

BREVE COMMUNICATION

Confirmation de la présence de *Neospora caninum* en Belgique.

L. PONCELET (1), I. BJERKAS *, G. CHARLIER **,
F. COIGNOUL (2), B. LOSSON (3), M. BALLIGAND (1)

(1) Service de chirurgie des petits animaux.

(2) Service d'anatomie pathologique.

(3) Service de parasitologie.

Faculté de Médecine Vétérinaire

Université de Liège

rue des Vétérinaires, 45

1070 Bruxelles.

* : Department of Anatomy. The Norwegian College of Veterinary Medicine, postboks 8146 dep., Oslo 1.

** : Institut National de Recherche Vétérinaire, Groeselenberg, 99, 1080 Bruxelles.

Manuscrit déposé le 07/08/1990

RESUME

Neospora caninum a été identifié sur base immunohistochimique et sur base des caractéristiques ultrastructurelles à partir d'un échantillon de moelle lombo-sacrée d'un chiot élevé en Belgique. Les données cliniques, électrophysiologiques et anatomopathologiques sont détaillées.

INTRODUCTION

Depuis un peu plus de deux ans, notre attention a été attirée par une série de chiots présentant des symptomatologies ou des lésions compatibles avec celles dues à la toxoplasmose mais ne présentant pas de séroconversion vis à vis de *Toxoplasma gondii*. Ainsi nous avons publié récemment la description de 6 cas provenant de 5 nichées différentes et ayant souffert d'encéphalomyélo-radculite associée à de la polymyosite mais n'ayant pas d'anticorps contre *T. gondii*. L'examen anatomopathologique des tissus de deux de ces animaux a révélé la présence de protozoaires (Poncelet et al., 1990).

Dès 1984, Bjerkas avait décrit un parasite inconnu chez des chiots ayant présenté une symptomatologie proche (Bjerkas et al., 1984). Il précisa à partir d'une série de 5 chiots les caractéristiques ultrastructurelles du parasite et le distingua, au niveau immunologique, de *T. gondii* (Bjerkas et Presthus, 1988). Dubey

traita pour la microscopie électronique des blocs de paraffine provenant de chiens dont le décès était attribué à la toxoplasmose. Il mit ainsi en évidence dans 10 cas la présence d'un parasite distinct tant au niveau immunologique qu'ultrastructurel de *T. gondii* et qu'il baptisa *Neospora caninum* (Dubey et al., 1988 a). Le parasite a également été retrouvé chez des veaux (Dubey et al. 1989) et est transmissible au chat (Dubey et Lindsay, 1989) et à la souris (Dubey et al., 1988 b). Une description d'un parasite à l'ultrastructure proche fut faite indépendamment aux Etats Unis (Cummings et al., 1988). Depuis, le parasite a été reconnu sur base immunohistochimique et par examen au microscope électronique en Suède (Uggla et al., 1989) et sur base immunohistochimique en Angleterre (Dubey et al., 1990) et en Australie (Munday et al., 1990).

Les caractéristiques ultrastructurelles des parasites décrits par Bjerkas, Cummings et Dubey sont très proches. Dubey et Bjerkas ont échangé leurs antigènes et l'identité

des deux parasites est à présent démontrée.

Nous présentons ici les observations effectuées sur un chiot né des mêmes parents un an après le chiot 5 de notre précédent article. Dans les deux nichées successives, des chiots ont souffert à des degrés divers de parésie ou de paralysie des membres postérieurs suivies pour certains d'entre eux d'une contracture des muscles extenseurs. La recherche par immunofluorescence indirecte d'anticorps anti *T. gondii* est restée négative tant chez la mère que chez les jeunes.

RESULTATS ET DISCUSSION

Le chiot décrit ici, un Labrador mâle de deux mois, présentait une paralysie flasque du postérieur gauche et une parésie du postérieur droit; les symptômes existaient depuis deux semaines.

L'examen clinique ne révèle aucune autre anomalie; l'examen neurologique montre une aréflexie des

postérieurs mais une sensibilité douloureuse conservée. L'électromyographie montre des activités spontanées dans tous les groupes musculaires. Aucun potentiel musculaire n'est évoqué par la stimulation du nerf tibial ou péronier gauche. Les vitesses de conduction dans les nerfs tibial droit et cubital sont légèrement inférieures à la normale pour cet âge (26,3 et 28,7 m/s) (Sims et Selcer, 1980). Si les potentiels évoqués dans les muscles interosseux plantaires lors de stimulation du nerf tibial droit sont normaux, les ondes F sont absentes. L'analyse de sang révèle une éosinophilie (11 % sur 8 300 globules blancs) et l'augmentation des enzymes d'origine musculaire (CPK, 437 U/L; LDH, 363 U/L). L'association d'activités spontanées et d'une élévation des enzymes d'origine musculaire indique une polymyosite; l'absence de potentiels évoqués à partir du nerf sciatique gauche et le ralentissement des vitesses de conduction nerveuse plaide pour de la démyélinisation et même de la dégénérescence d'axones moteurs; l'absence d'onde F indique un problème surtout proximal.

Le chiot est euthanasié à la demande du propriétaire. L'autopsie ne révèle aucune lésion macroscopique si ce n'est l'atrophie des muscles des membres postérieurs. Des échantillons de foie, de poumon, de rate, de différents muscles, de cerveau et de moëlle sont prélevés et fixés dans du formol à 10 % tamponné. Une partie de la moëlle lombo-sacrée et des racines correspondantes sont fixées à la

glutaraldéhyde pendant 24 heures puis conservées dans un tampon cacodylate.

Les échantillons conservés au formol sont inclus à la paraffine, coupés et colorés à l'hématoxiline-éosine. Ils ne montrent de lésions qu'au niveau du tissu nerveux et des muscles. On trouve une myélo-radiculite subaiguë au niveau de la moëlle lombo-sacrée, caractérisée par des foyers de cellules inflammatoires où prédominent les macrophages. Plusieurs amas de protozoaires sont présents; aucun ne montre la paroi kystique épaisse décrite parfois pour *N. caninum* (Dubey et al., 1988; Uglia et al., 1989). Les muscles présentent des lésions de myosite multifocale subaiguë surtout marquées au niveau des muscles psoas. On observe des foyers d'infiltration cellulaire où prédominent les macrophages et les lymphocytes. Des granulocytes sont également présents avec un semis diffus de polynucléaires neutrophiles et quelques éosinophiles en foyers. La réaction inflammatoire est surtout interstitielle; cependant, à plusieurs endroits, les fibres musculaires ont subi des altérations régressives avec aspect éosinophile des cellules, vacuolisation cytoplasmique et, dans quelque cas nécrose cellulaire (fig. 1). Au niveau des nerfs du membre postérieur, de nombreuses logettes axonales sont vides et les cellules de Schwann voisinent avec des cellules inflammatoires à noyau rond, des polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles.

Des sections de moëlle lombo-sacrée sont traitées par la méthode du complexe avidine-biotine en utilisant comme premier anticorps soit le sérum d'un chien norvégien infecté par *N. caninum* soit du sérum de lapin infecté par *T. gondii*. Les parasites infestant notre patient réagissent dans le premier cas et pas dans le second (fig. 2). Ce parasite est donc immunologiquement identique à *N. caninum*. L'intervention du genre *Hammondia* est peu vraisemblable vu la parenté antigénique entre *Hammondia* et *Toxoplasma* (Levine, 1985).

L'échantillon de moëlle conservé dans du cacodylate est coloré au tétroxyde d'osmium puis à l'acétate d'uranyl, et ensuite inclus dans un mélange Epon[®]-Spurr[®]. Après examen des coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine, des coupes ultra fines, colorées au citrate de plomb, sont réalisées. Ceci permet la mise en évidence de plusieurs amas de tachyzoïtes. Chaque parasite est entouré d'un plasmalemmes externe et d'un complexe bilaminaire interne. On distingue dans certains parasites de très nombreux micronèmes au pôle antérieur, des vacuoles d'amylopectine, et des rhoptries qui sont souvent en grand nombre. Certains amas sont compris dans une vacuole parasitophore avec des tubules intravacuolaires (fig. 3); d'autres parasites sont libres dans le cytoplasme de la cellule hôte (fig. 4). Le nombre de rhoptries plaide pour *N. caninum* plutôt que pour *T. gondii*. L'intervention du genre *Sarcocystis* est peu probable car les mérocytes n'ont dans ce cas ni rhoptries ni micronèmes et

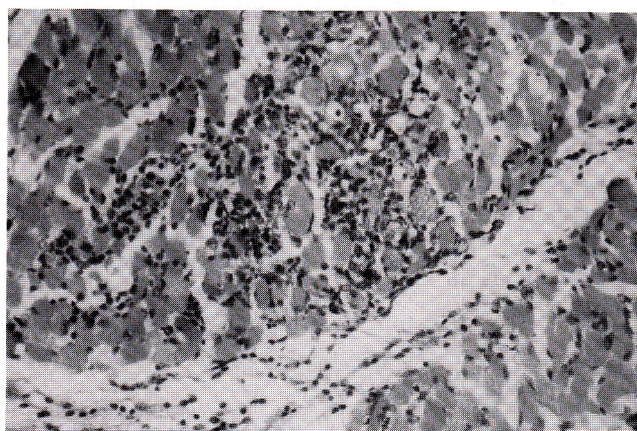


Figure 1

Foyer d'infiltration cellulaire dans le muscle psoas et dégénérescence de certaines fibres musculaires (grossissement 200x).

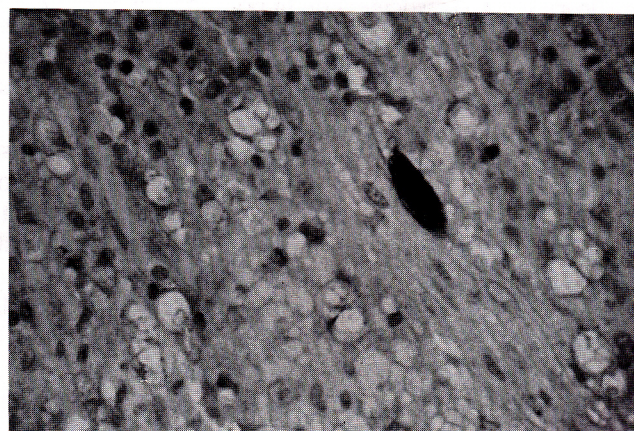


Figure 2

Coloration immunohistochimique de tachyzoïtes de *N. caninum* dans la moëlle lombo-sacrée (grossissement 400x).

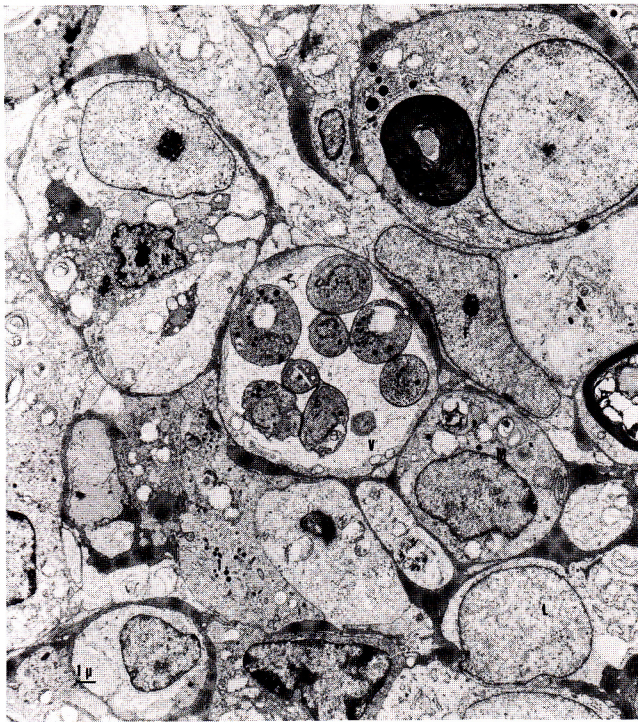


Figure 3

Groupe de tachyzoïtes de *N. caninum* contenus dans une large vacuole (V) dans laquelle s'observent de courts tubules. On observe également un macrophage (M) contenant des lysosomes secondaires, des lymphocytes (L), un fibroblaste (F), ainsi qu'une cellule nécrosée (N).



Figure 4

Groupe de tachyzoïtes de *N. caninum* apparemment libres dans le cytoplasme d'une cellule de Schwann; M : micronèmes; R : Rhoptries; A : mitochondrie.

les mérozoïtes sont contenus dans des kystes munis de septae (Levine, 1985).

CONCLUSION

Tant les données immunohistochimiques qu'ultrastructurelles confirment donc la présence de *N. caninum* chez un chien né et élevé en Belgique ce qui étend la distribution géographique connue de ce parasite. L'atteinte successive de plusieurs nichées d'une même mère a déjà été signalée (Dubey et al., 1988 a; Bjerkas et Presthus, 1988). Le cas rapporté ici renforce donc l'hypothèse d'une transmission verticale et ouvre des perspectives mystérieuses sur les relations du parasite et de son hôte.

SUMMARY

Neospora caninum in Belgium

Neospora caninum has been identified on immunohistochemical ground and on its ultrastructural features in the lumbosacral cord of a dog born and raised in Belgium. Details on clinical presentation, electrophysiological symptoms and pathology are given.

BIBLIOGRAPHIE

- BJERKAS I., MOHN S.F., PRESTHUS J.: Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 1984, **70**, 271-274.
- BJERKAS I., PRESTHUS J.: Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *A.P.M.I.S.*, 1988, **96**, 445-454.
- CUMMINGS J.F., DELAHUNTA A., SUTER M.M., JACOBSON R.H.: Canine protozoan polyradiculoneuritis. *Acta Neuropathol.* 1988, **76**, 46-54.
- DUBEY J.P., CARPENTER J.L., SPEER C.A., TOPPER M.J., UGGLA A.: Newly recognised fatal protozoan disease of dogs. *J.A.V.M.A.*, 1988, **192**, 1269-1285.
- DUBEY J.P., HATTEL A.L., LINDSAY D.S., TOPPER M.J.: Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J.A.V.M.A.*, 1988, **193**, 1259-1253.
- DUBEY J.P., LINDSAY D.S.: Fatal *Neospora caninum* infection in kittens. *J. Parasitol.*, 1989, **75**, 148-151.
- DUBEY J.P., LEATHERS C.W., LINDSAY D.S.: *Neospora Caninum*-like protozoan associated with fatal myelitis in newborn calves. *J. Parasitol.*, 1989, **75**, 146-148.
- DUBEY J.P., HIGGINS R.J., SMITH J.H., O'TOOLE T.D.: *Neospora Caninum* encephalomyelitis in a British dog. *Vet. Rec.*, 1990, **126**, 193-194.
- LEVINE N.D.: Apicomplexa: Sarcocystis, Toxoplasma, and related Protozoa in Veterinary protozoology. *Iowa State University Press*, 1985, 233-260.
- MUNDAY B.L., DUBEY J.P., MASON R.W.: *Neospora caninum* infection in dogs. *Australian Vet. J.*, 1990, **67**, 76-77.
- PONCELET L., COIGNOUL F., FONTAINE J., BALLIGAND M.: Infestation de chiots par *Neospora Caninum* en Belgique et en France? *Ann. Méd. Vét.*, 1990, **134**, 167-171.
- SIMS R.H., REDDING R.W.: Maturation of nerve conduction velocity and the evoked potential in the dog. *Am. J. Vet. Res.*, 1980, **41**, 1287.
- UGGLA A., DUBEY J.P., LANDEMARK G.: Encephalomyelitis and myositis in a Boxer puppy due to a *Neospora* like infection. *Vet. Parasitol.*, 1989, **32**, 255-260.

**20EME ANNIVERSAIRE DE LA CREATION DU LERPAS
CENTRE NATIONAL D'ETUDES VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES
LABORATOIRE D'ETUDES SUR LA RAGE
ET LA PATHOLOGIE DES ANIMAUX SAUVAGES**

**15 au 20 Octobre 1991
Avant projet de programme**

15, 16, 17 Octobre 1991

3EME REUNION DE CONCERTATION SUR LA RAGE EN EUROPE

et

**SYMPOSIUM SUR LA SANTE
ET LA GESTION DES POPULATIONS DE MAMMIFERES**

I. SESSIONS SCIENTIFIQUES
(Posters et communications orales)

A : Invasion, diffusion et persistance des maladies contagieuses dans les populations.

Aa – Zoonoses des Carnivores

Ab – Epidémiologie des maladies des Mammifères sauvages

B : Santé des populations de Mammifères rares ou menacés et Biologie de la Conservation

II. SESSIONS TECHNIQUES
(Posters et ateliers)

A : Gestion des Mammifères et Problèmes de Santé

Aa – Vaccination orale contre la rage

Ab – Appâts et appâtage

Ac – Sujets divers

B : Contrôles des espèces domestiques férales ou errantes en milieu insulaire, urbaine ou rural

(Des communications sur le contrôle des espèces sauvages dans le cadre de la lutte contre les zoonoses seront acceptées si elles sont de portée générale)

18, 19, 20 Octobre 1991

**Colloque francophone de mammalogie
«Ecologie, comportement et évolution des carnivores»**