

Infestation de chiots par *Neospora Canis* en Belgique et en France ?

L. PONCELET (*), F. COIGNOUL (**), J. FONTAINE (***),
M. BALLIGAND (*)

(*) : service de chirurgie des petits animaux.

(**) : service d'anatomie pathologique.

(***) : service de médecine interne des petits animaux.

Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Liège
rue des Vétérinaires, 45
1070 Bruxelles.

Manuscrit déposé le 15/01/1990.

INTRODUCTION

Les atteintes nerveuses et musculaires posent un problème difficile au praticien. En effet le pronostic, le traitement et la prophylaxie dépendent du diagnostic étiologique. Certaines infestations parasitaires comme la toxoplasmose peuvent entraîner la mort ou un syndrome de contracture musculaire handicapant définitivement le patient (Leighton, 1981), (Bardet et Hohn, 1983). Cet article présente les cas de 6 chiots provenant de 5 nichées différentes. Ils ont présenté une parésie postérieure suivie pour quatre d'entre eux d'une contracture progressive de muscles extenseurs des membres postérieurs. Ces symptômes ont été accompagnés de troubles généraux dans un cas et d'atteinte de nerf crânien dans un autre.

Ces symptomatologies ont été associées chez le chien à l'infestation par *Toxoplasma Gondii* (Hartley, 1956), (Hartley et al., 1958), (Fankhauser, 1963), (Holliday et al., 1963), (Drake et Hime, 1967), (Averill et Dela-

hunta, 1971), (Ehrensperger et Suter, 1977), (Van Heerden et Van Rensburg, 1979), (Nesbit et al., 1981), (Sawchuk, 1981), (Chrisman, 1982), (Chrisman et Averill, 1983), (Core et al., 1983), (Oliver et Greene, 1983), (Sutter et al., 1984), (Greene et al., 1985), (Duncan et Griffiths, 1986), (Braund et al., 1988), (Koestner et Cole, 1988), (Hass et al., 1989). Mais récemment, d'autres protozoaires ont été impliqués dans des tableaux cliniques fort proches (Hilali et al., 1986), (Cummings et al., 1988), (Dubey et al., 1988 a), (Dubey et al., 1988 b), (Uggla et al., 1989). *Neospora Canis*, le parasite américain, n'est pas récent. On l'a identifié sur des échantillons datant de 1948 (Dubey et al., 1988 a). Des organismes proches de *Toxoplasma* ont été décrits en outre en Norvège (Bjerkas et Presthus, 1988) et en Suède (Hilali et al., 1986), (Uggla et al., 1989). Si les parasites décrits en Norvège semblent identiques à ceux décrits aux Etats-Unis, il n'en va pas de même pour ceux décrits en Suède (Dubey et al., 1988 a).

RESUME

Les observations ont porté sur six chiots de cinq nichées différentes. Un examen clinique et des analyses de sang (5 animaux), un examen électromyographique (4 animaux), des biopsies musculaires (2 animaux) et une autopsie (2 animaux) ont été effectués.

Les résultats électrophysiologiques et anatomopathologiques ont conduit à un diagnostic d'encéphalo-myélo-radculite et de myosite associées à la présence de protozoaires.

La recherche d'anticorps sériques dirigés contre *Toxoplasma Gondii* a été négative chez les 5 chiens testés. Plusieurs essais de retraitement des échantillons de tissus nerveux inclus à la paraffine pour la microscopie électronique ont échoué. Nous avons recherché dans la littérature des 40 dernières années les cas cliniquement similaires où l'intervention de *T. gondii* était considérée comme vraisemblable mais chez qui la recherche d'anticorps spécifiques s'était révélée négative.

Des résultats sérologiques ne sont rapportés que dans 34 % des cas et seulement 53 % de ceux-ci sont positifs. Nous pensons qu'une partie de ces cas ainsi qu'une partie de ceux présentés dans cet article pourraient être en fait victimes d'un autre protozoaire.

MATERIEL ET METHODE

Les chiots présentés à notre faculté ont subi un examen clinique et neurologique de routine. L'examen neurologique des membres bloqués en hyperextension était limité à l'examen de la sensibilité douloureuse. Pour le chien 5, on ne dispose que de données anamnestiques; il a été inclus dans notre série car, après avoir présenté des symptômes identiques à ceux de trois de nos chiots, il était disponible pour l'anatomie pathologique. Les analyses de sang ont été effectuées par le département vétérinaire d'un laboratoire extérieur.

Les données électrophysiologiques et les biopsies musculaires ont été obtenues sur des animaux endormis au Thiopenthal (Pentothal, Abbot). On a utilisé un appareil Medelec MS7 pour l'électromyographie et les procédures décrites ailleurs (Lee et Bowen, 1970) pour la mesure des vitesses de conduction nerveuse. Afin de tenir compte des variations liées à l'âge, on s'est référé aux valeurs publiées (Sims et Redding, 1980) et on a

pris comme limite inférieure pour chaque classe d'âge la moyenne moins 1,96 fois la déviation standard.

Les biopsies et les échantillons d'autopsie ont été fixés dans du formol à 10 % tamponné, inclus à la paraffine, coupés à 5 µm, et colorés à l'hématoxiline-eosine. Les échantillons démontrant des protozoaires ont été colorés par la méthode de Gram et à l'hématoxiline ferrique; ils ont été également retraités pour des inclusions à l'épône et des examens au microscope électronique.

RESULTATS

Anamnèse et examen clinique (tableau 1).

Les symptômes ont débuté chez des chiots âgés de 3 à 8 semaines. Dans une même nichée, la gravité des symptômes variait d'un chien à l'autre, certains semblant épargnés. Les premiers signes ont toujours été

une parésie principalement postérieure. Un ictère transitoire chez la mère a précédé les symptômes chez les jeunes dans un cas (chiot 4). Un cas (chiot 3) a présenté de la fièvre, de l'anorexie, de la toux, de la diarrhée et de la polyadénite. La parésie a évolué en une dizaine de jours vers une hyperextension d'un ou des deux membres postérieurs chez 4 de nos chiots (fig. 1).

Au moment de la présentation (au moins une semaine après le début de la parésie), l'examen des appareils autres que nerveux et musculaire était normal. L'examen neurologique démontra l'atteinte d'un nerf crânien (ptose de la paupière et strabisme latéral) dans un cas (chiot 4); les deux chiots parétiques au moment de la présentation (3 et 4) avaient tous leurs réflexes fortement diminués à l'arrière et légèrement à l'avant; pour les 4 chiots présentant de l'hyperextension, la sensibilité

Tableau 1
Résumé de l'anamnèse et des symptômes

Les vitesses de conceptions nerveuses sont exprimées en m/s. L'activité des enzymes créatinine phosphokinase (CPK) est exprimée en U/L.

Chien	1	2	3	4	5	6
Race	Boxer	Boxer	Boxer	Bleu de Picardie	Labrador	Dobermann
Parentée	frère de 2	frère de 1	même père que 1 et 2	néant	néant	néant
Sexe	M	M	M	M	F	M
Age au début des symptômes	2 mois	2 mois	2,5 mois	3 semaines	4 semaines	3 semaines
Age à la présentation	3 mois	3,5 mois	2,5 mois	4 semaines	6 semaines	4 semaines
Pays d'origine	Belgique	Belgique	Belgique	France	Belgique	Belgique
Symptômes et évolution	faiblesse des 2 postérieurs évoluant vers une hyperextension en une semaine.	idem 1, un seul membre affecté.	symptômes généraux suivis de tétraparésie guérissant spontanément en 6 jours, ensuite rechute.	ictère chez la mère, paraplégie chez les jeunes	paraparésie évoluant vers une hyperextension des membres postérieurs en 1 semaine	
CPK (valeur max. : 80)	272	411	844	non recherché	non recherché	423
Hémagglutination Toxoplasma	négatif	négatif	1/16 et 1/16 2 semaines après	négatif	non recherché	négatif
Examen neurologique	Normal	Normal	Tonus musculaire diminué et hyporéflexie	Strabisme latéral et ptose des paupières; hyporéflexie	non recherché	Normal
EMG, activités spontanées	Très nombreuses	Nombreuses	Présentes	Nombreuses	non recherché	Présentes
Vitesse de conduction nerveuse						
Cubital	66	non recherché	36	29	non recherché	non recherché
Tibial	36	non recherché	44	29	non recherché	non recherché
Valeur minimale	47,6		47,4	29,3		
Biopsie musculaire	Tissu cicatriciel	Aspect régénératif	non recherché	non recherché	non recherché	non recherché
Examen tissu nerveux	non recherché	non recherché	non recherché	Encéphalite, myélite et radiculite multifocale		non recherché
Gram				Présence de protozoaires		
hématoxiline ferrique				-	-	
				+	+	

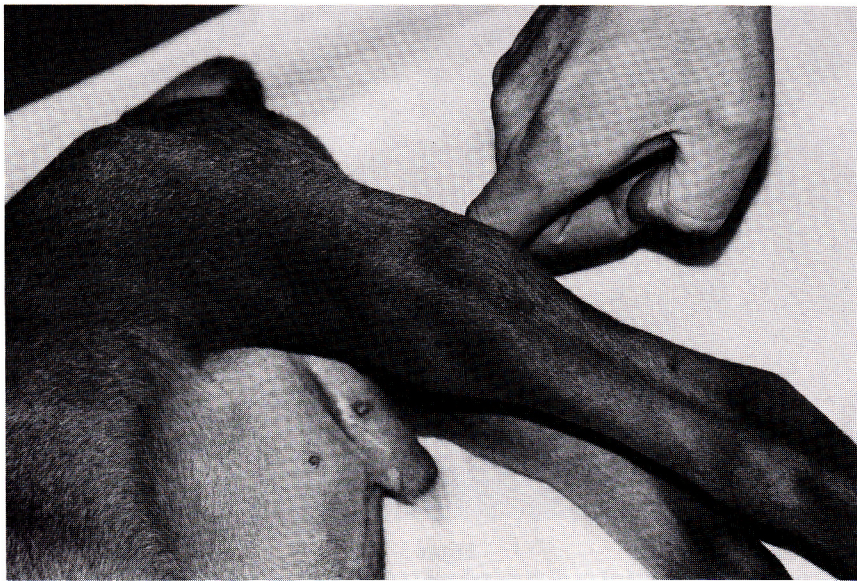


Figure 1.

Membres postérieurs du chiot 1 présentant une contracture et une atrophie des muscles extenseurs.

douloureuse du membre atteint était normale, les membres épargnés étaient normaux; aux membres atteints, les muscles extenseurs étaient atrophiés et la flexion des articulations était limitée ou impossible.

Evolution

On s'est enquis de l'évolution des chiens décrits et de leurs frères et sœurs. Le chiot 6 ainsi qu'un frère et une sœur ont été euthanasiés; l'autopsie n'a pas été autorisée. Le chiot 4 ainsi que ses frères et sœurs atteints ont guéri spontanément et sans garder de séquelles. Le chiot 3 a évolué spontanément vers la guérison en six jours puis a présenté une rechute; traité avec une association de pyriméthamine (Daraprim, 0,5 mg par Kg et par jour) et de sulfamidés, il a guéri sans garder de séquelles. Les chiens présentant une hyperextension des membres ne se sont améliorés avec aucun traitement.

Examens complémentaires

La recherche des anticorps dirigés contre *T. gondii* s'est faite par hémagglutination indirecte chez tous les chiens sauf un (5). Le résultat a été négatif pour tous. L'activité des enzymes CPK était trop élevée chez les 4 chiens où elle a été recherchée. Des activités électriques spontanées (fibrillations et ondes positives

aiguës) d'abondance variable ont été mises en évidence dans différents groupes musculaires chez tous les chiens testés; la vitesse de conduction nerveuse motrice était inférieure à la normale chez les trois chiens où elle a été mesurée; l'amplitude, la durée et la forme des potentiels musculaires évoqués semblaient normales; les latences d'onde F n'ont pas, été mesurées.

Anatomie pathologique

Les deux biopsies effectuées dans des muscles contracturés ne mon-

traient rien d'autre que du tissu cicatriciel et un aspect régénératif de certaines fibres musculaires.

Les autopsies pratiquées sur les chiens 4 et 5 ne révélèrent aucune lésion macroscopique si ce n'est une atrophie symétrique de la musculature des membres postérieurs chez le chiot 5. Des échantillons de moëlle lombaire du chiot 5, du thymus, du foie, du poumon, de la vessie, de la rate et du système nerveux (moëlle et cerveau) chez le chiot 4 ont été prélevés pour l'histopathologie. Des lésions significatives n'ont été découvertes que dans le système nerveux; elles étaient similaires en nature et en distribution chez les deux chiens. Au niveau de la moëlle, les lésions les plus sévères siégeaient dans les racines nerveuses (fig. 2). Elles étaient caractérisées par de multiples foyers de cellules inflammatoires rondes où les macrophages prédominaient. Dans ces foyers, au sein d'une neuropile oedémateuse, on a trouvé quelques polynucléaires neutrophiles éparpillés et quelques rares plasmocytes. Les gaines axonales étaient dilatées et dépourvues d'axones dans les lésions. Les leptoméninges et la substance blanche sous pie-mèrienne présentaient des foyers multiples d'infiltration hystiocitaire, de gliose diffuse, de vacuolisation neuronale et de neuronophagie. Dans plusieurs lésions chez les deux chiens, des structures allongées

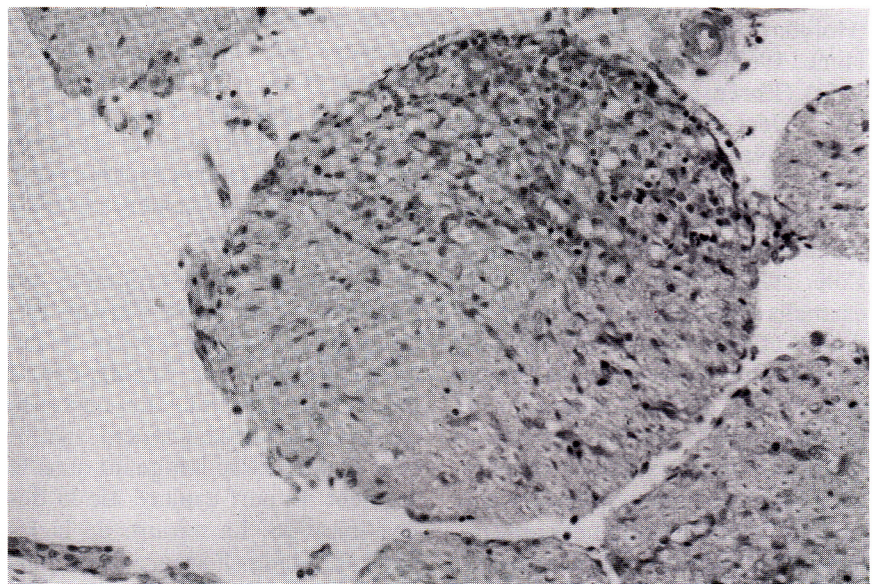


Figure 2.

Racine nerveuse du chiot 5 : remarquer l'infiltration par des macrophages et la présence de gaines sans axones (coloration H-E).

éosinophiliques avec un noyau d'environ 0,5 μ m étaient observables. Des lésions similaires étaient présentes dans le cortex frontal, le cortex temporal, le thalamus et le cerveau moyen du chien 4. Elles présentaient une organisation périvasculaire nette avec, dans le cortex frontal des signes d'hypercellularité suggérant de la néoangiogénèse. Le diagnostic lésionnel de méningo-encephalo-myélo-radculite multifocale fut posé.

Les organismes observés (fig. 3) ont été colorés en noir par l'hématoxiline ferrique et non colorés par la méthode de Gram.

Trois tentatives de retraitement et d'inclusion à l'époue à partir de plusieurs échantillons inclus à la paraffine ont été effectuées mais l'ultrastructure des microorganismes n'a pu être observée dans aucune coupe de microscopie électronique.

DISCUSSION

Lors de suspicion de toxoplasmose, une discordance entre les résultats de la sérologie d'une part et ceux de la clinique, de l'électrophysiologie et de l'anatomie pathologique d'autre part n'est pas rare. Dans les cas considérés comme de la toxoplasmose avec entorse nerveuse et/ou musculaire décrits depuis les années 50, les données sérologiques sont rares et contradictoires. Sur 58 cas (16 auteurs) (Hartley, 1956), (Hartley et al., 1958), (Fankhauser, 1963), (Holliday et al., 1963), (Drake et Hime, 1967), (Averill et Delahunta, 1971), (Ehrensperger et Suter, 1977), (Van Heerden et Van Rensburg, 1979), (Nesbit et al., 1981), (Sawchuk, 1981), (Core et al., 1983), (Sutter et al., 1984), (Greene et al., 1985), (Braund et al., 1988), (Koestner et Cole, 1988), (Hass et al., 1989), 17 examens sérologiques sont rapportés dont 8 étaient négatifs (47 %). Lors d'infestation expérimentale (Koestner et Cole, 1960), 2 chiens sur 17 étaient négatifs (12 %). Les raisons invoquées pour expliquer ce paradoxe sont une immunotolérance due à des infestations prénatales, une immunoincompétence des jeunes et le blocage par des anticorps d'origine maternelle (Koestner et Cole, 1960). Cependant, la récente description de

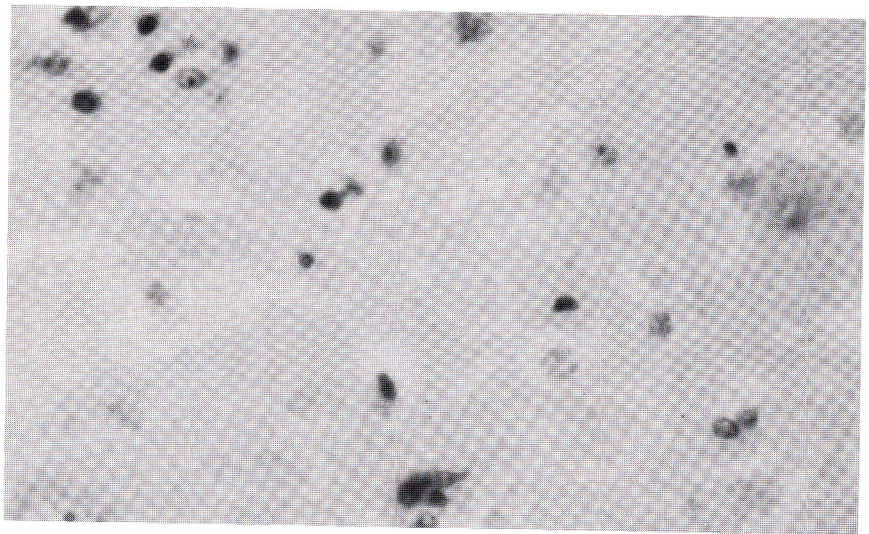


Figure 3.
Thalamus du chiot 4 : présence d'un granulome contenant des protozoaires (coloration H-E).

protozoaires pathogéniquement proches mais immunologiquement distincts de *T. gondii* doit être prise en considération.

Dans les cas présentés ici, *Encéphalitozoon Cuniculi* (Shaddock et al., 1978) peut être exclu sur base des propriétés tinctoriales des organismes démontrés (Soulsby, 1982). L'identification des autres protozoaires est à l'heure actuelle basée sur les caractéristiques ultrastructurales (Hilali et al., 1986), (Dubey et al., 1988 a), (Bjerkas et al., 1988), (Ugla et al., 1989); la mise au point de diagnostics immuno-histochimiques vient cependant d'être publiée (Lindsay et Dubey, 1989), (Bjerkas et Presthus, 1989). Le parasite suédois semble différent des parasites norvégiens et américains (Dubey et al., 1988 a). Nos renseignements négatifs, s'ils suggèrent fortement la présence de parasites différents de *T. Gondii* dans nos pays, ne permettent évidemment pas d'affirmer leur identité.

Le diagnostic de neuropathie est basé sur l'observation clinique (diminution des réflexes) et sur l'électromyographie. Le ralentissement des vitesses de conduction nerveuse encore que statistiquement significatif était modéré indiquant dans le segment de nerf exploré, de la démyélinisation. La mesure de la latence des ondes F aurait été du plus haut intérêt dans l'exploration des racines. Rien ne permet de distinguer une origine neurogène d'une

origine myogène aux activités spontanées musculaires. Cependant, la coexistence d'activités spontanées et d'une élévation des enzymes d'origine musculaire signe la participation d'un problème musculaire. Les deux biopsies musculaires étaient d'un faible secours, mais une certaine chance est nécessaire quand on est confronté à des problèmes focaux. La préparation d'échantillons pour la microscopie électronique se heurte au même problème.

CONCLUSION

A l'heure actuelle, si un diagnostic de toxoplasmose peut être basé sur une augmentation du titre d'anticorps spécifiques, seule l'observation de l'ultrastructure des protozoaires permet un diagnostic certain de Neosporose ou d'une parasitose proche. Les diagnostics immuno-histochimiques (Lindsay et Dubey, 1989), (Bjerkas et Presthus, 1989) sont confinés à des laboratoires très spécialisés. On peut raisonnablement supposer que ces différents protozoaires sont sensibles aux mêmes agents chimiothérapeutiques. Aussi, en attendant que des tests sérologiques soient disponibles, nous avons décidé de traiter avec l'association pyrimétamine, sulfamidés toutes les associations de neuropathie et de myopathie rencontrée chez le chien quelque soient les résultats de la recherche d'anticorps spécifique pour *T. gondii*.

BIBLIOGRAPHIE

- AVERILL D. R., DELAHUNTA A.: Toxoplasmosis of the canine nervous system: clinicopathologic findings in four cases. *J.A.V.M.A.*, 1971, **159**, 1135-1141.
- BARDET J.F., HOHN R.B.: Quadriceps contracture in dogs. *J.A.V.M.A.*, 1983, **183**, 681-685.
- 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.
- BJERKAS I., PRESTHUS J.: Immunochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoan associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *A.P.M.I.S.*, 1988, **96**, 455-454.
- BRAUND K.G., BLAGBURN B.L., TOIVO-KINNUCAN M., AM-LING K.A., PIDGEON G.L.: Toxoplasma polymyositis/polyneuropathy- a new clinical variant in two mature dogs. *J.A.V.M.A.*, 1988, **24**, 93-97.
- CHRISMAN C.L.: Quadriplegia, quadriplegia, ataxia of all four limbs and episodic weakness. In : Problems in small animal neurology. Lea and Fabiger 1982, pp. 317-363.
- CHRISMAN C.L., AVERILL, D.R. Jr.: Diseases of peripheral nerves and muscles. In : Textbook of veterinary internal medicine. Ettinger ed. Saunders company. 1983, pp. 608-653.
- CORE D.M., HOFF E.J., MILTON J.L.: Hindlimb hyperextension as a result of Toxoplasma Gondii polyradiculitis. *J.A.A.H.A.*, 1983, **19**, 713-716.
- CUMMINGS J.F., DELAHUNTA A., SUTER M.M., JACOBSON R.M.: Canine protozoan polyradiculoneuritis. *Acta Neuropathol.*, 1988, **76**, 46-54.
- DRAKE J.C., HIME J.M.: Two syndromes in young dogs caused by Toxoplasma Gondii. *J. Small Anim. Pract.*, 1967, **8**, 621-626.
- 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.
- DUNCAN I.D., GRIFFITHS R.: Neuromuscular diseases. In : Neurologic disorders. Kornegay ed., Churchill Livingstone, 1986, pp. 169-195.
- EHRENSPERGER F., SUTER M.: Radiculitis toxoplasmic beim Hund. *Kleintier. Prax.*, 1977, **22**, 59-62.
- FANKHAUSER R.: Polymyositis und Encephalomyositis granulomatosa toxoplasmica beim Hund. *Schweiz. Arch. Tier.*, 1963, **105**, 688-699.
- GREENE C.E., COOK J.R., MAHAFFEY E. A.: Clindamycin for treatment of Toxoplasma polymyositis in a dog. *J.A.V.M.A.*, 1985, **187**, 631-634.
- HARTLEY W.J. Some observations on canine toxoplasmosis. *New Z. Vet. J.*, 1956, **4**, 115-118.
- MARTLEY W.J., LINDSAY A.B., MacKINNON M.M.: Toxoplasma meningo-encephalitis and myositis in a dog. *New Z. Vet. J.*, 1958, **6**, 124-127.
- HASS J.A., SHELL L., SAUNDERS G.: Neurological manifestations of toxoplasmosis: a literature review and case summary. *J.A.A.H.A.*, 1989, **25**, 253-260.
- HILALI M., LINDBERG R., WALLER T., WALLIN B.: Enigmatic cystforming sporozoan in the spinal cord of a dog. *Acta Vet. Scand.*, 1986, **27**, 623-625.
- HOLLIDAY T.A., OLANDER M.J., WINDS A.P.: Skeletal muscle atrophy associated with canine toxoplasmosis. A case report. *Cornell Vet.*, 1963, **53**, 288-300.
- KOESTNER A., COLE C.R.: Neuropathology of canine toxoplasmosis. *Am. J. Vet. Res.*, 1960, **21**, 831-844.
- LEE A.F., BOWEN J.F.: Evaluation of motor nerve conduction velocity in the dog. *Am. J. Vet. Res.*, 1970, **31**, 1361.
- LEIGHTON R.L.: Muscle contracture in limbs of dogs and cats. *Vet. Surg.*, 1981, **10**, 132-135.
- LINDSAY D.S., DUBEY J.P.: Immunohistochemical diagnosis of Neospora caninum in tissues sections. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, **50**, 1981-1983.
- NESBIT J.W., LOURENS D.C., WILLIAMS M.C.: Spastic paresis in two littermate pups caused by Toxoplasma Gondii. *J. South Af. Vet. Assoc.*, 1981, **52**, 243-246.
- OLIVER J.E., GREENE C.E.: Diseases of the brain. In : Textbook of internal medicine. Ettinger ed., Saunders, 1983. pp. 460-532.
- SAWCMUK S.A.: Acute CNS toxoplasmosis in a dog. *Canine Pract.*, 1981, **8**, 37-40.
- SHADDUCK J.A., BENDELE R., ROBINSON G.T.: Isolation of the causative organism of canine Encephalitozoonosis. *Vet; Pathol.*, 1978, **15**, 449-460.
- 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.
- SOULSBY E.J.L.: Phylum: microspora. In : Helminths, arthropods and protozoa of domestic animals. Bailliere Tindall 7° ed., 1982, pp.741-745.
- SUTER M.M., MAUSER B., PALMER D.G., OETTLI P.: Polymyositis-polyradiculitis due to toxoplasmosis in the dog; serology and tissue biopsy as diagnostic aids. *Zbl. Vet. Med.*, 1984, **A 31**, 792-798.
- 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.
- VAN HEERDEN J., VAN RENSBURG I.B.J. : Toxoplasmosis in a dog. *J. South Af. Vet. Assoc.*, 1979, **50**, 211-214.

SUMMARY

Pups infestation by *Neospora caninis* in Belgium and France ?

Six pups of five different litters were included in this study. Clinical examination and blood analysis (5 dogs), electrophysiology (4 dogs), muscular biopsy (2 dogs) and necropsy (2 dogs) were carried out. Electrophysiological and pathological results led to the diagnosis of encephalo-myelo-radicularitis and myositis associated to the presence of protozoa. All sera were negative for the presence of specific antibodies against *T. gondii*. Several attempts to reprocess paraffin embedded samples for electron microscopy failed. We have reviewed the clinical cases with similar symptoms described during the 40 last years: serological results were reported in 34 % of the cases and only 53 % of them were positive for *T. gondii*. We think that part of these cases as well as part of those described in the present paper could be caused by an other unidentified protozoan.