une ADN polymérase thermostable (China *et al.*, 2002).

##### 3.3.2.1. Les PCR nichées et semi-nichées

Lorsque l'ADN recherché est présent en faible quantité parmi une quantité importante d'ADN étranger comme c'est le cas pour le parasite dans un tissu, souvent la PCR simple n'est pas assez sensible. On utilise alors une PCR nichée ou semi-nichée. La PCR nichée (*nested PCR*) consiste à amplifier l'ADN cible par PCR puis à utiliser le produit de cette PCR comme cible dans une deuxième PCR en utilisant des primers qui sont internes par rapport aux primers de la première PCR. Dans la PCR semi-nichée, le même principe est utilisé mais les primers de la seconde PCR sont constitués d'un primer de la première PCR et

d'un primer interne. Le gros problème de la PCR nichée ou semi-nichée c'est le risque de contamination d'un tube négatif par un produit positif de la première PCR. Il en résulte un taux de faux-positifs important. Il est recommandé de travailler en tubes individuels fermés et d'introduire le plus souvent possible (au mieux entre chaque échantillon) des contrôles négatifs de PCR). Alternativement, on peut utiliser une PCR nichée n'utilisant qu'un seul tube afin d'éviter les contaminations (Ellis *et al.*, 1999).

##### 3.3.2.2. La PCR en temps réel

La PCR en temps réel permet de mesurer l'accumulation du produit de PCR à chaque cycle au cours de la réaction d'amplification. Le principe est d'utiliser un marquage fluorescent du produit de PCR. Le fluorochrome est ajouté à la réaction de PCR. La réaction de PCR et la détection du produit de PCR sont donc simultanées. L'appareil de PCR en temps réel mesure l'intensité de la fluorescence à chaque cycle et construit la courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles.

On définit un seuil de fluorescence correspondant à 10 fois le bruit de fond. Le cycle où la courbe dépasse le seuil est appelé le cycle seuil ou « cycle Threshold » (Ct) en abrégé. Cette valeur est le paramètre le plus important de la PCR en temps réel. En effet, il existe une relation linéaire entre la valeur du Ct et le logarithme du nombre de copies présentes. C'est donc la base de la quantification par PCR en temps réel. Habituellement on observe une excellente linéarité sur sept ordres de grandeur ce qui permet de mesurer le nombre de copies dans une gamme très large de quantités d'ADN cible.

Pour la détection de l'amplicon, on peut utiliser un marquage non spécifique ou spécifique.

Le marquage non spécifique utilise comme fluorochrome le SybrGreen® (Schneeberger *et al.*, 1995) qui se lie spécifiquement à l'ADN bicaténaire. L'avantage de cette méthode est son faible coût. Le désavantage de ce processus est son manque de spécificité dû au fait que le fluorochrome se liera indifféremment aux produits de PCR spécifiques et non spécifiques. On peut circonscrire ce problème en réalisant après la PCR une courbe de

dissociation permettant de déterminer la température de fusion de l'amplicon et de comparer cette température à celle attendue pour l'amplicon recherché. Une autre méthode est d'utiliser une détection spécifique du produit de PCR recherché. Parmi ces techniques spécifiques, on trouve l'utilisation des sondes TaqMan (*Applied Biosystems*) basée sur l'activité d'exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase (Holland *et al.*, 1991). La sonde spécifique est marquée deux fois : un fluorochrome *quencher* situé en 3' et un fluorochrome reporter en 5'. Dans cette configuration, la fluorescence émise par le reporter est absorbée par le *quencher* situé dans son voisinage et aucune fluorescence n'est détectée. Au cours de la polymérisation, la Taq polymérase dégrade la sonde située sur son chemin et libère le reporter du *quencher*. La fluorescence associée au fluorochrome *reporter* ainsi mesurée est proportionnelle à la quantité de produit généré (Livak *et al.*, 1995). D'autres technologies moins utilisées ont également été développées comme le FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) (Wittwer *et al.*, 1997) ou encore les « *molecular beacons* » (Tyagi et Kramer, 1996 ; China *et al.*, 2002).

### 3.3.2.3. Inconvénients de la PCR

Les points faibles de la PCR sont : la susceptibilité aux contaminations par de l'ADN étranger qui peut être amplifié avec l'échantillon et la présence d'inhibiteurs (Cimino *et al.*, 1991).

En effet, si on travaille à partir de matrices complexes comme les aliments, le sang ou les matières fécales, il est possible que ces échantillons contiennent des inhibiteurs de la réaction de PCR qu'il faudra éliminer avant la PCR (Wilson, 1997). Il en résulte l'obtention de résultats faussement négatifs. Pour remédier à cela, on recourt à un contrôle interne d'amplification. Il s'agit par exemple d'une molécule d'ADN étranger bordée par les séquences des primers utilisés pour détecter l'ADN cible. Le contrôle est choisi plus grand que le produit de PCR cible de manière à favoriser l'amplification de l'ADN cible que l'on ajoute à chaque réaction de PCR. On détermine la plus petite quantité de CI à ajouter pour avoir toujours un signal afin de limiter au maximum la compétition pour les primers. C'est

cette quantité qui est ajoutée lors de la PCR. Quatre possibilités d'amplification existent (i) le CI interne et l'ADN sont amplifiés, (ii) l'ADN cible est amplifié mais pas le CI (cas où l'ADN cible est abondant), dans ces deux cas le résultat est positif ; (iii) le contrôle interne est amplifié et pas l'ADN cible ce qui signe un résultat négatif ; (iv) ni le contrôle interne, ni l'ADN cible n'est amplifié ce qui signe une inhibition de la PCR.

Un autre type de contrôle interne peut consister en l'amplification simultanée du gène cible et d'un gène présent dans chacun des échantillons (gène de la GAPDH par exemple) (Lidell *et al.*, 1999). Outre les problèmes liés à l'inhibition, on peut aussi rencontrer des problèmes de contamination lors de la PCR.

En effet, si la PCR est habituellement décrite comme une méthode sensible, elle peut se révéler délicate en raisons des faux positifs résultant de contaminations de la réaction par de l'ADN cible exogène. Ceci peut être évité grâce à divers traitements qui visent à détruire l'ADN exogène comme l'irradiation aux UV, l'utilisation d'hypochlorite de sodium ou par des méthodes enzymatiques (utilisation de l'urocyl-N-glycosylase) ainsi que la séparation physique des différentes étapes pré et post-PCR (ISO22174, ISO, 2004).

### 3.3.2.4. Détection par PCR de *N. caninum*

En ce qui concerne *N. caninum* il s'agit dans un premier temps de trouver un fragment d'ADN à amplifier qui est spécifique de ce parasite. Plusieurs cibles ont été testées : la région codant pour les ARN ribosomiaux et en particulier la région intergénique (ITS1) (Payne et Ellis, 1996), le gène NC5 (Kaufmann *et al.*, 1996 ; Yamage *et al.*, 1996), l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 18S (Dubey et Schares, 2006) et le gène 14-3-3 (Lally *et al.*, 1996).

Les principaux systèmes PCR pour la détection de *N. caninum* sont repris au tableau II.

Classiquement, la détection de *N. caninum* par PCR se fait en utilisant la technique de la PCR nichée ou semi-nichée. La PCR nichée a été utilisée pour détecter la présence de *N. caninum* dans le sperme et le sang

de taureau infecté expérimentalement (Serrano-Martinez *et al.*, 2007) Mais des applications en PCR classique, PCR compétitive et en PCR en temps réel ont été réalisées (tableau II). Ainsi la PCR en temps réel a été récemment utilisée pour détecter *N. caninum* au niveau des avortons bovins (Reitt *et al.*, 2007).

### 3.3.4. Les tests sur animaux

La souris *knock-out* pour le gène de l'interféron gamma est très sensible à une inoculation parentérale de tachyzoïtes ou de kystes de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1998 ; Dubey, 2003) ; il en va de même pour la souris nude où la voie intrapéritonéale est utilisée (Sawada *et al.*, 1997). La gerbille (*Meriones unguiculatus*) est sensible à une inoculation par des oocystes (Dubey et Lindsay, 2000). Ainsi, il est possible de mettre en évidence la présence de *N. caninum* dans un tissu ou dans les matières fécales de chien par inoculation d'un extrait du tissu ou du prélèvement par voie orale à un rongeur sensible. Ainsi des matières fécales de chien ont été inoculées à des gerbilles et les tissus des animaux morts ont été fixés et analysés par immunohistochimie pour mettre en évidence la présence de *N. caninum* (Basso *et al.*, 2001a).

De même, des extraits de cerveaux de cerfs de Virginie ont été inoculés à des souris et les tissus des souris mortes furent examinés au microscope pour mettre en évidence le parasite (Vianna *et al.*, 2005). Cependant, pour des raisons éthiques cette approche n'est pas à privilégier. De plus ce sont des techniques longues et onéreuses peu compatibles avec le diagnostic de routine en laboratoire.

## 4. LA COMPARAISON DES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC

De nombreux paramètres permettent de quantifier l'efficacité d'une méthode par rapport à une autre. Les plus utilisés sont : la spécificité relative, la sensibilité relative et le coefficient Kappa de Cohen mais d'autres approches ont été décrites comme l'approche bayésienne (Le bozec, 2001). Dans tous les cas, il s'agit de voir si une méthode alternative donne d'aussi bons résultats que la méthode de référence (Gold standard). Dans le

**Tableau II : Principaux système PCR utilisés pour détecter N. caninum**

Gène	Primers	Matrice	Techinque utilisée	Référence
NC5	NP1, NP2, NP3, NP4, NP5 NP6, NP7, NP8, NP21	Cerveau de souris	PCR Classique	Yamage <i>et al.</i> , 1996
NC5	NP21/NP6	Tachyzoites	PCR classique+hybridation	Muller <i>et al.</i> , 1996
ITS1	NS1-SR1	Tachyzoites	PCR classique	Payne et Ellis, 1996
Nss-RNA	COC1-COC2-sondeneo	Sang et liquide amniotique de bovins et de singes	PCR classique-southern Blot	Ho <i>et al.</i> , 1996
ITS1	NN1/NN2, NP1/NP2	Avortons de moutons	PCR nichée	Buxton <i>et al.</i> , 1998
NC5 PRL	PCR1 : NP4/NP7 PCR2 : NP6/ NP7 NP4/NP7-HL035/HL033	Avortons de bovin	PCR semi-nichée PCR classique multiplex	Baszler <i>et al.</i> , 1999
NC5	NP21/NP6	Tissus de souris	PCR compétitive	Liddell <i>et al.</i> , 1999
ITS1	Tim3, Tim 11	Sang de bovin	PCR classique	Okeoma <i>et al.</i> , 2004
ITS1	NF1, NS2, NR1, SR1	Cerveau de chien et d'avortons bovins	PCR nichée	Ellis <i>et al.</i> , 1999
NC5	Collantes 1-collantes 2	Cerveaux d'avortons bovins et de souris	PCR en temps réel-sybrgreen	Collantes-Fernandez <i>et al.</i> , 2002
NC-5	PRIMERS : NP21/NP6 SONDES : Np5LC-Np 3FL	Cerveau de rat	PCR en temps réel : FRET	Muller <i>et al.</i> , 2002
NC5	PCR1 : NP21/NP6 PCR2 : NP7/ NP6 PCR1 : NP4/NP7 PCR2 : NP6/ NP7	Cerveaux d'avortons bovins	PCR semi-nichée	Paula <i>et al.</i> , 2004

NP1 : CCGAGAATGAGAGCGATT – NP2 : CGCTCTGCAAAACCCATCTA-NP3 : CAGGTGTCTTCTCTGAG-NP4 : CCTCCCAATGCGAACGAAA  
 NP5 : TGACTGGAGGCACGCTGAA-NP6 : CAGTCAACCTACGTCTTCT-NP7 : GGGTGAACCGAGGGAGTTG-NP8 : GTTCACCCGTTACACACT –  
 NP21 : GTGCGTCCAATCCTGTAAC  
 Tim3 : CCGCTGCAGGTGAACCTGCGGAAGGATC-Tim11 : CACTGAAAACAGACGTACC  
 NF1 : GCGTGATATACTACTCCCTGT-NS2 : CATGTGGATATTTTGA-NR1 : AAACCTCTGGAAGTTAAAG-SR1 : AAATAACGGTGTGGGAAA  
 NS1 : GCTGATAATGAAAGTGTGT-SR1 : AAATAACGGTGTGGGAAA  
 COC1 : AAGTATAAGCTTTTATACGGCT-COC2 : CACTGCCACGGTAGTCCAATAC-Sondeneo : AGTCAAACGCG  
 collantes1 : ACTGGAGGCACGTGAACAC-collantes2 : AACAATGCTTCGCAAGAGGAA  
 HL033 : CGAGTCTTATGAGCTTGATTCT-HL035 : GCCTCCAGAAGTCGTTTGT  
 NP5LC : TCCCTCGGTTACCCGTTACACACAC-NP3FL : CAGGTATCCACCTCTCACCGCTACCA  
 NN1 : TGAACCTTTGAATCCCAA-NN2 : CGAGCAAAGACATCCATT-NP1 : TACTACTCCCTGTGAGTTG-NP2 : TCTCTCCCTCAAACGGT

cas d'une pathologie déclarée, on peut appliquer ces paramètres pour évaluer la capacité du test à différencier les animaux sains des animaux malades. Toutes ces méthodes sont valables et, dans la littérature, on retrouve indifféremment l'une ou l'autre voire plusieurs en combinaison.

#### 4.1. La spécificité, la sensibilité et l'exactitude relative

Lorsqu'on veut comparer deux méthodes entre-elles, on peut utiliser la spécificité, la sensibilité et l'exactitude relatives (figure 2). Soit deux tests A (pris comme référence) et B (nouvelle méthode), les échantillons sont analysés par les deux tests. On peut répartir les résultats dans un tableau à deux entrées. On distingue les échantillons positifs pour les deux tests, les échantillons négatifs pour les deux tests, les échantillons positifs pour le test A et négatifs pour le test B et les échantillons négatifs pour le test A et positifs pour le test B. Cette disposition

permet de calculer différents paramètres. L'accord positif (PA) correspond aux échantillons positifs pour les deux méthodes (vrais positifs, VP), L'accord négatif (NA) correspond aux échantillons négatifs pour les deux méthodes (vrais négatifs, VN), La déviation positive (PD) correspond aux échantillons négatifs pour la méthode A et positifs pour la méthode B (faux positifs, FP). Inversement, la déviation négative (ND) correspond aux échantillons positifs pour la méthode A et négatifs pour la méthode B (faux négatifs, FN). L'exactitude relative est définie comme étant le nombre de NA + PA/N où N est le nombre total d'échantillons testés. La spécificité relative (SP) est égal à NA/N- où N- est le nombre total d'échantillons négatifs pour la méthode de référence. La sensibilité relative (SE) est égale à PA/N+ où N+ est le nombre d'échantillons positifs pour la méthode de référence (norme ISO16140 ; ISO, 2001). L'indice de Youden (J = sensibilité + spécificité - 1) est une valeur qui tient compte de la

sensibilité et de la spécificité du test et sera donc élevé uniquement si les deux paramètres sont eux-mêmes élevés.

D'autre part, on peut aussi calculer la valeur prédictive positive qui est la proportion de vrais positifs parmi l'ensemble des réponses positives d'un test. Il s'agit donc des vrais positifs (VP = A de la figure 2) sur l'ensemble des positifs du test alternatif (VP + FP). Cette valeur va dépendre de la sensibilité, de la spécificité et de la fréquence des positifs. La VPP sera d'autant plus élevée que la sensibilité et la spécificité du test sont élevées mais surtout que la fréquence des positifs est élevée (Toma *et al.*, 2001). La valeur prédictive négative est la proportion de vrais négatifs (VN) par rapport à l'ensemble des négatifs du test (VN + FN), elle varie aussi en fonction de la sensibilité, de la spécificité et de la fréquence des positifs. Un autre point de comparaison est la limite de détection de la méthode qui est la plus basse concentration détectée pour un composé analysé (ADN,

**Figure 2.** Les principales méthodes de comparaison de méthodes.

		Méthode de référence			
		Positif	Négatif		
Méthode alternative	Positif	A	B (FP)	A + B	VPP = A/A + B
	Négatif	C (FN)	D	C + D	VPN = D : C + D
		A + C	B + D	N	
		Se = A/A + C	Sp = D/B + D		ER = A + D/N

Exactitude Relative ER =  $\left[ \frac{(A+D)}{N} \right] * 100$  ; Spécificité relative Sp =  $\left[ \frac{D}{(B+D)} \right] * 100$  ;

Sensibilité relative Se =  $\left[ \frac{A}{(A+C)} \right] A/A + C * 100$

Indice de Youden J = Spécificité – Sensibilité - 1  
 VPP = Valeur prédictive positive ; VPN = valeur prédictive négative ; FP = faux positifs ; FN (faux négatifs)  
 Kappa de Cohen.  
 Concordance réelle = exactitude relative  
 concordance aléatoire =  $\left[ \left( \frac{(A+C)(A+B)}{N^2} \right) + \left( \frac{(B+D)(C+D)}{N^2} \right) \right]$

K = Concordance réelle-concordance aléatoire / 1-concordance aléatoire (concordance potentielle)

Rapport de vraisemblance positif RV + =  $\left[ \frac{A}{A+C} \right] / \left[ \frac{B}{B+D} \right] = \frac{\text{sensibilité}}{1 - \text{spécificité}}$

Rapport de vraisemblance négatif RV - =  $\left[ \frac{C}{A+C} \right] / \left[ \frac{D}{D+B} \right] = \frac{1 - \text{sensibilité}}{\text{spécificité}}$

Odd += A/C, Odd -= B/D Odds ratio = AD/CB

Si on compare une méthode alternative par rapport à une méthode de référence, on peut construire une table 2 x 2 reprenant les résultats positifs pour les deux méthodes (a), négatifs pour les deux méthodes (d), les résultats positifs pour la méthode de référence et négatifs pour la méthode alternative (b), les résultats négatifs pour la méthode alternative et positifs pour la méthode de référence (c). De là, on peut calculer différentes valeurs qui permettent de comparer les deux méthodes.

parasite, anticorps spécifiques) dans une matrice réelle, qui lorsque traité à travers toutes les étapes d'une méthode complète, incluant les extractions chimiques et le prétraitement, produit un signal détectable avec une fiabilité définie, statistiquement différent de celui produit par un « blanc » dans les mêmes conditions. La limite de détection sera d'autant plus basse que la sensibilité et la spécificité de la méthode sont grandes.

#### 4.2. La statistique Kappa de Cohen

Une autre façon de réaliser une comparaison de méthodes consiste à utiliser la statistique Kappa (K) de Cohen (Cohen, 1960). Le coefficient Kappa mesure l'intensité de la concordance réelle entre deux méthodes. Il est égal à la différence entre la concordance

observée et la concordance aléatoire divisée par la concordance potentielle (figure 2).

En pratique la concordance entre les deux méthodes est d'autant plus grande que la valeur de K est grande (avec K compris entre 0 et 1). On considère que la concordance est mauvaise si le coefficient K est compris entre 0 et 0,2, faible si K est compris entre 0,21 et 0,4, moyenne si la valeur de K est comprise entre 0,41 et 0,6, bonne si K est compris entre 0,61 et 0,8 et excellente si K est compris entre 0,81 et 1.

#### 4.3. Exemples de comparaisons de méthodes appliquées à la détection de *N. caninum*

Baszler et collaborateurs (2001) ont validé un test ELISA par compétition

en calculant la spécificité (98,6 %), la sensibilité (97,6 %) et l'exactitude (97,8 %) par rapport à des sérums venant de vaches qui avaient avorté ou non. Dans un second temps il ont testé la spécificité (96,8 %), la sensibilité (96,4 %) et l'exactitude (96,7 %) relatives par rapport à des sérums bovins qui avaient été préalablement testés par IFAT. Ce type d'étude a également été mené par d'autres chercheurs (Capelli *et al.*, 2006) pour valider un autre test d'ELISA par compétition ; ils ont obtenus des valeurs de sensibilité et de spécificité relatives de 72 et 89,3 %, respectivement.

Le kappa de Cohen a été utilisé pour comparer les résultats de sérologie obtenus par deux tests ELISA commerciaux et l'IFAT sur des sérums de taureaux de reproduction (Caetano-da-Silva *et al.*, 2004), les valeurs obtenues étaient de 0,87 pour un ELISA et 0,93 pour l'autre. L'indicateur kappa a aussi été utilisé pour valider une méthode sérologique par immunoblot par rapport à l'IFAT pour des sérums bovins. La concordance était excellent (k = 0,86) (Alvarez-Garcia *et al.*, 2006).

Dans une autre étude, deux kits ELISA commerciaux ont été validés par rapport à l'immunoblot avec le calcul de : spécificité, sensibilité et exactitude relatives, du kappa de Cohen et des valeurs prédictives positives et négatives (Wu *et al.*, 2002).

Hall et collaborateurs (2006) ont validé deux kits de la firme Pourquier dont un kit ELISA de compétition en prenant le kit ELISA IDEXX comme référence sur 526 sérums. Après ajustement du cut off, ils ont obtenu des valeurs de spécificité et de sensibilité supérieures à 98 % pour les deux tests.

Silva et collaborateurs (2007) ont comparé l'IFAT et un ELISA et sur 300 sérums de chien. La valeur de kappa pour l'ELISA par rapport à l'IFAT n'était que de 0,3 ce qui témoigne d'une concordance faible même si l'exactitude relative était de 74 %. L'ELISA, l'IFAT et l'immunoblot ont été comparés sur 200 sérums. L'ELISA a montré une spécificité relative de 54,7 % et une sensibilité relative de 90,6 % par rapport à l'IFAT. Si on compare l'ELISA et l'immunoblot, les résultats sont encore moins bons avec une spécificité relative de 54,8 % et une sensibilité relative de 84,8 %. L'ELISA montre donc une faible spécificité

à cause de nombreux faux positifs. L'immunoblot montre une sensibilité relative de 78,1 % et une spécificité relative de 97 %. Un immunoblot est considéré comme positif si au moins deux antigènes immunodominants sont reconnus par le sérum (Silva *et al.*, 2007).

La comparaison des méthodes sérologiques la plus exhaustive a été réalisée (Von Blumröder *et al.*, 2004) en comparant 11 tests ELISA et l'IFAT sur 523 sérums. Dans cette étude, le résultat de référence a été décidé par le résultat de la majorité des tests. Sur cette base, la spécificité et la sensibilité relative a été calculée. La sensibilité variait de 76,5 à 100 % et la spécificité variait de 92 à 100 %. Un autre calcul de spécificité et de sensibilité relatives a été réalisé sur base du *cut off* habituellement utilisé par le laboratoire réalisant le test. Dans ce cas, la sensibilité relative variait de 78,1 % à 99 % et la spécificité relative de 88,8 % à 99,4 %. Enfin la valeur de kappa a été calculée pour chaque test en comparaison avec les autres. Ces valeurs variaient de 0,73 à 0,98 montrant une concordance bonne à excellente.

Trois tests ELISA constitués d'un lysat d'antigènes totaux, le premier non-commercial (Wouda *et al.*, 1998) et les deux autres commerciaux (IDEXX et LSI) ont été comparés sur du lait de vache (Bartels *et al.*, 2005). L'étude a

été menée sur 162 troupeaux dont 59 étaient séropositifs pour *N. caninum* et 103 étaient séronégatifs. La spécificité, la sensibilité et les valeurs prédictives positives et négatives ont été calculées pour différentes valeurs de *cut off*. Le test non commercial donnait de mauvaises valeurs de spécificité alors que les deux tests commerciaux donnaient de meilleurs résultats. Les valeurs de kappa ont été également calculées, elles confirment les données précédentes avec 0,47 pour le test non commercial, 0,78 pour le kit IDEXX et 0,72 pour le kit LSI (Bartels *et al.*, 2005).

Une comparaison de différents tests sérologiques a été réalisée sur des sérums de coyotes et de renards (Wapenaar *et al.*, 2007c). Les techniques utilisées furent un ELISA commercial (Biovet) (Paré *et al.*, 1995), l'IFAT, l'agglutination en phase liquide (DAT) et l'immunoblot. Sur des sérums connus, la spécificité et la sensibilité ont été calculées sur base d'un *cut off* optimisé par le rapport de vraisemblance. L'IFAT, l'immunoblot et l'ELISA avaient une sensibilité et une spécificité de 100 %. Le DAT avait une sensibilité de 50 % et une spécificité de 100 %.

Sur base de sérums de terrain, la prévalence a été calculée par les différentes méthodes et celles-ci ont été comparées par calcul de la valeur de kappa. Le kappa variait de 0,97 (ELISA-IFAT) à

0,44 (ELISA-DAT) (Wapenaar *et al.*, 2007b).

#### 4.6. Comparaison pragmatique

D'un point de vue plus technique, les différentes méthodes de diagnostic peuvent être comparées en termes de coût du matériel, de rapidité ou de difficulté technique dans la mise en œuvre ou dans l'interprétation des résultats (tableau III). Pour la sérologie, si les ELISA sont disponibles commercialement, faciles à réaliser en routine et reposent sur une mesure objective, leur sensibilité et leur spécificité ne sont pas toujours optimales. Pour la détection directe du parasite, la PCR et surtout la PCR en temps réel risque de s'imposer comme une méthode de référence en diagnostic étant donné le coût en constante baisse du matériel et des réactifs ces dernières années. De plus en plus de laboratoires en sont maintenant équipés.

#### 5. ETUDE DU LIEN ENTRE DIAGNOSTIC ET AVORTEMENT CHEZ LA VACHE

Pour *N. caninum*, il est intéressant d'étudier si ce parasite est la cause des avortements chez la vache. Pour ce faire, on peut réaliser une étude cas-témoin (d'après Toma *et al.*,

**Tableau III : Comparaison des méthodes de diagnostic**

Méthode	Temps	Gros équipement Nécessaire	Difficulté technique	Spécificité-sensibilité
<b>Sérologie</b>				
IFAT <sup>1</sup>	< 1 j*	Microscope à fluorescence	++ (interprétation)	+++
ELISA <sup>2</sup>	< 1 j	Lecteur de plaques	+	++ (varie en fonction de l'ELISA)
DAT <sup>3</sup>	2 j*	Aucun	+	++
WB <sup>4</sup>	2 j	Electrophorèse de protéines Appareil de transfert	++	+++
<b>Recherche du parasite</b>				
PCR <sup>5</sup>	< 1 J	Thermocycleur	+++ (délicat)	+++ (très sensible et spécifique si pas d'inhibition ou de contamination)
Immunohistochimie	> 2 J	Microtome Microscope	+++ (délicat)	++ (spécifique mais peu sensible)
Tests sur animaux	> 5 j	Microscope microtome	+++ (délicat)	+++ (très sensible et spécifique)
Lésions histologiques	2 j	Microscope microtome	++	++ (spécifique mais peu sensible)

\* : Si on ne tient pas compte de la production des tachyzoites qui prend environ 15 jours.

1. IFAT : Indirect Fluorescence Antibody Test ; 2. ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay ; 3. DAT : Direct Agglutination Test ; 4. WB : Western Blot ; 5. PCR : Polymerase Chain Reaction

2001). Des vaches ayant avorté et des vaches n'ayant pas avorté sont sélectionnées; on réalise ensuite une étude sérologique pour savoir si ces vaches sont séropositives ou non vis-à-vis de *N. caninum*. On obtient ainsi un tableau à deux entrées représentant les vaches avortantes (cas), les vaches non avortantes (témoins), les vaches séropositives à *N. caninum* (exposées) et les vaches séronégatives à *N. caninum* (non exposées). On peut ainsi calculer un *odd* (une cote) d'exposition pour les cas et les témoins ainsi que le rapport de ces cotes encore appelé *odds ratio* (OR). L'OR est une valeur comprise entre 1 et  $+\infty$ . Ainsi un OR de 5 signifie que l'*odds* d'exposition est 5 fois plus élevé chez les cas que chez les témoins. Plus l'OR est élevé, plus l'association entre la maladie et l'exposition est forte. Un OR de 1 ou proche de 1 signifie qu'il n'y a pas d'association entre le facteur d'exposition et la maladie (Toma, 2001).

On peut utiliser un test statistique <sup>(2)</sup> pour évaluer la vraisemblance de l'association observée c'est-à-dire estimer la probabilité que l'observation faite puisse être expliquée par le simple hasard.

Des études cas-témoins ont été réalisées pour estimer le rôle de *N. caninum* dans les avortements chez la vache. Ainsi, Vaclavek et collaborateurs (2003) ont calculé un *odds ratio* de 7,6 et un <sup>2</sup> de 17,4 ( $p \leq 0,001$ ) montrant une association claire entre la séroprévalence à *N. caninum* et les cas d'avortement. De même dans une autre étude Sager et collaborateurs (2001) ont obtenu une association encore plus forte avec un *odds ratio* de 22,1 et une valeur de <sup>2</sup> de 40,75 ( $p \leq 0,001$ ). Enfin, Davison et collaborateurs (1999b) ont obtenu pour leur étude cas-témoins un *odds ratio* de 3,67 et un <sup>2</sup> de 32. Toutes ces études plaident pour un rôle majeur de *N. caninum* dans les cas d'avortement chez la vache.

## 6. LA PRÉVALENCE

Toutes ces techniques de diagnostic visent notamment à réaliser l'épidémiologie de *N. caninum* chez les animaux par des études de prévalence ou d'incidence. Cependant, *N. caninum* ne faisant pas l'objet d'une surveillance continue dans le monde, les données les plus courantes sont des données de prévalence. Les

tests sérologiques restent les plus utilisés mais des données de PCR sont de plus en plus fréquentes.

De nombreuses études ont été publiées sur la prévalence de *N. caninum* chez différents animaux. Les études de séroprévalence publiées depuis 2000 sont résumées dans le tableau I.

### 6.1. Chez le chien

La séroprévalence chez le chien varie largement : de 1,2 % en Thaïlande et en Hongrie à 96,8 % dans une ferme d'ovins en Nouvelle-Zélande (Antony et Williamson, 2003). De façon intéressante, plusieurs études comparent la séroprévalence chez des chiens vivant en ville, des chiens vivants à proximité de la ville et des chiens vivants à la campagne. Dans une telle étude, réalisée au Brésil, on constate que la séroprévalence est significativement plus élevée chez les chiens vivant à la campagne que chez les chiens urbains ou péri-urbains (Fernandes *et al.*, 2004). Des études similaires réalisées en Corée (Kim *et al.*, 2003), au Mexique (Sanchez *et al.*, 2003), au Chili (Moore, 2005) en Argentine (Basso *et al.*, 2001b), en Autriche (Wanha *et al.*, 2005), en Belgique (Lasri *et al.*, 2004), en Nouvelle-Zélande (Antony et Williamson, 2003) ou en Iran (Malmasi *et al.*, 2007) vont dans le même sens.

Si on regarde la répartition géographique, on constate que la prévalence sur le continent sud américain varie de 8,3 % à 57 % avec une moyenne de 21,7 % et un écart-type de 15,02 (pour 20 données). Pour l'Europe, on a une fréquence minimale de 1,2 % et maximale de 23,07 % avec une moyenne de 8,56 % et une variance de 7,45 (pour 7 valeurs). En Asie, la prévalence varie entre 1,2 et 21,6 % mais c'est en Nouvelle-Zélande qu'elle est la plus élevée puisqu'elle varie de 30,8 % à 96,8 %. La présence de *N. caninum* peut être mise en évidence par PCR ou par tests sur animaux dans les matières fécales du chien (Hill *et al.*, 2001 ; Basso *et al.*, 2001a ; Slapeta *et al.*, 2002 ; McInnes *et al.*, 2006) ou au niveau des organes (Liddell *et al.*, 1999 ; Gondim *et al.*, 2001 ; Schatzberg *et al.*, 2003 ; Dubey *et al.*, 2004).

### 6.2. Chez les bovins

Les avortements à *N. caninum* ont été signalés de manière formelle dans de

nombreuses parties du monde (Dubey et Lindsay, 1996). En élevage laitier, des études réalisées aux U.S.A., en Nouvelle-Zélande, aux Pays-Bas et en Allemagne sur l'impact de la néosporose ont indiqué que 12 à 42 % des fœtus examinés sont infectés par *N. caninum*. La séroprévalence bovine varie en fonction du pays, de la région, du test sérologique employé, de l'existence ou non d'un avortement chez l'animal examiné et du seuil de détection des tests utilisés.

*N. caninum* est considéré comme le principal agent pathogène abortif aux U.S.A. (Anderson *et al.*, 1991 ; Anderson *et al.*, 1995), en Nouvelle-Zélande (Thornton *et al.*, 1991) et en Pays-Bas (Wouda *et al.*, 1997). Le parasite serait responsable de 15 à 43 % des avortements dans ces pays. L'infection par le parasite a également été décrite en Belgique. En Wallonie, il est responsable de 12 % des avortements (De Meerschman *et al.*, 2000).

L'infection par *N. caninum* a été observée dans de très nombreux pays et sur tous les continents sauf l'Océanie (Dubey, 2003). Au sein des exploitations, le pourcentage d'animaux séropositifs peut être très élevé, atteignant 70 % et plus (Paré *et al.*, 1996 ; Thurmond *et al.*, 1997 ; Wouda *et al.*, 1999 ; Sanderson *et al.*, 2000).

La séroprévalence chez les bovins a été analysée chez le veau, la vache, et au sein des cheptels laitiers ou viandeux. La prévalence varie de 2,8 % en Nouvelle-Zélande (Tennent-Brown *et al.*, 2000) à 80 % aux USA (Jenkins *et al.*, 2000).

Au niveau des différentes matrices, on constate que dans le lait la séroprévalence varie de 7,9 % à 76 % alors que pour le sérum de bœuf, elle varie de 4,1 % à 71 % et que pour les vaches laitières on a un séroprévalence variant de 3,19 % en Tchèque (Vaclavek *et al.*, 2003) à 80 % aux USA (Jenkins *et al.*, 2000).

Si on examine la séroprévalence par continent, on constate qu'en Amérique du Sud, elle varie de 3,9 % à 62,1 % avec une moyenne de 28 % et un écart-type de 17,6 % (24 données). En Europe, la prévalence moyenne est de 26,36 % avec un écart-type de 16,59 % (pour 30 données). En Amérique du Nord, la prévalence moyenne est de 27,51 % avec un écart-type de 22 %. En Asie, la séroprévalence est de 15,7 % en moyenne avec un écart-type de 13,86 % (tableau I).

Certaines études comparent la séroprévalence chez les vaches laitières et les bovins de boucherie. Ainsi, au Japon, la séroprévalence est de 1,5 % chez les bovins de boucherie alors qu'elle est de 20 % chez les vaches laitières (Koiwai *et al.*, 2005). Des différences moins importantes sont rapportées au Paraguay avec 36 % pour les vaches laitières et 26,6 % pour les bovins de boucherie (Osawa *et al.*, 2002), en Allemagne avec 41 % chez les bovins de boucherie et 50 % pour les vaches, aux Pays-bas avec 71 % pour les bovins de boucherie et 80 % pour les vaches et en Espagne avec 46 % pour les animaux viandeux et 63 % pour les vaches laitières (Bartels *et al.*, 2006). De plus, une séroprévalence plus élevée est constatée chez les vaches ayant subi un avortement par rapport à des vaches n'ayant pas avorté (De Meerschman *et al.*, 2002 ; Canada *et al.*, 2004).

Signalons encore que dans les fermes où la séroprévalence chez les bovins est importante, on trouve aussi une séroprévalence élevée chez les chiens présents (Basso *et al.*, 2001b ; Antony et Williamson, 2003). Enfin, la séroprévalence chez les vaches semble augmenter avec l'âge (Dyer *et al.*, 2000).

D'autre part, en ce qui concerne les avortons bovins, certaines études recherchent la présence du parasite au niveau du cerveau. Pour cela, les méthodes de PCR, d'immuno-histochimie ou les tests d'inoculation in vivo sont utilisés. Ainsi, dans une étude espagnole, 75 % des avortons étaient positifs en PCR en temps réel et 83 % en PCR nichée (Collantes-Fernandes *et al.*, 2002). Dans une autre étude, Baszler et collaborateurs (1999) étudièrent différents groupes de tissus d'avortons, soit des tissus positifs en IHC, soit des tissus négatifs en IHC. Les résultats par PCR montrent une sensibilité relative de 100 %, une spécificité relative de 94 % et une exactitude relative de 97 % sur les tissus fixés par rapport à l'IHC. La présence de *N. caninum* a aussi été confirmée par PCR et IHC chez 25 % d'avortons en Corée (Kim *et al.*, 2002). En Suisse, *N. caninum* a été mis en évidence par PCR chez 21 % des avortons (Sager *et al.*, 2001). De même, lors d'une autre étude suisse, *N. caninum* a été mis en évidence chez 16,1 % des avortons bovins par PCR en temps réel (Reitt *et al.*, 2007). Au Brésil, une étude similaire a permis

de mettre en évidence *N. caninum* par PCR chez 31,25 % des avortons (Paula *et al.*, 2004). Edelhofer et collaborateurs (2003) confirmèrent la présence par PCR de *N. caninum* au niveau du cerveau d'un avorton en Autriche.

En Malaisie, *N. caninum* a été mis en évidence par PCR et test sur souris chez un veau né faible et malformé (Cheah *et al.*, 2004). En Belgique, *N. caninum* a été mis en évidence par PCR chez un veau naturellement contaminé (De Meerschman *et al.*, 2005). *N. caninum* a aussi été détecté par PCR et test sur souris au niveau de cerveaux de vaches adultes (Sawada *et al.*, 2000). La PCR sur tissu cérébral a été utilisée comme méthode de criblage d'avortons bovins en Suisse montrant 21 % de positifs à *N. caninum*. Parmi ceux-ci, 84 % ont été confirmés par analyse histopathologique (Sager *et al.*, 2001). En France, des travaux similaires ont permis de détecter *N. caninum* par PCR au niveau des avortons. De plus, il existait une bonne corrélation entre le statut sérologique des mères et la PCR (Pitel *et al.*, 2001).

La PCR peut également être utilisée pour tester la présence de *N. caninum* dans le sang de vaches. Ainsi, Okeoma et collaborateurs (2004) montrèrent qu'il y avait une corrélation parfaite entre les résultats sérologiques et par PCR pour 12 génisses. Une étude espagnole (Collantes-Fernandes, 2006) montre que la fréquence d'avortons positifs par PCR à *N. caninum* est plus importante pour des avortements en début de gestation. *N. caninum* a aussi été mis en évidence par PCR et inoculation à des souris à partir de sperme et du sang de taureaux (Ferre *et al.*, 2005 ; Ortega-Mora *et al.*, 2003 ; Caetano-da-Silva *et al.*, 2004), même si les signaux sont souvent très faibles et que l'excrétion est inconstante dans le temps.

### 6.3. Autres espèces domestiques

Outre le chien et les bovins, des études de séroprévalence ont aussi été menées chez d'autres espèces domestiques (tableau I) comme le chat (Ferroglia *et al.*, 2005), le cheval (Locatelli-Dittrich *et al.*, 2006 ; Pitel *et al.*, 2003 ; Ciaramella *et al.*, 2004) (avec des séroprévalence variant de 22,7 à 61 %), les ovins et les porcs (Helmick *et al.*, 2002).

*N. caninum* a aussi été mis en évidence par PCR chez un avorton de

chèvre (Eleni *et al.*, 2004) et chez des avortons de moutons (Hassig *et al.*, 2003 ; Kobayashi *et al.*, 2001) et chez le cheval (Pitel *et al.*, 2003)

### 6.4. Animaux sauvages

Des anticorps spécifiques de *N. caninum* ont été recherchés dans le sérum d'animaux sauvages (tableau I). De façon surprenante, des anticorps à *N. caninum* sont présents chez de nombreuses espèces de mammifères sauvages que ce soient des carnivores (renard, coyote, loup, chacal) ou des ongulés (cerf, caribou, buffle, bœuf musqué, bison, lama, alpaga) mais aussi chez des mammifères marins comme le dauphin (91,4 %), l'otarie (36,7 %) ou le phoque (12,5 %) (Dubey *et al.*, 2003).

De nombreuses espèces de mammifères sont infectées par *N. caninum*, pouvant constituer un réservoir pour le parasite et un vecteur de sa propagation.

En effet, *N. caninum* a été mis en évidence par PCR chez le cerf de Virginie (Vianna *et al.*, 2005), chez le rat brun (*Rattus norvegicus*) (Huang *et al.*, 2004b), l'antilope (*Tragelaphus imberbis*) (Peters *et al.*, 2001), chez le renard roux (*Vulpes vulpes*) (Almeiria *et al.*, 2002 ; Hurkova et Modry, 2006), chez le coyote (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004). Ceci suggère encore une fois la présence d'un cycle au sein des animaux sauvages parallèle à celui observé chez les animaux domestiques.

Au niveau des oiseaux, les colombidés sont sensibles à *N. caninum* alors que les fringillidés sont résistants (McGuire *et al.*, 1999).

## 7. EPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE

En épidémiologie, il est utile de pouvoir comparer les différentes souches de *N. caninum* isolées. Le but est de déterminer si les souches isolées sont les mêmes ou si elles sont proches génétiquement. Pour cela, on utilise des techniques de biologie moléculaire qui permettent d'avoir des renseignements indirects sur la séquence génomique du parasite. Parmi celles-ci on trouve la « *Random Amplification of Polymorphic DNA* » (RAPD) (China, 2003). Une telle approche a été menée sur 6 isolats de *N. caninum* (Schock *et*

al., 2001) montrant par exemple que les isolats bovins BPA-1 et canin NC-1 étaient proches génétiquement.

Une autre approche consiste à étudier les variations de séquences de la région intergénique ITS1 présente entre les gènes codant pour l'ARN ribosomal 18S et 5,8S. L'ADN est amplifié par PCR et séquençé. Les séquences sont alignées et comparées entre-elles. Une telle étude (Gondim *et al.*, 2003) révèle que cette région permet de distinguer *N. caninum* d'autres espèces proches comme *T. gondii* ou *Hammondia hammondi*. L'alignement des séquences ITS1 présentes dans la banque de séquences genbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) permet de constater que la séquence ITS1 présente bien un polymorphisme génétique au sein même de l'espèce. *N. caninum* (plus de 20 mutations sur 420 paires de bases).

Une autre façon de distinguer les souches entre-elles est de procéder à des infections expérimentales d'animaux et de mesurer la virulence des souches notamment en ce qui concerne les lésions produites (Dubey *et al.*, 2007).

## 8. DISCUSSION

Depuis sa mise en évidence chez le chien en 1984, *N. caninum* s'est imposé comme une cause majeure d'avortement chez les bovins partout dans le monde. Le fait que la plupart des fermes possèdent des chiens favorise le déroulement du cycle parasitaire. À côté du cycle domestique chien (hôte définitif)-bovins (hôte intermédiaire), il existe un cycle sylvatique avec comme hôte définitif le coyote et peut être le renard et des ruminants sauvages comme hôtes intermédiaires (Rosypal et Lindsay, 2005). Les méthodes de sérologie ont permis de mettre en évidence des anticorps dirigés contre *N. caninum* chez des espèces animales diverses et variées regroupant des animaux domestiques et des animaux sauvages. Ceci souligne le fait que ce parasite est largement distribué dans la nature.

Les techniques sérologiques sont les plus répandues dans les laboratoires car elles sont en général simples à mettre en œuvre et des kits commerciaux sont déjà disponibles. La capacité d'un test à distinguer les individus infectés des individus non-infectés est souvent décrite par sa sensibilité et sa

spécificité. La sensibilité représente la proportion d'animaux infectés positifs au test et la spécificité comme la proportion d'animaux non-infectés négatifs au test. On peut ajuster la sensibilité et la spécificité d'un test en jouant sur le « cut-off » c'est-à-dire la valeur au-dessus de laquelle un test est positif. Si on augmente le « cut-off », on augmente la spécificité mais on diminue la sensibilité c'est-à-dire la proportion de faux-négatifs et inversement. Quoique la sensibilité et la spécificité soient importantes pour les tests sérologiques, la valeur prédictive d'un test est aussi intéressante. Il s'agit de calculer la probabilité que le résultat d'un test reflète le statut réel de l'animal. Les valeurs prédictives varient en fonction de la prévalence de la maladie dans la population étudiée (Björkman et Ugglå, 1999). Une nouvelle méthode est souvent validée par rapport à une ancienne méthode considérée comme le « Gold Standard ». Pour la sérologie vis-à-vis de *N. caninum*, l'IFAT est considéré comme la méthode de référence (Björkamn et Ugglå, 1999). Le problème de l'IFAT est que son interprétation est visuelle et donc subjective à un certain degré d'où l'importance de disposer de contrôles adéquats. De plus, la détermination du « cut off » en IFAT est dépendante de nombreux facteurs comme le conjugué ou le microscope utilisé. Il peut donc varier d'un laboratoire à l'autre. Le test le plus simple est sans doute l'agglutination directe avec une sensibilité et une spécificité s'approchant de celle de l'IFAT (Packham *et al.*, 1998). L'avantage majeur de ce test est qu'il est indépendant de l'espèce étudiée et peut donc être appliqué à tout type de sera. L'interprétation de l'agglutination est aussi visuelle et donc subjective ; les valeurs seuils pour chaque espèce doivent aussi être établies. Les ELISA quant à eux permettent de quantifier l'intensité de la réaction antigène-anticorps par la mesure de la densité optique. La spécificité peut être augmentée en utilisant des antigènes purifiés en combinaison au non avec des ISCOMs. De plus, l'utilisation d'un ELISA d'avidité permet de savoir si le contact avec le parasite est récent ou non en fonction de l'avidité des anticorps présents. L'immunoblot, quant à lui, est une méthode qualitative qui permet cependant d'avoir des renseignements sur les antigènes contre lesquels les anticorps sont dirigés. Un sérum hyper-immun réagira

contre plus d'antigènes alors qu'un sérum moins immun réagira surtout contre les antigènes majeurs. Ce test est souvent utilisé comme test complémentaire aux autres tests. La sérologie, même si elle ne permet pas de mettre en évidence le parasite lui-même mais est un outil épidémiologique de premier choix par sa facilité et sa capacité à traiter un grand nombre d'échantillons.

La séroprévalence vis-à-vis de *N. caninum* révèle que de nombreuses espèces animales présentent des anticorps. Si on considère le chien, on trouve en général plus de séropositivité chez les chiens de ferme que chez les chiens urbains (tableau I). En ce qui concerne les bovins, les vaches avec des problèmes d'avortement ont une séroprévalence plus importante que les vaches sans avortement ou que les mâles (tableau I). Les différences de séroprévalence observées dans la littérature peuvent s'expliquer d'une part par les techniques différentes utilisées dans chaque étude et d'autre part par le type d'élevage pratiqué dans les différents pays. On peut aussi émettre l'hypothèse que les races bovines étudiées soient différentes. Il est possible que des facteurs génétiques de susceptibilité puissent intervenir. Enfin, la présence de chiens dans les fermes et leur séropositivité n'ont pas été systématiquement étudiées. Il est clair que dans les fermes où les chiens ont accès librement aux vaches et aux arrière-faix, tous les éléments du cycle sont présents pour une contamination maximale des vaches et des chiens. Dans les fermes où les chiens sont absents, le cycle ne peut être complet et le niveau de contamination des bovins devrait être plus faible.

La mise en évidence directe du parasite faisait au départ appel à des tests sur animaux ou à des techniques d'immunohistochimie mais le développement de la PCR a permis de faciliter cette détection. Des PCR sensibles et spécifiques ont été développées avec succès. Cependant, la PCR nécessite de contourner l'obstacle des inhibiteurs présents dans les tissus analysés et, d'autre part, son faible volume de réaction la rend moins sensible qu'espéré. En effet si on part de 50 mg de tissu pour extraire l'ADN dans un volume de 50 µl et que 5 µl sont utilisés par réaction, alors même si la PCR détecte une copie de *N. caninum* cela signifie qu'il faut au moins 200 parasites par gramme de tissu pour pouvoir



détecter la présence de *N. caninum*. Cependant, dans le cas des kystes présents dans les organes, ceux-ci peuvent contenir jusqu'à 1000 bradyzoïtes ce qui devrait permettre leur détection. Le problème réside dans la prise d'essai qui doit être réalisée de manière à augmenter la probabilité qu'elle contienne au moins un kyste. Quoi qu'il en soit, la PCR et surtout la PCR en temps réel par sa rapidité, sa facilité de mise en œuvre et sa capacité d'automatisation risque de s'imposer progressivement dans les laboratoires de diagnostic. Cependant, la détection de l'ADN de *N. caninum* ne suffit pas à prouver que l'avortement est dû à ce parasite. Les lésions spécifiques doivent être recherchées ainsi que leur intensité (Dubey *et al.*, 2007). En conclusion, si l'IFAT reste la méthode sérologique de référence, certains tests ELISA commerciaux semblent devoir le supplanter en raison de leur facilité d'utilisation et de lecture. Des validations sont cependant nécessaires pour garantir des résultats équivalents dans les deux cas. Le DAT est une technique qui quand elle existera sous forme commerciale pourra aussi être très utilisée étant donné qu'elle ne demande aucun matériel spécifique et qu'elle est utilisable pour n'importe quel type

de sérum sans devoir modifier les réactifs. Enfin, la PCR en temps réel est très utile pour détecter la présence de *N. caninum* au niveau d'un tissu mais cette technique requière des prélèvements plus invasifs et ne peut donc pas être utilisée pour la prévalence de routine sauf si les résultats sur le sang se confirment. Ceci serait alors une bonne alternative aux méthodes sérologiques.

## 9. REMERCIEMENTS

F. Ghalmi tient à remercier l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alger d'avoir contribué à sa formation doctorale ainsi que la coopération technique belge pour son aide dans le financement de ses travaux.

## SUMMARY

*Neospora caninum* is a pathogenic parasite responsible for diseases mainly in cattle and dog but other animals could be infected (small ruminants, equids, wild ruminants). In cow,

the most frequent clinical manifestation is abortion. The main diagnosis methods are : serology detection of the parasite in infected tissues by immunohistochemistry and the observation of lesions in infected tissues. The polymerase chain reaction can be applied on different tissues types. Statistical methods allow the determination of the more powerful method. These serological techniques were used to determine the seroprevalence in animals. Studies indicated that the seroprevalence is higher in farm dogs compared to urban dogs or in aborting cows compared to non-aborting cows. The isolation of the parasite is usually performed from the brain of aborted bovine foetus. It is clear that the improvement of diagnosis methods will allow a better understanding of the parasite transmission ways and a better control of this recently described pathogen.

## BIBLIOGRAPHIE

- AHN H.J., KIM S., KIM D.Y., NAM H.W. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *Korean J. Parasitol.*, 2003, **41**, 175-177.
- ALMERIA S., FERRER D., PABON, M., CASTELLA J., MANAS S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 2002, **107**, 287-294.
- ALVAREZ-GARCIA G., PEREIRA-BUENO J., GOMEZ-BAUTISTA M., ORTEGA-MORA L.M. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet. Parasitol.*, 2002, **107**, 15-27.
- ALVAREZ GARCÍA G., LÓPEZ PÉREZ I., INNES E., COLLANTES FERNANDEZ E., FERNANDEZ GARCIA A., GOMEZ BAUTISTA M., ORTEGA MORA L.M. Use of an immunodominant P17 antigenic fraction of *Neospora caninum* in detection of antibody response in cattle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2006, **101**, 529-534.
- ANDERSON M. L., BLANCHARD P. C., BARR B. C., DUBEY J. P., HOFFMAN R. L., CONRAD P. A. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1991, **198**, 41-44.
- ANDERSON M. L., PALMER C. W., THURMOND M. C., PICANSO J. P., BLANCHARD P. C., BREITMEYER R. E., LAYTON A. W., MCALLISTER M., DAFT B., KINDE H. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **207**, 1206-1210.
- ANDERSON M. L., ANDRIANARIVO A. G., CONRAD P. A. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, 2000, **60-61**, 417-431.
- ANTONY A., WILLIAMSON, N. B. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *N.Z. Vet. J.*, 2003, **51**, 232-237.
- ASSIM. Association des enseignants d'immunologie de langue française. Immunologie générale. MEDSI : Paris, 1989, 329 p.
- ATKINSON R., HARPER P. A., REICHEL M. P., ELLIS J. T. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol. Today*, 2000, **16**, 110-114.

- AZEVEDO S.S., BATISTA C.S., VASCONCELLOS S.A., AGUIAR D.M., RAGOZO A.M., RODRIGUES A.A., ALVES C.J., GENNARI S.M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Paraíba, Northeast region of Brazil. *Res. Vet. Sci.*, 2005, **79**, 51-56.
- BAE J.S., KIM D.Y., HWANG W.S., KIM J.H., LEE N.S., NAM H.W. Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. *Korean J. Parasitol.*, 2000, **38**, 245-249.
- BARBER J.S., TREES A. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet. Rec.*, 1996, **139**, 439-443.
- BARBER J.S., TREES A.J. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 57-64.
- BARLING K.S., MCNEILL J.W., PASCHAL J.C., MCCOLLUM F.T., CRAIG T.M., ADAMS L.G., THOMPSON J.A. Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Prev. Vet. Med.*, 2001, **52**, 53-61.
- BARR B.C., ANDERSON M.L., DUBEY J.P., CONRAD P.A. Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.*, 1991, **28**, 110-116.
- BARR B.C., CONRAD P.A., BREITMEYER R., SVERLOW K., ANDERSON M.L., REYNOLDS J., CHAUVET A.E., DUBEY J.P., ARDANS A.A. 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**, 113-117.
- BARR B.C., ROWE J.D., SVERLOW K.W., BONDURANT R.H., ARDANS A.A., OLIVER M.N., CONRAD P.A. Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1994, **6**, 207-215.
- BARR B.C., ANDERSON M.L., SVERLOW K.W., CONRAD P.A. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.*, 1995, **137**, 611-613.
- BARTA J.R., DUBEY J.P. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol. Res.*, 1992, **78**, 689-694.
- BARTELS C.J., VAN MAANEN C., VAN DER MEULEN A.M., DIJKSTRA T., WOUDA W. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet. Parasitol.*, 2005, **131**, 235-246.
- BARTELS C.J., ARNAIZ-SECO J.I., RUIZ-SANTA-QUITERA A., BJORKMAN C., FROSSLING J., VON BLUMRODER D., CONRATHS F.J., SCHARES G., VAN MAANEN C., WOUDA W., ORTEGA-MORA L.M. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.*, 2006, **137**, 17-27.
- BASSO W., VENTURINI L., VENTURINI M.C., HILL D.E., KWOK O.C., SHEN S.K., DUBEY J.P. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J. Parasitol.*, 2001a, **87**, 612-618.
- BASSO W., VENTURINI L., VENTURINI M.C., MOORE P., RAMBEAU M., UNZAGA J.M., CAMPERO C., BACIGALUPE D., DUBEY J.P. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.*, 2001b, **87**, 906-907.
- BASZLER T.V., KNOWLES D.P., DUBEY J.P., GAY J.M., MATHISON B.A., MCELWAIN T.F. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 1423-1428.
- BASZLER T.V., GAY L.J., LONG M.T., MATHISON B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 4059-4064.
- BASZLER T.V., ADAMS S., VANDER-SCHALIE J., MATHISON B.A., KOSTOVIC M. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3851-3857.
- BERGERON N., FECTEAU G., VILLENEUVE A., GIRARD C., PARE J. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 2001, **97**, 145-152.
- BJERKAS I., MOHN S.F., PRESTHUS J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd.*, 1984, **70**, 271-4.
- BJERKAS I., JENKINS M.C., DUBEY J.P. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1994, **1**, 214-221.
- BJORKMAN C., LUNDEN A., HOLMDAHL J., BARBER J., TREES A. J., UGGLA A. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunol.*, 1994, **16**, 643-648.
- BJORKMAN C., HOLMDAHL O.J., 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**, 251-260.
- BJORKMAN C., LUNDEN A. Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *Int J Parasitol.*, 1998, **28**, 187-193.
- BJORKMAN C., UGGLA A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1497-1507.
- BJÖRKMAN C., NÄSLUND K., STENLUND S., MALEY S. W., BUXTON D., UGGLA A. An IgG avidity ELISA to discrimi-

- nate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1999, **1**, 41-44.
- BJORKMAN C., GONDIM L.F., NASLUND K., TREES A.J., MCALLISTER M.M. IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. *Vet. Parasitol.*, 2005, **128**, 195-200.
- BUXTON D., MALEY S.W., THOMSON K.M., TREES A.J., INNES E.A. Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum*. *J. Comp. Pathol.*, 1997, **117**, 1-16.
- BUXTON D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.*, 1998, **29**, 289-310.
- BUXTON D., MALEY S.W., WRIGHT S., THOMSON K.M., RAE A.G., INNES E.A. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J. Comp. Pathol.*, 1998, **118**, 267-279.
- CABAJ W., MOSKWA B., PASTUSIAK K., GILL J. Antibodies to *Neospora caninum* in the blood of European bison (*Bison bonasus bonasus* L.) living in Poland. *Vet. Parasitol.*, 2005, **128**, 163-168.
- CAETANO-DA-SILVA A., FERRE I., ADURIZ G., ALVAREZ-GARCIA G., DEL-POZO I., ATXAERANDIO R., REGIDOR-CERRILLO J., UGARTE-GARAGALZA C., ORTEGA-MORA L. M. *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. *Vet. Parasitol.*, 2004, **124**, 19-24.
- CANADA N., CARVALHEIRA J., MEIRELES C.S., CORREIA DA COSTA J.M., ROCHA A. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology*, 2004, **62**, 1229-1235.
- CANON-FRANCO W.A., BERGAMASCHI D.P., LABRUNA M.B., CAMARGO L.M., SOUZA S.L., SILVA J.C., PINTER A., DUBEY J.P., GENNARI S.M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2003, **115**, 71-74.
- CAPELLI G., NARDELLI S., DI REGALBONO A.F., SCALA A., PIETROBELLI M. Sero-epidemiological survey of *Neospora caninum* infection in dogs in north-eastern Italy. *Vet. Parasitol.*, 2004, **123**, 143-148.
- CAPELLI G., NATALE A., NARDELLI S., FRANGIPANE DI REGALBONO A., PIETROBELLI M. Validation of a commercially available cELISA test for canine neosporosis against an indirect fluorescent antibody test (IFAT). *Prev. Vet. Med.*, 2006, **73**, 315-320.
- CHAHANB., GATURAGAI., HUANG X., LIAO M., FUKUMOTO S., HIRATA H., NISHIKAWA Y., SUZUKI H., SUGIMOTO C., NAGASAWA H., FUJISAKI K., IGARASHI I., MIKAMI T., XUAN X. Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NeSAG1. *Vet. Parasitol.*, 2003, **118**, 177-185.
- CHANLUN A., NASLUND K., AIUMLAMAI S., BJORKMAN C. Use of bulk milk for detection of *Neospora caninum* infection in dairy herds in Thailand. *Vet. Parasitol.*, 2002, **110**, 35-44.
- CHEAH T. S., MATTSSON J. G., ZAINI M., SANI R. A., JAKUBEK E. B., UGGLA A., CHANDRAWATHANI P. Isolation of *Neospora caninum* from a calf in Malaysia. *Vet. Parasitol.*, 2004, **126**, 263-269.
- CHI J., VANLEEUWEN J. A., WEERSINK A., KEEFE G.P. Management factors related to seroprevalences to bovine viral diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. *Prev. Vet. Med.*, 2002, **55**, 57-68.
- CHINA B., GHAFYR Y., DAUBE G. Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vet.*, 2002, **147**, 99-109.
- CHINA B. La traçabilité génétique de la viande et des bactéries. *Bul. Soc. Roy. Sc. Liège*, 2003, **71**, 31-46.
- CIARAMELLA P., CORONA M., CORTESE L., PIANTEDOSI D., SANTORO D., DI LORIA A., RIGATO R. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy. *Vet. Parasitol.*, 2004, **123**, 11-15.
- CIMINO G.D., METCHETTE K.C., TESSMAN J.W., HEARST J.E., ISAACS S.T. Post PCR sterilization: a method to control carry-over contamination for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 1991, **19**, 99-107.
- COHEN J.A. Coefficient of agreement for nominal scales: a review. *Educ. Psychol. Meas.*, 1960, **20**, 37-46.
- COLE R.A., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., SORJONEN D.C., DUBEY J.P. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.*, 1995, **81**, 208-211.
- COLLANTES-FERNANDEZ E., ZABALLOS A., ALVAREZ-GARCIA G., ORTEGA-MORA L.M. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 1194-1198.
- COLLANTES-FERNANDEZ E., RODRIGUEZ-BERTOS A., ARNAIZ-SECO I., MORENO B., ADURIZ G., ORTEGA-MORA L.M. Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology*, 2006, **65**, 629-641.
- CONRAD P.A., SVERLOW K., ANDERSON M., ROWE J., BONDURANT R., TUTER G., BREITMEYER R., PALMER C., THURMOND M., ARDANS A. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1993, **5**, 572-578.
- CORBELLINI L.G., DRIEMEIER D., CRUZ C.F., GONDIM L.F., WALD V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2002, **103**, 195-202.
- CRINGOLI G., RINALDI L., CAPUANO F., BALDI L., VENEZIANO V., CAPELLI G. Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dogs. *Vet. Parasitol.*, 2002, **106**, 307-313.

- DAVISON H.C., FRENCH N.P., TREES A.J. Herd-specific and age-specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 British dairy herds. *Vet. Rec.*, 1999a, **144**, 547-550.
- DAVISON H.C., OTTER A., TREES A.J. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.*, 1999b, **29**, 1189-1194.
- DE MEERSCHMAN F., LOSSON B. *Neospora caninum* et la néosporose : biologie et description des lésions chez le chien. *Ann. Méd. Vet.*, 1998, **142**, 847-853.
- 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., SPEYBROECK N., BERKVENS D., RETTIGNERA C., FOCANT C., LECLIPTEUX T., CASSART D., LOSSON B. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology*, 2002, **58**, 933-945.
- DE MEERSCHMAN F., FOCANT C., DETRY J., RETTIGNER C., CASSART D., LOSSON B. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. *Vet. Rec.*, 2005, **157**, 115-118.
- DE MELO C.B., LEITE R.C., LOBATO Z.I., LEITE, R.C. Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2004, **119**, 97-105.
- DIJKSTRA T., EYSKER M., SCHARS G., CONRATHS F.J., WOUDA W., BARKEMA H.W. 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.*, 2001, **31**, 747-752.
- DIJKSTRA T., BARKEMA H. W., BJORKMAN C., WOUDA W. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Vet. Parasitol.*, 2002, **109**, 203-211.
- DIJKSTRA T., BARKEMA H.W., EYSKER M., BEIBOER M.L., WOUDA W. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.*, 2003, **110**, 161-169.
- DUBEY J.P., CARPENTER J.L., SPEER C.A., TOPPER M.J., UGGLA A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1988, **192**, 1269-1285.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S. Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *J. Parasitol.*, 1989, **75**, 148-151.
- DUBEY J.P., HARTLEY W.J., LINDSAY D.S., TOPPER M.J. Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J. Parasitol.*, 1990, **76**, 127-130.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S. Neosporosis in dogs. *Vet. Parasitol.*, 1990, **36**, 147-151.
- DUBEY J.P., PORTERFIELD M.L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.*, 1990, **76**, 732-734.
- DUBEY J.P., ACLAND H.M., HAMIR A.N. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in a stillborn goat. *J. Parasitol.*, 1992a, **78**, 532-534.
- DUBEY J.P., BROWN C.A., CARPENTER J.L., MOORE J.J. Fatal toxoplasmosis in domestic rabbits in the USA. *Vet. Parasitol.*, 1992b, **44**, 305-309.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S., ANDERSON M.L., DAVIS S.W., SHEN S.K. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1992c, **201**, 709-713.
- DUBEY J.P., DE LAHUNTA A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl. Parasitol.*, 1993, **34**, 229-233.
- DUBEY J.P., METZGER F.L., HATTEL A.L. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. *Vet. Dermatol.*, 1995, **6**, 1-59.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 1996, **67**, 1-59.
- DUBEY J.P., MORALES J.A., VILLALOBOS P., LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., TOPPER M.J. Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996, **208**, 263-265.
- DUBEY J.P., DOROUGH K.R., JENKINS M.C., LIDDELL S., SPEER C.A., KWOK O. C., SHEN S.K. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 1293-1304.
- DUBEY J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 1999a, **84**, 349-367.
- DUBEY J.P. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1999b, **214**, 1160-1163.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S. Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocysts. *Parasitol. Res.*, 2000, **86**, 165-168.
- DUBEY J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 2003, **41**, 1-16.
- DUBEY J.P., ZARNKE R., THOMAS N.J., WONG S.K., VAN BONN W., BRIGGS M., DAVIS J.W., EWING R., MENSE M., KWOK O.C., ROMAND S., THULLIEZ P. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet. Parasitol.*, 2003, **116**, 275-296.
- DUBEY J.P., SREEKUMAR C., KNICKMAN E., MISKA K.B., VIANNA M.C., KWOK O.C., HILL D.E., JENKINS M.C., LINDSAY D.S., GREENE C.E. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int. J. Parasitol.*, 2004, **34**, 1157-1167.
- DUBEY J.P., THULLIEZ P. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *J. Parasitol.*, 2005, **91**, 1217-1218.
- DUBEY J.P., BUXTON D., WOUDA W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.*, 2006, **134**, 267-289.

- DUBEY J.P., SCHARES G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 2006, **140**, 1-34.
- DUBEY J.P., BUXTON D., WOUDA W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Pathol.*, 2006, **134**, 267-289.
- DUBEY J.P., SCHARES G., ORTEGA-MORA L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007, **20**, 323-367.
- DYER R.M., JENKINS M.C., KWOK O.C., DOUGLAS L.W., DUBEY J.P. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Vet. Parasitol.*, 2000, **90**, 171-181.
- EDELHOFER R., LOESCHENBERGER K., PESCHKE R., SAGER H., NOWOTNY N., KOLODZIEJEK J., TEWS A., DONEUS G., PROSL H. First PCR-confirmed report of a *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Austria. *Vet. Rec.*, 2003, **152**, 471-473.
- ELENI C., CROTTI S., MANUALI E., COSTARELLI S., FILIPPINI G., MOSCATI L., MAGNINO S. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat fetus. *Vet. Parasitol.*, 2004, **123**, 271-274.
- ELLIS J.T., MCMILLAN D., RYCE C., PAYNE S., ATKINSON R., HARPER P.A. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1589-1596.
- EZIO F., ANNA T. Antibodies to *Neospora caninum* in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Vet. Parasitol.*, 2003, **115**, 757-8.
- FERNANDES B.C., GENNARI S.M., SOUZA S.L., CARVALHO J.M., OLIVEIRA W.G., CURY M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2004, **123**, 33-40.
- FERRE I., ADURIZ G., DEL-POZO I., REGIDOR-CERRILLO J., ATXAERANDIO R., COLLANTES-FERNANDEZ E., HURTADO A., UGARTE-GARAGALZA C., ORTEGA-MORA L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 2005, **63**, 1504-1518.
- FERROGLIO E., GUISO P., PASINO M., ACCOSSATO A., TRISCIUOGLIO A. Antibodies to *Neospora caninum* in stray cats from north Italy. *Vet. Parasitol.*, 2005, **131**, 31-34.
- FIORETTI D.P., PASQUAI P., DIAFERIA M., MANGILI V., ROSIGNOLI L. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J. Vet. Med. B.*, 2003, **50**, 399-404.
- FROSSLING J., UGGLA A., BJORKMAN C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected swedish dairy herds. *Vet. Parasitol.*, 2005, **128**, 209-218.
- FROSSLING J., LINDBERG A., BJORKMAN C. Evaluation of an iscom ELISA used for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Prev. Vet. Med.*, 2006, **74**, 120-129.
- FUJII T.U., KASAI N., NISHI S.M., DUBEY J.P., GENNARI S.M. Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2001, **99**, 331-334.
- GARCIA-VAZQUEZ Z., CRUZ-VAZQUEZ C., MEDINA-ESPINOZA L., GARCIA-TAPIA D., CHAVARRIA-MARTINEZ B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Parasitol.*, 2002, **106**, 115-120.
- GARCIA-VAZQUEZ Z., ROSARIO-CRUZ R., RAMOS-ARAGONA., CRUZ-VAZQUEZ C., MAPES-SANCHEZ G. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet. Parasitol.*, 2005, **134**, 61-65.
- GATURAGA I., CHAHAN B., XUAN X., HUANG X., LIAO M., FUKUMOTO S., HIRATA H., NISHIKAWA Y., TAKASHIMA Y., SUZUKI H., FUJISAKI K., SUGIMOTO C. Detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with truncated NeSRS2 expressed in *Escherichia coli*. *J. Parasitol.*, 2005, **91**, 191-192.
- GENNARI S.M., YAI L.E., D'AURIA S.N., CARDOSO S.M., KWOK O.C., JENKINS M.C., DUBEY J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2002, **106**, 177-179.
- GENNARI S.M., RODRIGUES A.A., VIANA R.B., CARDOSO E.C. Occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Northern region of Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2005, **134**, 169-171.
- GEORGIEVA D.A., PRELEZOV P.N., KOINARSKI V.T.S. *Neospora caninum* and neosporosis in animals: a review. *Bulg. J. Vet. Med.*, 2006, **9**, 1-26.
- GONDIM L.F., SARTOR I.F., HASEGAWA M., YAMANE I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 1999, **86**, 71-75.
- GONDIM L.F., PINHEIRO A.M., SANTOS P.O., JESUS E.E., RIBEIRO M.B., FERNANDES H.S., ALMEIDA M.A., FREIRE S.M., MEYER R., MCALLISTER M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Vet. Parasitol.*, 2001, **101**, 1-7.
- GONDIM L.F., GAO L., MCALLISTER M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.*, 2002, **88**, 1159-1163.
- GONDIM L.F., LASKI P., GAO L., MCALLISTER M.M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Vet. Parasitol.*, 2003, **117**, 213-220.
- GONDIM L.F., MCALLISTER M.M., PITT W.C., ZEMLICKA D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*.

- num. *Int. J. Parasitol.*, 2004, **34**, 159-161
- GONDIM L.F., MCALLISTER M.M., GAO L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet. Parasitol.*, 2005, **134**, 33-39.
- GREIG B., ROSSOW K.D., COLLINS J.E., DUBEY J.P. *Neospora caninum* pneumonia in an adult dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1995, **206**, 1000-1001.
- GROSS U., HOLPERT M., GOEBEL S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann. Ist. Super. Sanita.*, 2004, **40**, 65-70.
- GUARINO A., FUSCO G., SAVINI G., DI FRANCESCO G., CRINGOLI G. Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy. *Vet. Parasitol.*, 2000, **91**, 15-21.
- GUIMARAES J.S.JR., SOUZA S.L., BERGAMASCHI D.P., GENNARI S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2004, **124**, 1-8.
- HADDAD J.P., DOHOO I.R., VANLEEWEN J.A. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle: a Canadian perspective. *Can. Vet. J.*, 2005, **46**, 230-243.
- HALL C.A., REICHEL M.P., ELLIS J.T. Performance characteristics and optimisation of cut-off values of two enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in the serum of cattle. *Vet. Parasitol.*, 2006, **140**, 61-68.
- HAMILTON C.M., GRAY R., WRIGHT S.E., GANGADHARAN B., LAURENSEN K., INNES E.A. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from around the UK. *Vet. Parasitol.*, 2005, **130**, 169-173.
- HANUKOGLU I. Elimination of non-specific binding in western blots from non reducing gels. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 1990, **21**, 65-68.
- HASLER B., HERNANDEZ J.A., REIST M., SAGER H., STEINER-MORET C., STAUBLID., STARK K.D., GOTTSTEIN B. *Neospora caninum*: serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Vet. Parasitol.*, 2006, **137**, 222-230.
- HASSIG M., SAGER H., REITT K., ZIEGLER D., STRABEL D., GOTTSTEIN B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Vet. Parasitol.*, 2003, **117**, 213-220.
- HAY W.H., SHELL L.G., LINDSAY D.S., DUBEY J.P. Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc.*, 1990, **197**, 87-9.
- HELMICK B., OTTERA., MCGARRY J., BUXTON D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. *Res. Vet. Sci.*, 2002, **73**, 187-189.
- HEMPHILL A., GOTTSTEIN B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 877-924.
- HIETALA S.K., THURMOND M.C. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1669-1676.
- HILL D.E., LIDDELL S., JENKINS M.C., DUBEY J.P. Specific detection of *Neospora caninum* oocysts in fecal samples from experimentally-infected dogs using the polymerase chain reaction. *J. Parasitol.*, 2001, **187**, 395-398.
- HO M.S., BARR B.C., MARSH A.E., ANDERSON M.L., ROWE J.D., TARANTAL A.F., HENDRICKX A.G., SVERLOW K., DUBEY J.P., CONRAD P.A. Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 1203-1208.
- HOLLAND P.M., ABRAMSON R.D., WATSON R., GELFAND D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 7276-7280.
- HORNOK S., EDELHOFER R., FOK E., BERTA K., FEJES P., REPASI A., FARKAS R. Canine neosporosis in Hungary: Screening for seroconversion of household, herding and stray dogs. *Vet. Parasitol.*, 2006, **137**, 197-201.
- HOSKINS J.D., BUNGE M.M., DUBEY J.P., DUNCAN D.E. Disseminated infection with *Neospora caninum* in a ten-year-old dog. *Cornell Vet.*, 1991, **81**, 329-334.
- HOWE D.K., CRAWFORD A.C., LINDSAY D., SIBLEY L. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 5322-5328.
- HUANG C.C., TING L.J., SHIAU J.R., CHEN M.C., OOI H.K. An abortion storm in cattle associated with neosporosis in Taiwan. *J. Vet. Med. Sci.*, 2004a, **66**, 465-467.
- HUANG C.C., YANG C.H., WATANABE Y., LIAO Y.K., OOI H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Vet. Res.*, 2004b, **35**, 283-290.
- HURKOVA L., MODRY D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Vet. Parasitol.*, 2006, **137**, 150-154.
- INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANISATION Microbiology of food and animals feeding stuffs : Polymerase Chain Reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens: requirements and definitions, (ISO 22174). International standardization organisation : Genève, 2004, 11 p.
- INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANISATION Microbiologie des aliments : protocole pour la validation des méthodes alternatives ISO16140. Organisation internationale de standardisation. International standardization organisation : Genève, 2001, 76 p.
- JENKINS M.C., WOUDA W., DUBEY J.P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997, **4**, 270-274.
- JENKINS M.C., CAVER J.A., BJORKMAN C., ANDERSON T.C., ROMAND S., VINYARD

- B., UGGLA A., THULLIEZ P., DUBEY J.P. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Vet. Parasitol.*, 2000, **94**, 17-26
- KASHIWAZAKIY., GIANNEECHINI R.E., LUST M., GIL J. Seroprevalence of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, 2004, **120**, 139-144.
- KAUFMANN H., YAMAGE M., RODITI I., DOBBELAERE D., DUBEY J.P., HOLMDAHL O.J., TREES A., GOTTSTEIN B. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol. Cell. Probes*, 1996, **10**, 289-297.
- KIM J.H., LEE J.K., HWANG E.K., KIM D.Y. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 2002, **64**, 941-943.
- KIM J.H., KANG M.S., LEE B.C., HWANG W.S., LEE C.W., SO B.J., DUBEY J.P., KIM D.Y. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs and raccoon dogs in Korea. *Korean J. Parasitol.*, 2003, **41**, 243-245.
- KNOWLER C., WHEELER S.J. *Neospora caninum* infection in three dogs. *J. Small Anim. Pract.*, 1995, **36**, 172-177.
- KOBAYASHI Y., YAMADA M., OMATA Y., KOYAMA T., SAITO A., MATSUDA T., OKUYAMA K., FUJIMOTO S., FURUOKA H., MATSUI T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J. Parasitol.*, 2001, **87**, 434-436.
- KOIWAI M., HAMAOKA T., HARITANI M., SHIMIZU S., KIMURA K., YAMANE I. Proportion of abortions due to neosporosis among dairy cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 2005, **67**, 1173-1175.
- KOIWAI M., HAMAOKA T., HARITANI M., SHIMIZU S., ZENIYA Y., ETO M., YOKOYAMA R., TSUTSUI T., KIMURA K., YAMANE I. Nationwide seroprevalence of *Neospora caninum* among dairy cattle in Japan. *Vet. Parasitol.*, 2006, **135**, 175-179.
- KYAW T., VIRAKUL P., MUANGYAI M., SUWIMONTEERABUTR J. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle in central Thailand. *Vet. Parasitol.*, 2004, **121**, 255-263.
- LALLY N.C., JENKINS M.C., DUBEY J.P. Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1996, **75**, 169-178.
- LASRI S., DE MEERSCHMAN F., RETTIGNER C., FOCANT C., LOSSON B. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Vet Parasitol.*, 2004, **123**, 25-32.
- LEBOZEC.2001. DCEM1 d'informatique médicale et technologique de la communication 2110-2002. (en ligne) Adresse URL : [http://www.cybermed.jussieu.fr/Broussais/InforMed/Enseignement/DCEM1/DCEM1\\_TestsDiag.pdf](http://www.cybermed.jussieu.fr/Broussais/InforMed/Enseignement/DCEM1/DCEM1_TestsDiag.pdf), consulté le 12/06/2006.
- LIDDELL S., JENKINS M.C., DUBEY J.P. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1583-1587.
- LINDSAY D.S., DUBEY J.P. *Neospora caninum* (Protozoa: apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.*, 1989, **75**, 772-779.
- LINDSAY D.S., DUBEY J.P. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Parasitol.*, 1990, **76**, 410-413.
- LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., DUBEY J.P. Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J. Parasitol.*, 1992, **78**, 70-72.
- LINDSAY D.S., RIPPEY N.S., POWE T.A., SARTIN E.A., DUBEY J.P., BLAGBURN B.L. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am. J. Vet. Res.*, 1995, **56**, 1176-1180.
- LINDSAY D.S., KELLY E.J., MCKOWN R.D., STEIN F.J., PLOZER J., HERMAN J., BLAGBURN B.L., DUBEY J.P. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.*, 1996, **82**, 657-659.
- LINDSAY D.S., DUBEY J.P., DUNCAN R.B. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.*, 1999, **82**, 327-333.
- LINDSAY D.S., WESTON J.L., LITTLE S.E. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from South Carolina. *Vet. Parasitol.*, 2001, **97**, 159-164
- LIVAKK.J., FLOODS.J., MARMARO J., GIUSTI W., DEETZ K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, 1995, **4**, 357-362.
- LOCATELLI-DITTRICH R., SOCCOL V.T., RICHARTZ R.R., GASINO-JOINEAU M.E., VINNE R., PINCKNEY R.D. Serological diagnosis of neosporosis in a herd of dairy cattle in southern Brazil. *J. Parasitol.*, 2001, **87**, 1493-1494.
- LOCATELLI-DITTRICH R., DITTRICH J.R., RICHARTZ R.R., GASINO-JOINEAU M.E., ANTUNES J., PINCKNEY R.D., DECONTO I., HOFFMANN D.C., THOMAZ-SOCCOL V. Investigation of *Neospora* sp. And *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2006, **135**, 215-221.
- LONG M.T., BASZLER T.V. Fetal loss in BALB/C mice infected with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.*, 1996, **82**, 608-611.
- LOPEZ-GATIUS F., SANTOLARIA P., ALMERIA S. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2005, **52**, 51-53.
- LOUIE K, SVERLOW K.W., BARR B.C., ANDERSON M.L., CONRAD P.A. Cloning and characterization of two recombinant

- Neospora* protein fragments and their use in serodiagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1997, **4**, 692-699.
- LUNDEN A., MARKS J., MALEY W.M., INNES E.A. Cellular immune response in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.*, 1998, **20**, 519-526.
- MALEY S.W., BUXTON D., THOMSON K.M., SCHRIEFER C.E., INNES E.A. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet. Parasitol.*, 2001, **96**, 1-9.
- MALMASI A., HOSSEININEJAD M., HADDADZADEH H., BADI A., BAHONAR A. Serologic study of anti-*Neospora caninum* antibodies in household dogs and dogs living in dairy and beef cattle farms in Tehran, Iran. *Parasitol Res.*, 2007, **100**, 1143-1145.
- MARTINO P.E., MONTENEGRO J.L., PREZIOSI J.A., VENTURINI C., BACIGALUPE D., STANCHI N.O., BAUTISTA E.L. Serological survey of selected pathogens of free-ranging foxes in southern Argentina, 1998-2001. *Rev. Sci. Tech.*, 2004, **23**, 801-806.
- MCCALLISTER M.M., MCGUIRE A.M., JOLLEY W.R., LINDSAY D.S., TREES A.J., STOBART R.H. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet. Pathol.*, 1996, **33**, 647-655.
- MCCALLISTER M.M., DUBEY J.P., LINDSAY D.S., JOLLEY W.R., WILLS R.A., MCGUIRE A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 1998, **28**, 1473-1478.
- MCDOLE M.G., GAY J.M. Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. *Vet. Parasitol.*, 2002, **105**, 257-260.
- MCGARRY J.W., GUY F., TREES A.J., WILLIAMS D.J.L. Validation and application of an inhibition ELISA to detect serum antibodies to *Neospora caninum* in different host species. In: Hemphill A., Gottstein B. (eds), A European perspective on *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 880-884.
- MCGARRY J.W., STOCKTON C.M., WILLIAMS D.J., TREES A.J. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J. Parasitol.*, 2003, **89**, 628-630.
- MCGUIRE A.M., MCCALLISTER M., WILLS R.A., TRANAS J.D. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columba livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1525-1529.
- MCINNES L.M., IRWIN P., PALMER D.G., RYAN U.M. In vitro isolation and characterisation of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. *Vet. Parasitol.*, 2006, **137**, 355-363.
- MINEO T.W., SILVA D.A., COSTA G.H., VON ANCKEN A.C., KASPER L.H., SOUZA M.A., CABRAL D.D., COSTA A.J., MINEO J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2001, **98**, 239-245.
- MOORE D.P., CAMPERO C.M., ODEON A.C., POSSO M.A., CANO D., LEUNDA M.R., BASSO W., VENTURINI M.C., SPATH E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.*, 2002, **107**, 303-316.
- MOORE D.P., CAMPERO C.M., ODEON A.C., CHAYER R., BIANCO M.A. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health*, 2003, **50**, 304-308.
- MOORE D.P. Neosporosis in South America. *Vet. Parasitol.*, 2005, **127**, 87-97.
- MULLER N., ZIMMERMANN V., HENTRICH B., GOTTSTEIN B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, **34**, 2850-2852.
- MULLER N., VONLAUFEN N., GIANINAZZI C., LEIB S. L., HEMPHILL A. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 252-255.
- MULLIS K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, 1990, **240**, 56-65.
- ODIN M., DUBEY J.P. Sudden death associated with *Neospora caninum* myocarditis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1993, **203**, 831-833.
- O'HANDLEY R., LIDDELL S., PARKER C., JENKINS M.C., DUBEY J.P. Experimental infection of sheep with *Neospora caninum* oocysts. *J. Parasitol.*, 2002, **88**, 1120-1123.
- OKEOMA C.M., WILLIAMSON N.B., POMROY W.E., STOWELL K.M., GILLESPIE L. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Vet. Parasitol.*, 2004, **122**, 307-315.
- ORTEGA-MORA L.M., FERRE I., DEL-POZO I., CAETANO-DA-SILVA A., COLLANTES-FERNANDEZ E., REGIDOR-CERRILLO J., UGARTE-GARAGALZA C., ADURIZ G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet. Parasitol.*, 2003, **117**, 301-308.
- OSAWA T., WASTLING J., MALEY S., BUXTON D., INNES E.A. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet. Parasitol.*, 1998, **79**, 19-34.
- OSAWA T., WASTLING J., ACOSTA L., ORTELLADO C., IBARRA J., INNES E.A. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Vet. Parasitol.*, 2002, **110**, 17-23.
- OTRANTO D., LLAZARI A., TESTINI G., TRAVERSA D., FRANGIPANEDIREGALBONO A., BADAN M., CAPELLI G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet. Parasitol.*, 2003, **118**, 7-18.
- PACKHAM A.E., SVERLOW K.W., CONRAD P.A., LOOMIS E.F., ROWE J.D., ANDERSON M.L., MARSH A.E., CRAY C., BARR B.C. A modified agglutina-



- tion 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**, 467-473.
- PARE J., HIETALA S.K., THURMOND M.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1995, **7**, 352-359.
- PARE J., THURMOND M.C., HIETALA S.K. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calf-hood mortality. *Can. J. Vet. Res.*, 1996, **60**, 133-139.
- PARE J., THURMOND M.C., HIETALA S.K. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.*, 1997, **83**, 82-87.
- PASQUALI P., MANDARA M.T., ADAMO F., RICCI G., POLIDORI G.A., DUBEY J.P. Neosporosis in a dog in Italy. *Vet. Parasitol.*, 1998, **77**, 297-299.
- PAULA V.S., RODRIGUES A.A., RICHTZENHAIN L.J., CORTEZ A., SOARES R.M., GENNARI S.M. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. *Vet. Res. Commun.*, 2004, **28**, 581-685.
- PAYNE S., ELLIS J. Detection of *Neospora caninum* DNA by the polymerase chain reaction. *Int. J. Parasitol.*, 1996, **26**, 347-351.
- PETERS M., WOHLSEIN P., KNIERIEM A., SCHARES G. *Neospora caninum* infection associated with stillbirths in captive antelopes (*Tragelaphus imberbis*). *Vet. Parasitol.*, 2001, **97**, 153-157.
- PITEL P.H., PRONOST S., CHATAGNON G., TAINURIER D., FORTIER G., BALLETT J.J. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Vet. Parasitol.*, 2001, **10**, 269-277.
- PITEL P.H., ROMAND S., PRONOST S., FOUCHER N., GARGALA G., MAILLARD K., THULLIEZ P., COLLOBERT-LAUGIER C., TAINURIER D., FORTIER G., BALLETT J.J. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. *Vet. Parasitol.*, 2003, **118**, 1-6.
- POLIA A., MANCIANTI F., CARLI M. A., STROSCIO M. C., KRAMER L. *Neospora caninum* infection in a Bernese cattle dog from Italy. *Vet. Parasitol.*, 1998, **78**, 79-85.
- QUINTANILLA-GOZALO A., J. PEREIRA-BUENO J., SEIJAS-CARBALLEDO A., COSTAS E., ORTEGA-MORA L.M. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 900-906.
- REICHEL M.P., PFEIFFER D.U. An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*, 2002, **107**, 197-207.
- REITT K., HILBE M., VOEGTLIN A., CORBOZ L., HAESSIG M., POSPISCHIL A. Aetiology of bovine abortion in Switzerland from 1986 to 1995 : a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2007, **54**, 15-22.
- RETTIGNER C. Pathogeny of *Neospora caninum* abortions: study of the relationship between immune response and pregnancy in murine and sheep models of congenital neosporosis. Thèse de doctorat, Université de Liège, 2004.
- RETTIGNER C., DEMEERSCHMAN F., LASRI S., FOCANT C., LOSSON B. La neosporose chez le bétail : aspects épidémiologiques, diagnostiques et immunologiques. Santé Publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement : Bruxelles, 2004, 74 p.
- RODRIGUES A.A., GENNARI S.M., AGUIAR D.M., SREEKUMAR C., HILL D.E., MISKA K.B., VIANNA M.C., DUBEY J.P. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2004, **124**, 139-150.
- ROMAND S., THULLIEZ P., DUBEY J.P. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.*, 1998, **84**, 50-53.
- ROMERO J.J., PEREZ E., DOLZ G., FRANKENA K. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev. Vet. Med.*, 2002, **53**, 263-273.
- ROMERO J.J., FRANKENA K. The effect of the dam-calf relationship on serostatus to *Neospora caninum* on 20 Costa Rican dairy farms. *Vet. Parasitol.*, 2003, **114**, 159-171.
- ROSYPAL A.C., LINDSAY D.S. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol.*, 2005, **21**, 439-440.
- SADREBAZZAZ A., HADDADZADEH H., ESMAILNIA K., HABIBI G., VOJGANI M., HACHEMIFESHARAKI R. Serological prevalence of *Neospora caninum* in healthy and aborted dairy cattle in Mashhad, Iran. *Vet. Parasitol.*, 2004, **124**, 201-204.
- SAGER H., FISCHER I., FURRER K., STRASSER M., WALDVOGEL A., BOERLIN P., AUDIGE L., GOTTSTEIN B.A. Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol.*, 2001, **102**, 1-15.
- SANCHEZ G.F., MORALES S.E., MARTINEZ M.J., TRIGO J.F. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can. J. Vet. Res.*, 2003, **67**, 142-145.
- SANDERSON M.W., GAY J.M., BASZLER T.V. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet. Parasitol.*, 2000, **90**, 15-24.
- SAWADA M., PARK C. H., MORITA T., SHIMADA A., UMEMURA T., HARITANI M. Pathological findings of nude mice inoculated

- with bovine *Neospora*. *J. Vet. Med. Sci.*, 1997, **59**, 947-948.
- SAWADAM., KONDOH., TOMIOKA Y., PARK C., MORITA T., SHIMADA A., UMEMURA T. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet. Parasitol.*, 2000, **90**, 247-252.
- SCHARES G., PETERS M., WURM R., BARWALD A., CONRATHS F.J. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.*, 1998, **80**, 87-98.
- SCHARES G., CONRATHS F.J., REICHEL M.P. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 659-667.
- SCHARES G., RAUSER M., SONDGEN P., REHBERG P., BARWALD A., DUBEY J. P., EDELHOFER R., CONRATHS, F.J. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, 2000, **30**, 1123-1130.
- SCHARES G., BARWALD A., STAUBACH C., SONDGEN P., RAUSER M., SCHRODER R., PETERS M., WURM R., SELHORST T., CONRATHS F.J. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet. Parasitol.*, 2002, **106**, 293-305.
- SCHARES G., BARWALD A., STAUBACH C., ZILLER M., KLOSS D., WURM R., RAUSER M., LABOHM R., DRAGER K., FASEN W., HESS R. G., CONRATHS F.J. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by Logistic regression. *Int. J. Parasitol.*, 2003, **33**, 1631-1640.
- SCHATZBERG S.J., HALEY N.J., BARR S.C., DELAHUNTA A., OLBY N., MUNANA K., SHARP N.J. Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the antemortem diagnosis of toxoplasmosis and neosporosis in the central nervous system of cats and dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 2003, **64**, 1507-1513.
- SCHNEEBERGER C., SPEISER P., KURY F., ZELLINGER R. Quantitative detection of reverse transcriptase PCR product by mean of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.*, 1995, **4**, 234-238.
- SCHOCK A., INNES E.A., YAMANE I., LATHAM S.M., WASTLING J.M. Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 2001, **123**, 13-23.
- SCOTT H.M., SORENSEN O., WU J.T., CHOW E.Y., MANNINEN K. Seroprevalence of and agroecological risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and *neospora caninum* infection among adult beef cattle in cow-calf herds in Alberta, Canada. *Can. Vet. J.*, 2007, **48**, 397-406.
- SEDLAK K., BARTOVA E. Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Vet. Parasitol.*, 2006, **136**, 223-231.
- SERRANO-MARTINEZ E., FERRE I., MARTINEZ A., OSORO K., MATEOS-SANZ A., DEL-POZO I., ADURIZ G., TAMARGO C., HIDALGO C.O., ORTEGA-MORAL M. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology*, 2007, **67**, 1175-1184.
- SILVA D.A., VITALIANO S.N., MINEO T.W., FERREIRA R.A., BEVILACQUA E., MINEO J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *J. Parasitol.*, 2005, **91**, 1212-1216.
- SILVA D.A.O., LOBATO J., MINEO T.W.P., MINEO J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.*, 2007, **143**, 234-244.
- SLAPETA J.R., MODRY D., KYSELOVA I., HOREJS R., LUKES J., KOUDELA B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet. Parasitol.*, 2002, **109**, 157-167.
- SLOTVED H.C., JENSEN L., LIND P. Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine fetuses with *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.*, 1999, **29**, 1165-1174.
- SONDGEN P., PETERS M., BARWALD A., WURM R., HOLLING F., CONRATHS F.J., SCHARES G. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet. Parasitol.*, 2001, **102**, 279-290.
- STEINMAN A., SHPIGEL N.Y., MAZAR S., KING R., BANETH G., SAVITSKY I., SHKAP V. Low seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild canids in Israel. *Vet Parasitol.*, 2006, **137**, 155-158.
- 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**, 227-234
- TENNENT-BROWN B.S., POMROY W.E., REICHEL M.P., GRAY P.L., MARSHALL T.S., MOFFAT P.A., ROGERS M., DRISCOLL V.A., REEVE O.F., RIDLER A.L., RITAVEN S. Prevalence of *Neospora* antibodies in beef cattle in New Zealand. *N. Z. Vet. J.*, 2000, **48**, 149-150.
- TIEMANN J.C., SOUZA S.L., RODRIGUES A.A., DUARTE J.M., GENNARI S.M. Environmental effect on the occurrence of anti-*Neospora caninum* antibodies in pampas-deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Vet Parasitol.*, 2005, **134**, 73-76.
- THILSTED J.P., DUBEY J.P. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1989, **1**, 205-209.
- THORNTON R.N., THOMPSON E.J., DUBEY J.P. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *N. Z. Vet. J.*, 1991, **39**, 129-133.
- THURMOND M., HIETALA S.K. Strategies to control *Neospora*

- infection in cattle. *Bovine Pract.*, 1995, **29**, 60–63.
- THURMOND M.C., HIETALA S.K. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1997, **210**, 672–674.
- TOMA B., DUFOUR B., SANAA M., BENEET J.J., SHAW A., MOUTOU F., LOUZA A. Epidémiologie appliquée à la lutte contre les maladies animales transmissibles majeures. Association pour l'Étude de l'Épidémiologie des Maladies Animales : Maisons-Alfort, 2001, 696 p.
- TYAGI S., KRAMER F.R. Molecular Beacons : probes that fluoresce upon hybridization. *Nature Biotechnol.*, 1996, **14**, 303–308.
- VACLAVEK P., KOUDELA B., MODRY D., SEDLAK K. Seroprevalence of *Neospora caninum* in aborting dairy cattle in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.*, 2003, **115**, 239–245.
- VANLEEUEWEN J.A., FORSYTHE L., TIWARI A., CHARTIER R. Seroprevalence of antibodies against bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum* in dairy cattle in Saskatchewan. *Can. Vet. J.*, 2005, **46**, 56–58.
- VARCASIA A., CAPELLI G., RUIU A., LADU M., SCALA A., BJORKMAN C. Prevalence of *Neospora caninum* infection in Sardinian dairy farms (Italy) detected by iscom ELISA on tank bulk milk. *Parasitol. Res.*, 2006, **98**, 264–267.
- VIANNA M.C., SREEKUMAR C., MISKA K.B., HILL D.E., DUBEY J.P. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet. Parasitol.*, 2005, **129**, 253–257.
- VITALIANO S.N., SILVA D.A., MINEO T.W., FERREIRA R.A., BEVILACQUA E., MINEO J.R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from southeastern and midwestern regions of Brazil. *Vet. Parasitol.*, 2004, **122**, 253–260.
- VON BLUMRÖDER D., STAMBUSCH R., LABOHN R., KLAWONN W., DRA"GER K., FASEN W., CONRATHS F.J., SCHARES G. Potential risk factors for the serological detection of *Neospora caninum*-infections in cattle in Rhineland-Palatinate (Germany). *Tierärztl. Prax. G.*, 2006, **34**, 141–147.
- WANHA K., EDELHOFER R., GABLER-EDUARDO C., PROSL H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Vet. Parasitol.*, 2005, **128**, 189–193.
- WAPENAAR W., JENKINS M.C., O'HANDLEY R.M., BARKEMA H.W. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *J. Parasitol.*, 2006, **92**, 1270–1274.
- WAPENAAR W., BARKEMA H.W., O'HANDLEY R.M., BARTELS C.J. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in bulk milk to estimate the prevalence of *Neospora caninum* on dairy farms in Prince Edward Island, Canada. *Can. Vet. J.*, 2007a, **48**, 493–499.
- WAPENAAR W., BARKEMA H.W., VANLEEUEWEN J.A., MCCLURE J.T., O'HANDLEY R.M., KWOK O.C., THULLIEZ P., DUBEY J.P., JENKINS M.C. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol.*, 2007b, **143**, 166–173.
- WAPENAAR W., BARKEMA H.W., SCHARES G., ROUVINEN-WATT K., ZEIJLEMAKER L., POORTER B., O'HANDLEY R.M., KWOK O.C., DUBEY J.P. Evaluation of four serological techniques to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) on Prince Edward Island, Canada. *Vet. Parasitol.*, 2007c, **145**, 51–58.
- WILLIAMS D.J., MCGARRY J., GUY F., BARBER J., TREES A.J. Novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet. Rec.*, 1997, **140**, 328–331.
- WILLIAMS J.H., ESPIE I., VAN WILPE E., MATTHEE A. Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 2002, **73**, 38–43.
- WILSON I.A. Inhibition and facilitation of nucleic acid research. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**, 3741–3751.
- WITTEWER C.T., HERRMANN M.G., MOSS A.A., RASMUSSEN R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 1997, **130**, 134–138.
- WOLFD., SCHARES G., CARDENAS O., HUANCA W., CORDERO A., BARWALD A., CONRATHS F.J., GAULY M., ZAHNER H., BAUER C. Detection of specific antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in naturally infected alpacas (*Lama pacos*), llamas (*Lama glama*) and vicunas (*Lama vicugna*) from Peru and Germany. *Vet. Parasitol.*, 2005, **130**, 81–87.
- WOUDA W., DUBEY J.P., JENKINS M.C. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J. Parasitol.*, 1997, **83**, 545–547.
- WOUDA W., MOEN A.R., SCHUKKEN Y.H. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology*, 1998, **49**, 1311–1316.
- WOUDA W., BARTELS C.J., MOEN A.R. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*, 1999, **52**, 233–245.
- WU J.T., DREGER S., CHOW E.Y., BOWLBY E.E. Validation of 2 commercial *Neospora caninum* antibody enzyme linked immunosorbent assays. *Can. J. Vet. Res.*, 2002, **66**, 264–271.
- YAMAGE M., FLECHTNER O., GOTTSTEIN B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.*, 1996, **82**, 272–279.