THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme EMILIE BOUHSIRA

le vendredi 25 avril 2014

Titre :

ROLE DE CTENOCEPHALIDES FELIS (BOUCHE, 1835) [SIPHONAPTERA: PULICIDAE] DANS LA TRANSMISSION DE BARTONELLA SPP. [RHIZOBIALES: BARTONELLACEAE] ET MOYENS DE CONTROLE

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Laboratoire de Parasitologie (Toulouse, France)

Directeur(s) de Thèse :

M. MICHEL FRANC

Rapporteurs :

M. BRUNO CHOMEL, UNIVERSITY OF CALIFORNIA DAVIS

Mme MARIE LAURE DARDE, UNIVERSITE DE LIMOGES

Membre(s) du jury :

M. CHRISTIAN BORIES, UNIVERSITE PARIS 11, Président

M. EMMANUEL LIENARD, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. HENRI-JEAN BOULOUIS, ENV MAISON ALFORT, Membre

M. MICHEL FRANC, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à :

A **Monsieur le Professeur Michel FRANC**,
Pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de son équipe il y a maintenant plus de 7 ans. Pour m'avoir initiée au milieu de la recherche et donné l'opportunité de réaliser cette thèse et bien d'autres choses encore, pour toute la confiance accordée et toutes les initiatives laissées dans la réalisation de ce travail. Pour son soutien, sa disponibilité, sa gentillesse, pour tous les enseignements et les conseils reçus et pour l'amitié partagée.
Qu'il trouve ici l'expression de mon immense gratitude et de mon profond respect.

A **Monsieur le Docteur Emmanuel LIENARD,**
Pour m'avoir co-encadrée, soutenue, conseillée. A l'excellence de son travail, à sa rigueur, à sa disponibilité et à ses conseils qui m'ont permis de progresser dans la réalisation de ce travail. Tous mes remerciements pour ses qualités professionnelles et humaines.

A **Monsieur le Professeur Bruno CHOMEL**,
Qui me fait le grand honneur d'être rapporteur de cette thèse et dont les commentaires ont permis d'améliorer ce travail.
Sincères remerciements.

A **Madame le Professeur Marie-Laure DARDE**,
Qui me fait le grand honneur de s'être intéressée à mon travail et d'avoir accepté de le rapporter.

A **Monsieur le Docteur Christian BORIES**,
Qui a accepté l'invitation d'examiner ce travail et me fait l'honneur de le juger.

A **Monsieur le Professeur Henri-Jean BOULOUIS,**
Qui m'a fait l'honneur de m'aider dans ce travail et qui accepte de le juger.
Pour sa gentillesse, son aide, son soutien et ses précieux conseils. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés. Un grand merci, et que notre collaboration se poursuive.

A **Monsieur Francis BIVILLE**,
Pour m'avoir initiée à l'univers passionnant des Bartonelles et grâce à qui les premiers travaux ont été entrepris. Un grand merci pour vos précieux conseils, votre rigueur scientifique, votre enthousiasme, nos échanges passionnants. J'ai beaucoup appris à vos côtés.

A **Madame le Docteur Isabelle RAYMOND-LETRON**,
Pour ses précieux conseils, sa gentillesse, sa chaleureuse disponibilité, sa bonne humeur et son sourire sans faille. Merci pour toutes les heures que vous m'avez consacré et de vous être autant enthousiasmée que moi pour l'histologie de la puce ! Que notre collaboration se poursuive.

A **Monsieur le Professeur Philippe JACQUIET**,
Pour son enthousiasme, son soutien, son aide et ses conseils. Un grand merci.

A **Monsieur le Professeur Jacques DUCOS DE LAHITTE,**
Pour ses encouragements, sa disponibilité et sa gentillesse.

A **Monsieur le Professeur Philippe DORCHIES,**
Pour son soutien.

A Martine ROQUES, Solange VERMOT et Sonia GOUNAUD, mes précieuses collègues.
Pour vous être toujours adaptées avec sourire, patience, bienvaillance et gentillesse à mon sens inné de l'organisation et de la ponctualité… Pour m'avoir toujours assuré des milliers de puces à disposition, une contention parfaite des animaux, m'avoir appris l'art délicat de l'extension du parafilm… Mais surtout pour vos encouragements, votre soutien, votre amitié sans faille, et pour avoir toujours cru en moi.
Merci n'est pas assez pour exprimer ma profonde gratitude. Sans vous, ce travail n'aurait pas abouti.

A Yann FERRANDEZ, MaFeng LIU et Martine MONTEIL,
Qui ont rendu mes passages à l'ANSES aussi passionnants que fort sympathiques. Je garde un excellent souvenir de mon travail à vos côtés.

A Christelle GRISEZ et Françoise PREVOT,
Pour m'avoir appris l'art des dilutions et de la PCR quantitative. Pour leur aide technique, leur bonne humeur et leur gentillesse.

A Céline BLEUART et Isabelle PARDO,
Pour leur disponibilité et pour m'avoir toujours accueillie, mes puces et moi, avec le sourire.

A Olivier CATRICE et Yves MARTINEZ,
Pour leur disponibilité, leurs conseils et leur gentillesse lors de mes passages à l'INRA d'Auzeville.

A Ali SALEM,
Pour nos années de thèse côte à côte. Bonne continuation en Syrie !

A Quentin PAGE,
Pour son aide, sa bonne humeur et son enthousiasme Je garde un très bon souvenir de ton passage au service de Parasitologie.

A Vincent BOURRET,
Que de chemin parcouru depuis les bancs de la prépa ! Merci pour tes conseils, ton aide et ton inébranlable bonne humeur !

A Cécile Senmartin,
Pour ton aide lors de ton passage à l'Animalerie, ta gentillesse et ta disponiblité.

A Patrick Roques,
Pour ta disponibilité et ton soutien, toujours dans le rire et la bonne humeur !

A Christiane ESPIE et Jean-Paul BERGEAUD,
Pour leur soutien et leurs encouragements.

A mes parents, pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises, pour tout votre amour, votre générosité, votre infinie patience et pour m'avoir toujours soutenue dans chacun de mes choix. Je vous dédie cette thèse.

A ma sœur, qui m'a toujours soutenue. Tu es pour moi un modèle de courage et de détermination.

A mon Oncle et ma Tante, pour leur amour et leur soutien.

A Elise, ma cousine, ma petite sœur, vraie bourrasque d'énergie positive. A ton inégalable rire et ton soutien sans faille. Merci d'avoir toujours été présente.

A toute ma famille.

A Justine. Les amis d'enfance sont ceux avec qui la complicité est telle qu'un regard suffit pour tout exprimer. A nos bientôt 30 ans d'amitié sans faille! A ton mini coco Ernestine dont tu peux être plus que fière.

A Christelle, pour ton amitié précieuse, ton soutien, tes encouragements, tes conseils…je m'arrête là car la liste exhaustive de tout ce que tu m'apportes pourrait augmenter considérablement le volume de cette thèse. Merci ! A Arnaud, pour m'avoir toujours fait sentir comme faisant partie de votre famille. Aux minis Loulous, Lucie et Baptiste, pour m'avoir toujours réservé un accueil hors du commun !

A mes amies Agnès, Elsa, Marie, Angie, Sabrina, Emilie, Valérie et Delphine, réparties maintenant aux quatre coins de la France, mais lorsque l'on se retrouve c'est comme si on s'était quittées la veille.

A Marine, wonderwoman et colloc en or. A ton optimisme et ta positivité. Merci de ton aide et de ton soutien.

A Fofie, merci pour tous tes conseils, ton amitié et ton incroyable moussaka !

A Brigitte, une femme incroyable que j'admire et dont je suis fière d'être l'amie.

A Lucie, ma colloc de we, à toutes les fois où on a refait le monde autour d'une tisane à l'artichaut… ta chambre est toujours disponible ! Batman se languit…

A ma jolie Capucine, à nos passionnantes discussions, à tes sages et judicieux conseils. Merci pour ton amitié précieuse.

A Claire, ma libertaire préférée.

A Achille, JP, Henry, Polo, Isa, Jeff…, mes familles du Fil à Plomb et des Saisons d'Etre. A nos we burgaliens, dalmatiesques, lisboètes, clownesques… et à tous ceux à venir. Merci de m'avoir toujours permis de garder le sourire. A Jean-Luc et Laurent, qui m'ont permis de participer à ces aventures humaines extraordinaires, à vos univers uniques et magiques. Un grand Merci.
Laurent, à quand notre troupe ?

Et enfin à celui qui me soutient, m'épaule, et me comprend mieux que quiconque.
A Vincenzo,
Parce que chaque jour à tes côtés est une nouvelle aventure.
You and me are meant to be. C'est sûr.

A Zoé, ma belle étoile

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I *Ctenocephalides felis* et *Ctenocephalides canis*. Morphologie, Biologie, Rôles pathogènes 7

1. Position systématique (Beaucournu et Launay, 1990 ; Beaucournu et Ménier, 1998) 9
2. Morphologie des adultes des deux espèces 10
3. Le cycle biologique 14
   - 3.1. Les oeufs 14
   - 3.2. Les larves 15
   - 3.3. Les nymphes 15
   - 3.4. L'imago 16
4. Biologie de l'imago 18
   - 4.1. Les hôtes et la survie sur l'hôte 18
     - 4.1.1. Les hôtes et la survie sur l'hôte de *C. felis* 18
     - **ARTICLE I** 20
     - 4.1.2. Les hôtes et la survie sur l'hôte de *C. canis* 26
   - 4.2. Le repas sanguin et l'émission de déjections. 26
5. Distribution géographique de *C. felis* et de *C. canis* 28
   - 5.1. *Ctenocephalides felis* 28
   - 5.2. *Ctenocephalides canis* 28
6. Importance médicale 29
   - 6.1. Rôle pathogène direct 29
     - 6.1.1. Spoliation sanguine 29
     - 6.1.2. La pulicose du chien et du chat 29
     - 6.1.3. La dermatite par allergie aux piqûres de puces (DAPP) 29
   - 6.2. Rôle pathogène indirect 30
     - 6.2.1. Vecteur d'helminthes 30
       - 6.2.1.1. *Dipylidium caninum* 30
       - 6.2.1.2 *Acanthocheilonema reconditum* 31
     - 6.2.2. Vecteur de virus 32
     - 6.2.3. Vecteur de bactéries 32
       - 6.2.3.1. *Mycoplasma* 32
       - 6.2.3.2. *Yersinia pestis* 33
       - 6.2.3.3. *Rickettsia* 35
         - 6.2.3.3.1. *Rickettsia typhi* 35
         - 6.2.3.3.2. *Rickettsia felis* 36
       - 6.2.3.4. *Bartonella* spp. 37

CHAPITRE II *Bartonella* spp. identifiées chez *C. felis* et *C. canis*. Synthèse bibliographique 39

1. *Bartonella* spp. isolées de *C. felis* et *C. canis* 41
   - 1.1. *C. felis* et *Bartonella* spp. 41
   - 1.2. *C. canis* et *Bartonella* spp. 41
2. Le chien et le chat, réservoirs de *Bartonella* spp. 45
3. Rôles pathogènes des bartonelles 46
   - 3.1 Invasion des érythrocytes chez le réservoir 46
   - 3.2. Stimulation de l'angiogenèse 47
4. Manifestations cliniques 48
   - 4.1. Chez le chat 48
     - 4.1.1. *Bartonella henselae* 48
     - 4.1.2. *Bartonella clarridgeiae* 49
     - 4.1.3. *Bartonella koehlerae* 49
     - 4.1.4. *Bartonella quintana* 50
   - 4.2. Chez le chien 50
     - 4.2.1. *Bartonella henselae* 50
     - 4.2.2. *Bartonella clarridgeiae* 51
     - 4.2.3. *Bartonella koehlerae* 51
     - 4.2.4. *Bartonella quintana* 51
   - 4.3. Chez l'homme 52

4.3.1. *Bartonella henselae* ... 52
4.3.1.1. Maladie des griffes du chat ... 52
4.3.1.2. Endocardites ... 53
4.3.1.3. Angiomatose bacillaire et péliose viscérale ... 53
4.3.1.4. Formes atypiques d'une infection à Bartonella henselae ... 54
4.3.2. *Bartonella clarridgeiae et Bartonella koehlerae* ... 55
4.3.3. *Bartonella quintana* ... 55
CHAPITRE III *C. felis*, vecteur de *Bartonella* spp. Travaux personnels ... 57
1.Contamination expérimentale de *C. felis* par *Bartonella* spp. ... 62
1.1.Élevage de puces ... 62
1.2.Gorgement artificiel sur nourrisseur à membrane et contamination des puces ... 62
1.3.Viabilité des bactéries dans les puces ou leurs fèces ... 64
2. **ARTICLE II** : survie chez *C. felis* de cinq espèces de *Bartonella* spp. au cours de 72 heures suivant un repas contaminant ... 65
3. **ARTICLE III** : survie de *B. henselae* suivant un repas contaminant chez *C. felis* ... 67
4. Localisation de *B. henselae* chez *C. felis* ... 78
4.1. Détection de *B. henselae* dans *C. felis* par histologie : apport méthodologique ... 78
4.2. Combinaison de la microdissection laser et de la PCR en temps réel ... 80
4.2.1. Intérêts ... 80
4.2.2. Matériel et Méthode ... 81
4.2.3. Résultats ... 83
4.2.4. Discussion ... 89
CHAPITRE IV Moyens de lutte contre les puces et prévention de la transmission de *Bartonella* spp. Synthèse bibliographique et Travaux personnels ... 91
1. Principaux produits utilisables dans la lutte contre les puces ... 93
1.1. Les insecticides neurotoxiques ... 93
1.2. Les régulateurs de croissance des insectes ... 98
1.2.1. Les analogues de l'hormone juvénile (ou juvénoïdes) ... 98
1.3.1.Les inhibiteurs de synthèse de la chitine ... 98
2. Évaluation de l'efficacité de produits destinés à la lutte contre les puces des carnivores ... 99
2.1. Détermination de l'efficacité d'insecticides dans le contrôle des puces des carnivores domestiques 99
2.1.1. Étude de l'efficacité de deux *spot-on* dans la lutte contre *C. canis* chez le chien. ... 101
ARTICLE IV ... 103
ARTICLE V ... 106
2.1.2. Étude de l'efficacité du formulation orale-on dans la lutte contre *C. felis* chez le chien. ... 101
ARTICLE VI ... 114
2.2. Détermination de l'efficacité d'un IGR dans le contrôle de l'évolution des œufs de puces chez le chien ... 119
ARTICLE VII ... 120
3. Prévention de la transmission de *Bartonella* spp. par un traitement insecticide : proposition d'un protocole. ... 126
ARTICLE VIII (en préparation) ... 130
DISCUSSION GENERALE ... 145
CONCLUSION ... 145
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES HORS PUBLICATIONS ... 155
ANNEXE ... 203

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique des interactions possibles entre les différents acteurs étudiés dans notre thèse et les deux axes de recherches choisis. 4
Figure 2. *Ctenocephalides felis* adulte 12
Figure 3. *Ctenocephalides canis* adulte 12
Figure 4. Principaux critères de diagnose entre *C. felis* et *C. canis* 13
Figure 5. Cycle biologique de *C. felis* et *C. canis*. 17
Figure 6. Invasion des érythrocytes par *Bartonella* spp. chez un hôte réservoir 47
Figure 7. Lésions rencontrées lors d'infection à *B. henselae*. 53
Figure 8. Angiomatose bacillaire lors d'infection à *B. quintana* chez un patient atteint de leucémie chronique. 56
Figure 9. Système de gorgement des puces sur nourrisseur à membrane. 63
Figure 10. Cytopsin de sang contaminé par *B. henselae* 79
Figure 11. *Ctenocephalides felis* femelle gorgée 84
Figure 12. *Ctenocephalides felis* mâle 84
Figure 13. Proventricule et intestin moyen d'une puce *C. felis* gorgée 85
Figure 14. Abdomen d'une puce *C. felis* mâle gorgée 85
Figure 15. Abdomen d'une puce *C. felis* femelle gorgée 86
Figure 16. Abdomen d'une puce *C. felis* femelle gravide 86
Figure 17. Système nerveux central de *C. felis* 87
Figure 18. Système respiratoire de *C. felis* 87
Figure 19. Hébergement des deux groupes de chats inclus dans l'étude. 127
Figure 20. Résultats de PCR, de culture et de sérologie des 6 chats SPF de la section 2 inoculés par voie intradermique par une suspension de *B. henselae* à J0. 128
Figure 21. Nombre moyen de puces retrouvées sur les chats des sections 1 et 2 tout au long de l'étude. 129

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Espèces de *Bartonella* identifiées dans *C. felis* et *C. canis* lors d'enquêtes épidémiologiques 42

Tableau 2. Valeurs minimales, maximales et moyennes des Ct obtenus par amplification de l'ADN ribosomique 18S de *C. felis* issu des organes microdisséqués de 20 puces au cours des 12 jours de suivi. 88

Tableau 3. Chronologie des activités effectuées lors de l'évaluation en laboratoire de l'efficacité insecticide adulticide d'une formulation anti-puce à visée curative et/ou préventive. 100

INTRODUCTION

Les puces sont des insectes aptères dont le corps aplati latéralement mesure entre 1.5 et 4 mm de long. La troisième paire de pattes est adaptée au saut et les pièces buccales sont de type piqueur. À l'état imaginal, les puces mâles et femelles sont hématophages stricts parasitant les mammifères ou les oiseaux. Certaines espèces sont des parasites permanents et passent leur vie adulte sur leur hôte. D'autres sont des parasites temporaires et sont trouvés dans les nids ou les litières, ne parasitant leur hôte qu'au moment du repas. Les puces appartiennent à l'ordre des Siphonaptères qui compte actuellement 15 familles, 238 genres et plus de 2380 espèces. Elles sont présentes dans le monde entier y compris l'Antarctique (Beaucournu et Launay, 1990 ; Beaucournu et Ménier, 1998).

Les puces ayant une importance médicale et vétérinaire appartiennent aux familles des *Pulicidae*, comprenant les genres *Pulex*, *Ctenocephalides*, *Spilopsyllus*, *Echidnophaga*, *Archaeopsylla, Tunga et Xenospylla* ou des *Ceratophyllidae*, comprenant les genres *Ceratophyllus* et *Nosopsyllus*. Certaines espèces sont vectrices de maladies graves comme la peste bubonique, le typhus murin ou encore la maladie des griffes du chat (Bacot et Martin, 1914 ; Chomel et al., 1996 ; Eisen et Gage, 2012). Le genre *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930 présente un intérêt médico-vétérinaire particulier, notamment en ce qui concerne les espèces synantropes, c'est-à-dire vivant dans l'environnement de l'homme, comme *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) et *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) (Ménier et Beaucournu, 1998). Ce sont les espèces de puces les plus largement retrouvées sur les carnivores domestiques à travers le monde (Dobler et Pfeffer, 2011 ; Traversa, 2013). Elles causent des désagréments importants aux animaux et à leur propriétaire par leurs piqûres, et elles sont responsables de troubles dermatologiques importants chez les animaux, comme la Dermatite Allergique par Piqûre de Puce (DAPP). Les troubles causés par les puces représentent plus de 50 % des pathologies rencontrées en dermatologie vétérinaire, et une des principales causes de consultation chez un vétérinaire (Guaguère et Prélaud, 2005). Ainsi, le contrôle des puces est indispensable, et les dépenses annuelles consacrées aux produits anti-puces ont été estimées à plus de 1 billion de dollars aux États-Unis (Krämer et Mencke ; 2001). A lui seul, le marché des produits des antiparasitaires externes a été estimé à plus de 3,7 billions d'euros, soit 30% du marché des produis pour animaux de compagnie (Krämer et Mencke, 2001). La lutte contre les puces des carnivores domestiques représente donc une importance économique notable exploitée par de nombreux industriels.

Outre les nuisances qu'elles provoquent, les puces *C. felis* et *C. canis* ont un rôle pathogène indirect : elles sont hôtes intermédiaires d'un cestode *Dipylidium caninum* (Gueman, 1984) et d'une filaire *Acanthocheilonema reconditum* (Pennington et Phelps, 1969), tous deux

zoonotiques (Hyunh et al., 2001 ; Adam et al., 2012). Elles sont des vecteurs reconnus de bactéries zoonotiques comme *Rickettsia felis* (Wedicamp et Foil, 2002), agent de la rickettiose boutonneuse à puces, et secondairement de *Rickettsia typhi* (Nogueras et al., 2013a), agent du typhus murin. *Ctenocephalides felis* est le vecteur principal de *Bartonella henselae* (Chomel et al., 1996), agent de zoonose responsable chez l'homme de la Maladie des Griffes du Chat (MGC). La MGC a été décrite pour la première fois en France par Debré et al. (1950) il y a plus de 60 ans. L'identification de l'agent étiologique a été plus tardive et n'est survenue que 40 ans plus tard (Regnery et al., 1992). Cette maladie est aujourd'hui décrite dans le monde entier. Plus de 24 000 cas sont dénombrés chaque année aux États-Unis, dont 10 % nécessitent une hospitalisation. Le coût annuel des soins est estimé à plus de 12 millions de dollars (Jackson et al., 1993 ; Skerget al., 2003). L'incidence annuelle de cette maladie est estimée respectivement à 10 000 cas par an au Japon, et à 2 000 cas (soit 12,5 cas pour 100 000 personnes) aux Pays-Bas (Bergmans et al., 1997 ; Murakami et al., 2002). Plus généralement, des milliers de cas sont rapportés annuellement en Europe (Boulouis et al., 2005)

Notre travail de thèse divisé en quatre chapitres est représenté schématiquement par la Figure 1.

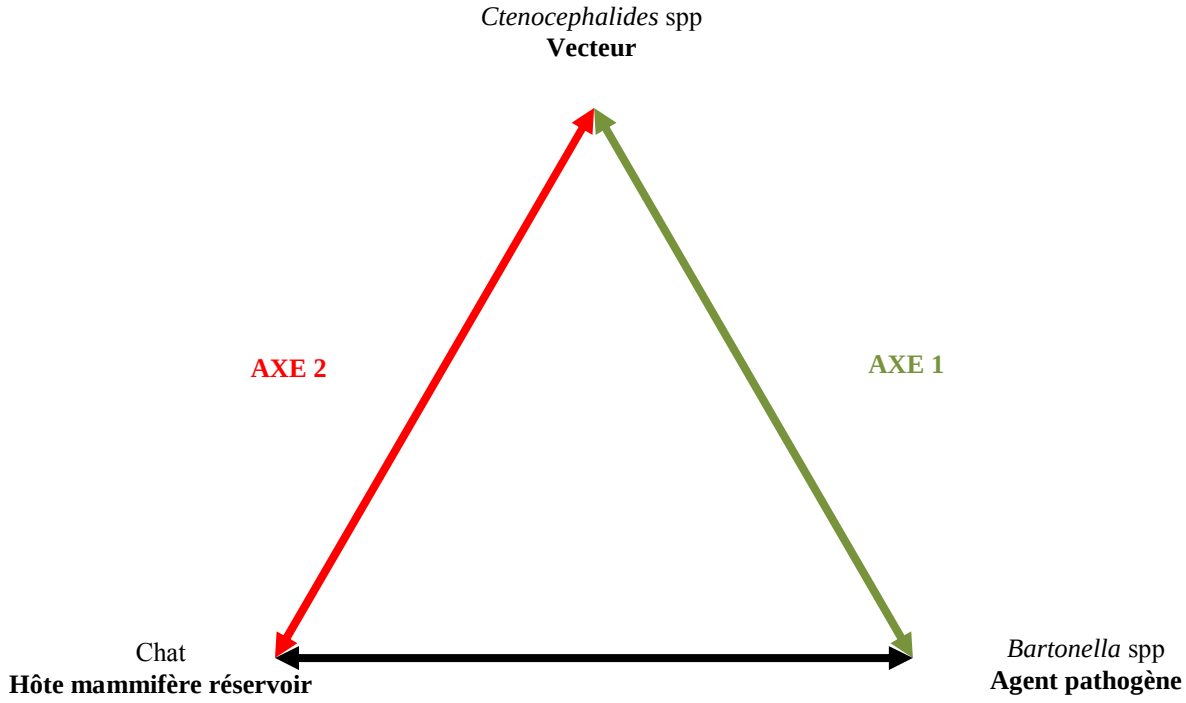


Figure 1. Représentation schématique des interactions possibles entre les différents acteurs étudiés dans notre thèse et les deux axes de recherches choisis.

Nous avons développé des travaux originaux uniquement autour de l'Axe 1, soit les interactions entre le vecteur et la bactérie, et de l'Axe 2, soit le contrôle des infestations de puces chez le chat. En effet, les chats sont les principaux réservoirs de *B. henselae* et la transmission entre chats se fait essentiellement par les puces. Les déjections de puces contaminées présentes sur les griffes seraient inoculées à l'homme lors de griffure. A l'heure actuelle, il n'existe aucun vaccin contre *B. henselae* et le contrôle des puces est la seule mesure de prévention connue de la transmission de cette bactérie entre chats et du chat à l'homme.

Le premier chapitre est essentiellement une synthèse bibliographique des connaissances actuelles concernant la morphologie, la biologie et l'importance médicale de *C. felis* et *C. canis*. Notre apport à la biologie est une étude sur la transmission de puces entre chats vivant en collectivité (Article I).

Le deuxième chapitre rapporte les espèces de *Bartonella* identifiées à ce jour chez *C. felis* et *C. canis*, ainsi que les principales manifestations cliniques dont elles sont responsables chez le chat, le chien et l'homme.

Le troisième chapitre (Axe 1) est consacré à nos travaux réalisés sur *C. felis* en tant que vecteur de différentes espèces de *Bartonella* spp., dont certaines comme *B. birtlesii* ou *B. tribocorum*, n'ont jamais été détectées chez cette espèce de puce ou une seule fois telle que *B. quintana* (Rolain et al., 2003). Un système de gorgement artificiel sur membrane nous a permis d'obtenir des puces sélectivement contaminées par ces différentes espèces de bartonelles dont *B. henselae*, et d'en étudier les capacités de persistance dans *C. felis* et dans ses déjections les jours suivant la contamination. Les possibilités de transmission verticale et horizontale ont également été étudiées (Articles II et III).

La lutte contre les puces est l'objet de notre quatrième et dernier chapitre (Axe 2). Nous y présentons le déroulement de plusieurs tests insecticides destinés à évaluer l'efficacité de différentes formulations contre *C. felis* ou *C. canis* (Articles IV à VII). Nous proposons un protocole original adapté à l'évaluation de l'efficacité de produits antiparasitaires dans la prophylaxie de *Bartonella* spp. chez le chat (Article VIII, en préparation).

Ce travail a fait l'objet de 7 publications et d'un article en préparation.

Article I
Franc M, **Bouhsira E**, Beugnet F.
Direct transmission of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) between cats exhibiting social behaviour.
Parasite. 2013; 20:49. Epub 2013 Dec 6.

Article II
Bouhsira E, Ferrandez Y, Liu M, Franc M, Boulouis HJ, Biville F.
Ctenocephalides felis an in vitro potential vector for five *Bartonella* species.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2013, 36, 2, 105-111.

Article III
Bouhsira E, Franc M, Boulouis HJ, Jacquiet P, Raymond-Letron I, Liénard E.
Assessment of persistence of *Bartonella henselae* in *Ctenocephalides felis*.
Appl. Environ. Microbiol. 2013, 79, 23, 7439-7444.

Article IV
Bouhsira E, Yoon SS, Roques M, Manavella C, Vermot S, Cramer LG, Ollagnier C, Franc M
Efficacy of fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination spot-on for dogs against adult dog fleas (*Ctenocephalides canis*, Curtis, 1826).
Vet. Parasitol., 2011, 179, 4, 351-353.

Article V
Liénard E, **Bouhsira E**, Jacquiet P, Warin S, Kaltsatos V, Franc M.
Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on on dogs against *Phlebotomus perniciosus* and *Ctenocephalides canis*.
Parasitol. Res. 2013, 112, 11, 3799-3805.

Article VI
Wolken S, Franc M, **Bouhsira E**, Wiseman S, Hayes B, Schnitzler B, Jacobs DE.
Evaluation of spinosad for the oral treatment and control of flea infestations on dogs in Europe.
Vet. Rec., 2012, 170, 4, 99.

Article VII
Bouhsira E, Lienard E, Jacquiet P, Warin S, Kaltsatos V, Baduel L, Franc M.
Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from cats to dogs.
Vet Parasitol., 2012, 190, 3-4, 541-346.

Article VIII (en preparation pour une soumission à Parasitology Research)
Bouhsira E, Franc M, Gandoin C, Bouillin C, Liénard E, Boulouis HJ.
Protocol assessing the efficacy of ectoparasiticidal products in the prevention of flea-borne pathogens: *Bartonella henselae* - *Ctenocephalides felis* - Cat model.

CHAPITRE I

Ctenocephalides felis et *Ctenocephalides canis*.

Morphologie, Biologie, Rôles pathogènes

Dans ce chapitre, nous rapportons les données bibliographiques concernant la morphologie, la biologie et l'importance médicale de deux espèces de puces les plus fréquemment rencontrées chez les carnivores domestiques : *Ctenocephalides felis* et *Ctenocephalides canis*. Les descriptions morphologiques et biologiques soulignent les principales différences entre ces deux espèces.

1. Position systématique (Beaucournu et Launay, 1990 ; Beaucournu et Ménier, 1998)

Embranchement : Arthropoda

Classe : Insecta

- Arthropode antennifère, mandibulate, corps divisé en 3 parties : tête, thorax et abdomen.
- Trois paires de pattes.
- Respiration trachéenne.

Ordre : Siphonaptère

- Insecte holométabole aptères, de petite taille (1-8 mm) à corps comprimé latéralement.
- Appareil buccal piqueur et pattes postérieures adaptées au saut.

Super-Famille : Pulicoidea

- Un seul épaississement sur la coxa II.
- Pas de *pseudosetae* (soie non implantée dans une cupule sensorielle) sous le collier du *mesonotum*.
- *Metanotum* et tergites abdominaux sans épines ou spicules marginales.
- Stigmates circulaires.
- Tergites abdominaux II-VII avec au plus une rangée de soies.
- *Sensilium* généralement avec 8 ou 14 trichobothries de chaque côté.
- Tibia III sans saillie apicale.

Famille : Pulicidae

- Face interne des coxae III avec courtes soies épineuses.
- Sensilium avec, en général, 14 trichobothries de chaque côté.

Sous-famille : Archaepsyllinae

- Massue antennaire asymétrique : les segments de la base sont en partie soudés, le premier étant le plus foliacé.
- Épaississement pleural du mésothorax présent.
- Suture inter-antennaire ou *falx* bien sclérifiée.
- Vestiges d'une cténidie génale et/ou prothoracique.

Genre : *Ctenocephalides* Stiles et Collins, 1930

- Cténidie génale de 6 à 8 épines bien développées (quelquefois 1 à 3 épines seulement, mais placées près de l'angle oral).
- Cténidie prothoracique de plus de 12 épines

Ménier et Beaucournu (1998) précisent dans leur mise au point sur le genre *Ctenocephalides* qu'il regroupe actuellement 14 taxa. *C. orientis* et *C. damarensis* retrouvées respectivement en Asie et en Afrique, ont souvent été décrites comme sous-espèces du complexe *Felis*. Cependant, cette classification a été réfutée par certains auteurs (Vobis et al., 2004), et *C. orientis* et *C. damarensis* possèdent désormais le statut d'espèces. L'espèce *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835), d'origine africaine aurait été importée en Europe par les croisés, puis se serait répandue dans le monde via les migrations humaines (Beaucournu et Launay, 1990). Elle regroupe deux sous-espèces : *Ctenocephalides felis strongylus* (Jordan, 1925) présentes essentiellement en Afrique, et *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835), cosmopolite et principale sous-espèce présente en Europe (Beaucournu et Meunier, 1998).
Ce travail concerne la sous-espèce *C. felis felis* (que nous nommerons *C. felis* dans la suite du document) et l'espèce *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) fréquemment rencontrées en Europe.

2. Morphologie des adultes des deux espèces

C. felis et *C. canis* sont des insectes de couleur brun orangé à foncé. Leur corps comprimé latéralement et les épines du tégument inclinées d'avant en arrière facilitent leur déplacement dans le pelage de l'hôte (Beaucournu et Launay, 1990). L'adulte est constitué comme tous les insectes d'une tête, d'un thorax et d'un abdomen. La tête comporte les pièces buccales de type piqueur et une paire d'antennes courtes constituées de 3 segments. Le thorax dépourvu d'aile porte 3 paires de pattes, la troisième étant très développée et adaptée au saut (Figures 2 et 3). Les performances pour le saut présentent quelques différences entre les deux espèces. La longueur moyenne de saut est de 19,9 ± 9,07 cm pour *C. felis* et de 30,4 ± 9,1 cm pour *C.*

canis. La hauteur moyenne de saut est de 13,2 cm pour *C. felis* et de 15,5 cm pour *C. canis* (Cadiergues et al., 2000c).

La forme de la capsule céphalique constitue un des critères de diagnose entre *C. canis* et *C. felis*. Elle est très arrondie chez *C. canis* et allongée chez *C. felis*. Les mâles des deux espèces ont une courbure céphalique plus arrondie que les femelles (Figure 4), rendant parfois la diagnose d'espèce difficile entre mâles *C. felis* et *C. canis* lorsqu'elle est effectuée sur ce seul critère. *C. felis strongylus* présente également un front très arrondi, ce qui a été à l'origine de nombreuses confusions avec *C. canis* en Afrique où cette dernière espèce a probablement été sur identifiée (Beaucournu et Ménier, 1998).
Certains critères de diagnose doivent être utilisés avec précaution pour différencier *C. felis* et *C. canis*. En effet, dans une étude menée en Espagne, en Afrique du Sud, au Brésil et en Iran, les auteurs ont distingué quatre populations différentes de *C. felis* en se basant sur des critères morphologiques. Parmi ces populations, deux d'entre elles présentaient des caractéristiques de *C. canis* comme trois soies sur le métépisternum (Linardi et Santos, 2013 ; Marrugal et al., 2013). Dans une autre étude menée en France, en Italie et au Vietnam certaines populations de *C. canis* présentaient quant à elles deux ou quatre soies sur le métépisternum. Ainsi, la chétotaxie du métépisternum n'est pas reconnue comme un critère de diagnose fiable par ces auteurs. Il est donc conseillé d'utiliser tous les critères de diagnose connus pour différencier ces deux espèces.
Peu d'études moléculaires ont été menées pour différencier ces espèces. La comparaison des régions ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer) ont montré 100 % d'homologie entre des populations de puces *C. felis* prélevées dans différentes zones géographiques (Allemagne, Australie, Afrique du Sud) (Vobis et al., 2004), ainsi que parmi des populations morphologiquement différentes. De même, une importante variabilité interspécifique a été mis en évidence entre *C. felis* et *C. canis* (Marrugal et al., 2013). L'étude des séquences ITS constitue donc un outil efficace pour comparer ces deux espèces.

Les principaux critères de diagnose sont présentés dans la Figure 4.

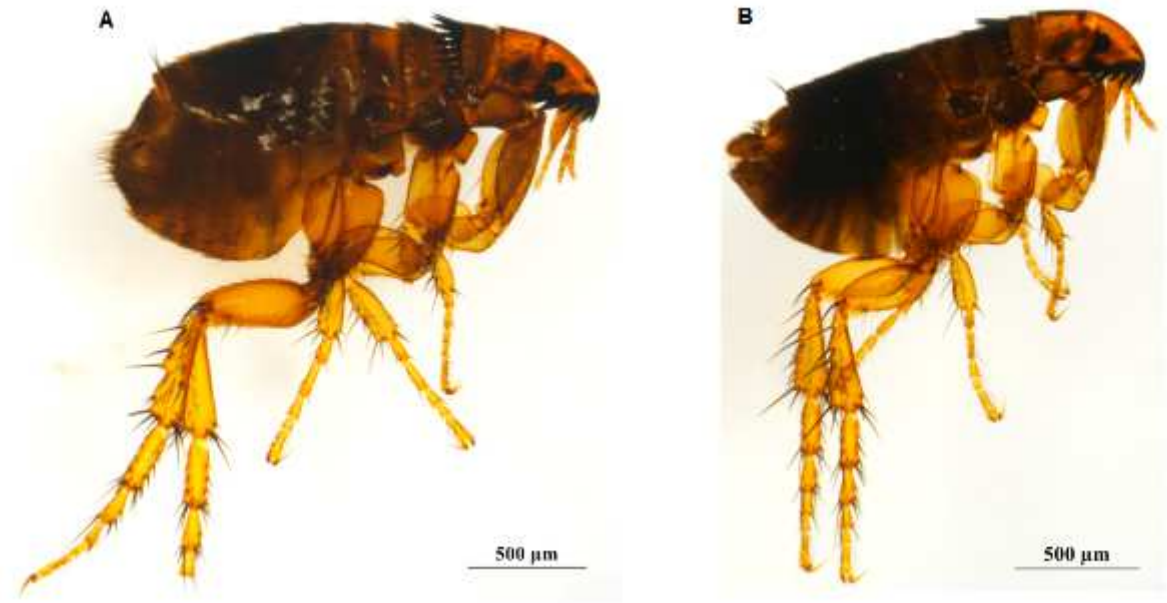


Figure 2. *Ctenocephalides felis* adulte (photographies originales)
(A) *C. felis* femelle (2.5 à 3.2 mm de long), (B) *C. felis* mâle (1.5 à 2.3 mm).

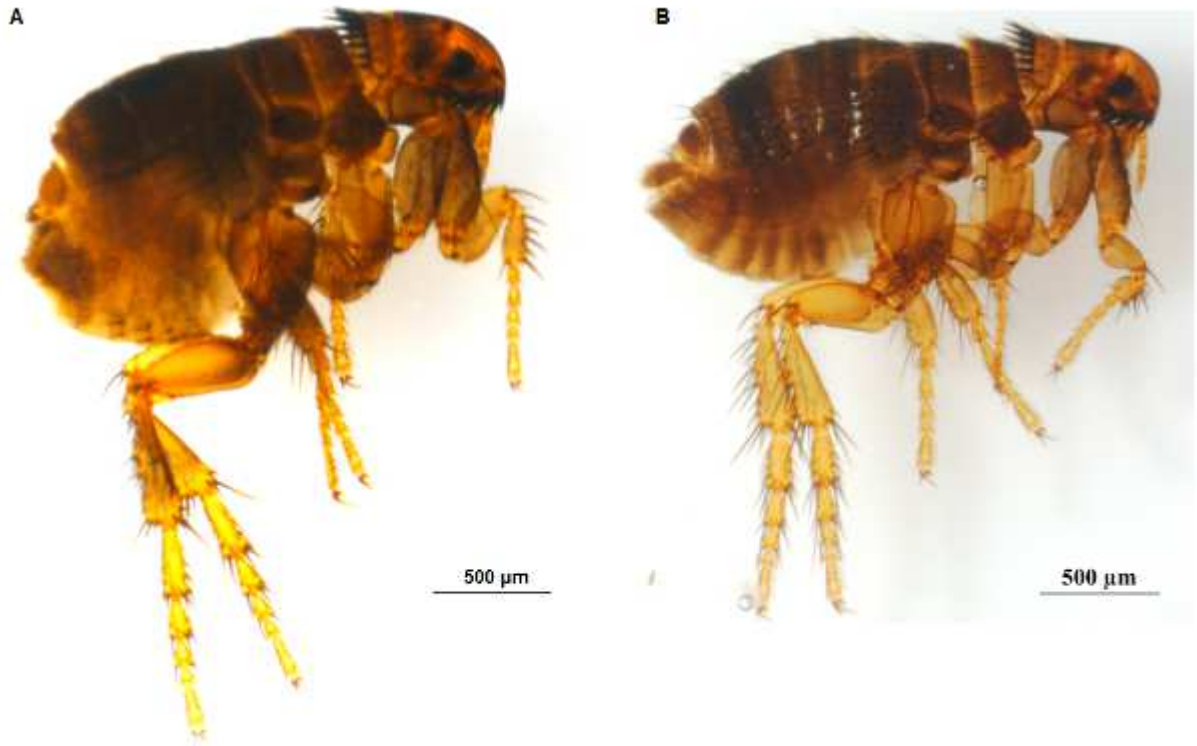


Figure 3. *Ctenocephalides canis* adulte (photographies originales)
(A) *C. canis* femelle (2 à 5 mm de long), (B) *C. canis* mâle (2 à 3 mm de long).

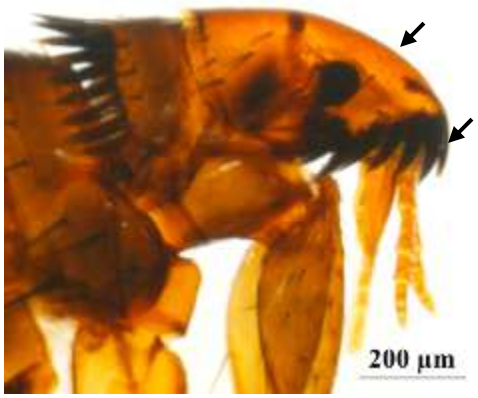
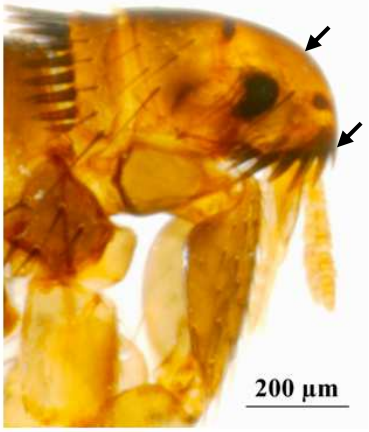
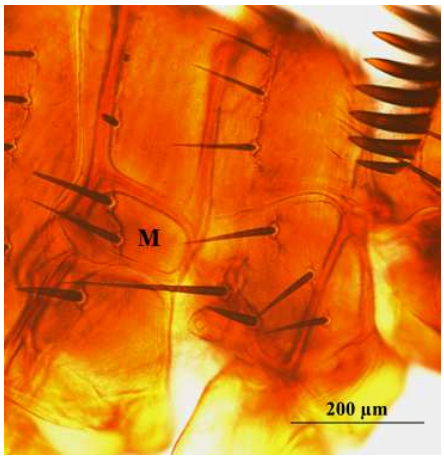
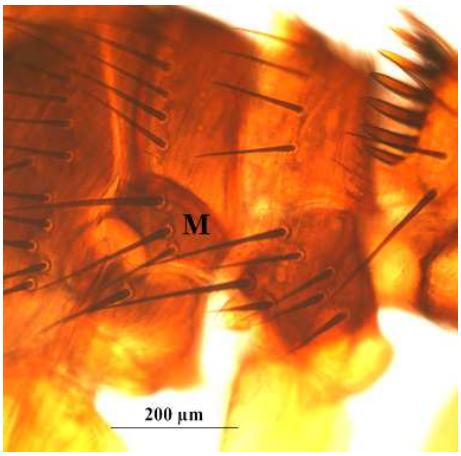
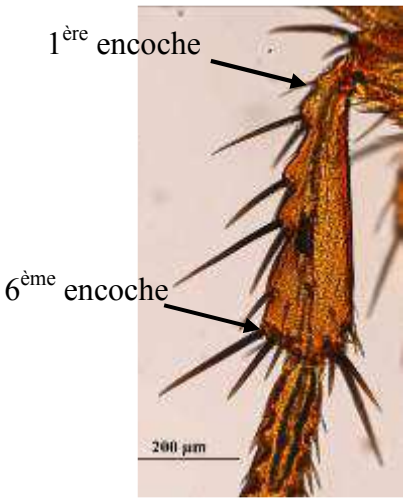
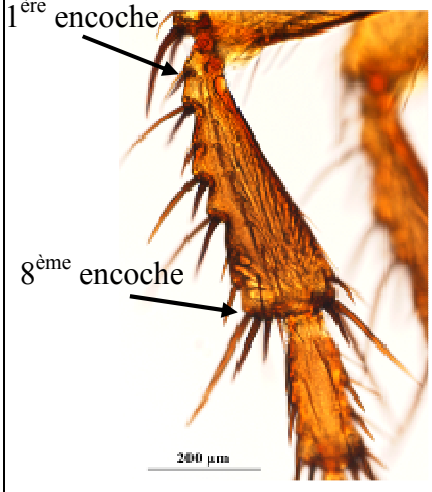
Morphologie	*C. felis*	*C. canis*
Tête et cténidie génale	 Front long et oblique Deux premières épines de le cténidie génale de longueur équivalente	 Front arrondi Première épine de la cténidie génale 2 fois plus courte que la 2ème et la 3ème
Metepisternum	 2 soies	 3 soies
Face externe des tibias	 5 à 6 encoches	 7 à 8 encoches

Figure 4. Principaux critères de diagnose entre *C. felis* et *C. canis* (photographies originales)

3. Le cycle biologique

C. canis et C. felis sont, comme toutes les puces, des insectes holométaboles qui accomplissent leur cycle de l'œuf à l'adulte via trois stades larvaires et un stade nymphal (Figure 5). Les larves ont une morphologie et un mode de vie très différents de l'adulte.

Les adultes représentent seulement 5 % de la population d'un foyer et sont principalement retrouvés sur les hôtes ; l'environnement est essentiellement contaminé par les stades immatures : les œufs, les larves et les cocons contenant les puces adultes non-émergées. Les études comparées de la durée des cycles biologiques de *C. felis* et *C. canis* réalisés en laboratoire à 19 et 27 °C n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les deux espèces (Cadiergues, 2000a). La durée minimale de leur cycle est de 14 jours à 27 °C. Au sein d'un foyer, le cycle peut se dérouler en moyenne en trois à cinq semaines en fonction des conditions de température et d'humidité (Dryden et Rust, 1994). En l'absence de stimulation des cocons, le cycle peut durer jusqu'à six mois.

L'accouplement a lieu une fois le premier repas sanguin effectué et la ponte débute entre 24-48 h après ce dernier (Zakson-Aiken et al., 1996). Elle se poursuit jusqu'à la disparition des puces du pelage. Une femelle émet en moyenne entre 20 et 30 œufs par jour. Chez les espèces sédentaires comme *C. felis* et *C. canis*, l'accouplement et la ponte ont toujours lieu sur l'hôte (Dryden et Rust, 1994).

3.1. Les oeufs

Ils sont ovoïdes et de couleur blanchâtre. Les œufs de *C. canis* sont significativement plus longs et plus larges que ceux de *C. felis* : ils mesurent en moyenne 570,3 ± 27,6 µm de long et 364 ± 18,0 µm de large. Ceux de *C. felis* mesurent en moyenne 506,3 µm ± 24,0 de long et 333.2 ± 18,2 µm de large (Cadiergues, 2000a). Le chorion de l'œuf est relativement humide et prévient la chute immédiate du pelage ; mais il sèche rapidement et en deux heures, approximativement 60 % des œufs tombent dans l'environnement (Rust, 1992). Ils sont donc disséminés au gré des déplacements de l'hôte, et sont plus nombreux sur les lieux de couchage de l'animal infesté. L'éclosion peut avoir lieu en un à six jours, en fonction des conditions de température et d'humidité.

À 27 °C, les premières larves apparaissent en un jour pour *C. felis* et en 2 jours pour *C. canis*. L'essentiel des éclosions a lieu au troisième jour pour les deux espèces. À 19 °C, l'éclosion est plus tardive. Les premières larves apparaissent au troisième jour pour *C. felis* et au quatrième jour pour *C. canis*. À cette température, l'essentiel des éclosions a lieu autour des

quatrième et cinquième jours pour les deux espèces. Elles peuvent se poursuivre jusqu'au septième jour pour *C. felis* et huitième jour pour *C. canis* (Cadiergues, 2000a). Une exposition de 24 h à 3 °C est fatale pour 65 % des œufs (Dryden et Rust, 1994).

3.2. Les larves

À l'éclosion, elles sont allongées et de couleur claire, puis elles prennent rapidement une couleur sombre, liée à la présence de nourriture dans leur tube digestif. Elles sont apodes, dépourvues d'yeux et possèdent des pièces buccales de type broyeur. Elles fuient la lumière par mouvements de reptations, et ont tendance à se réfugier sous les plinthes, les meubles, les coussins, et à s'enfoncer entre les fibres de tapis ou de moquette. À l'extérieur, on les retrouve sous des feuilles, des branches… Elles cherchent à se protéger de la dessiccation à laquelle elles sont très sensibles. En effet, une humidité relative inférieure à 33 % leur est fatale (Silverman et al., 1981). Les larves mènent une vie libre et se nourrissent de matières organiques telles que des squames, des débris alimentaires et fécaux, ou des déjections de puces adultes riches en hémoglobine. C'est à ce stade que les larves de *C. felis* peuvent ingérer les embryophores d'un cestode du chien, *Dipylidium caninum* (Guzman, 1984). À la fin du troisième stade, les larves cessent de s'alimenter. Les trois stades larvaires ne diffèrent principalement que par leur taille : chez *C. felis*, la larve de premier stade mesure 0.5 à 1 mm de long, celle de deuxième stade 2 à 3 mm de long et celle de troisième stade environ 5 mm. La vie larvaire dure entre 10 et 20 jours (Franc, 1998a).

3.3. Les nymphes

Les larves de troisième stade (LIII) recherchent un lieu abrité pour y tisser leur cocon, une enveloppe mesurant entre 4 et 6 mm. Pour cela, elle file des fibres de soie produites par ses glandes salivaires ; cette toile soyeuse étant collante, des débris de l'environnement ou des grains de poussière s'y agglutinent les rendant difficilement visibles. Les cocons sont retrouvés sur le sol, dans la végétation, dans et sous les tapis, sous les meubles et sur les lieux de couchage des animaux. Dans le cocon, la larve se métamorphose en nymphe. Cette dernière présente une morphologie proche de celle de l'adulte : son corps est aplati latéralement, elle est pourvue de trois paires de pattes repliées contre le corps, les fémurs de la troisième paire de pattes sont très développés. La durée de ce stade varie de six à sept jours (à 27 °C et 70-80% d'humidité) jusqu'à six mois, en cas de conditions climatiques défavorables ou en l'absence de stimulations. Une puce adulte peut rester quiescente dans le cocon jusqu'à 140 jours à 11 °C et à 75 % d'humidité relative (Silverman et al., 1981). Le cocon semble

insensible aux insecticides. Il représente donc une forme de résistance qui doit être prise en compte lors de l'établissement d'un programme de lutte contre les puces. L'éclosion des imagos est essentiellement déclenchée par des trépidations, mais également par des variations de températures ou des dégagements de CO_2 (Beaucournu et Launay, 1990). Des lieux faiblement fréquentés peuvent donc héberger des nymphes immobiles dans leur cocon pendant un temps relativement long.

3.4. L'imago

En conditions expérimentales, les femelles des deux espèces émergent à partir du 15ème jour à 27 °C. Les mâles émergent à partir du 18ème jour pour *C. felis* et du 20ème jour pour *C. canis*. À 19 °C, l'émergence des femelles commence à partir du 26ème jour pour *C. felis* et du 30ème jour pour *C. canis*. À 19 °C, les premiers mâles *C. felis* éclosent à partir du 34ème jour et du 37ème jour pour *C. canis*.

Après émergence la recherche d'un hôte se fait activement. Plusieurs types de stimuli tels que la chaleur corporelle de l'hôte, les mouvements ou l'émission de dioxyde de carbone attirent l'imago. Une puce adulte nouvellement émergée peut survivre à jeun quelques jours dans l'environnement. La survie dépend alors des conditions de température et d'humidité. En conditions expérimentales, *C. canis* survit dans l'environnement significativement plus longtemps que *C. felis.* À jeun, le temps moyen de survie de 50 % de la population de *C. canis* est de 15,9 jours à 19 °C et de 9,0 jours à 27 °C. Dans les mêmes conditions, le temps moyen de survie de 50 % de la population de *C. felis* est de 11,7 jours à 19 °C et de 9,6 jours à 27 °C (Cadiergues, 2000a). Une fois gorgées, les puces survivent dans l'environnement significativement moins longtemps que lorsqu'elles sont à jeun. Un nouveau repas sanguin est alors nécessaire à leur survie (Hink et al., 1991 ; Dryden et Rust, 1994 ; Bitam et al., 2010). Une fois gorgées, le temps moyen de survie de 50 % de la population de puces *C. canis* dans l'environnement est de 7,9 jours à 19 °C et de 4,8 jours à 27 °C. Dans les mêmes conditions, le temps moyen de survie de 50 % de la population de *C. felis* est de 4,9 jours à 19 °C et de trois jours à 27 °C (Cadiergues, 2000a).

La biologie de l'imago est développée dans le paragraphe suivant.

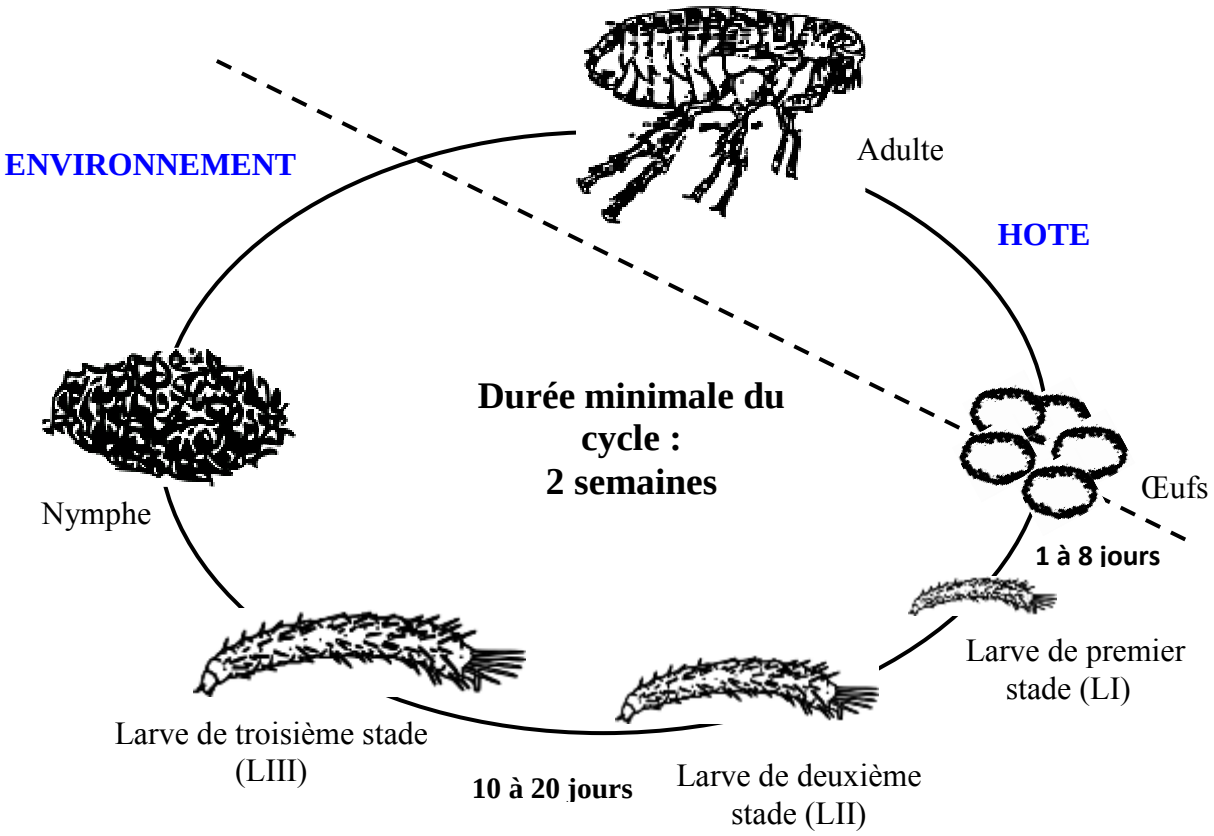


Figure 5. Cycle biologique de *C. felis* et *C. canis.*

4. Biologie de l'imago

4.1. Les hôtes et la survie sur l'hôte

Ctenocephalides felis et *Ctenocephalides canis* sont sédentaires sur leurs hôtes. Le spectre d'hôtes de *C. felis* est plus large que celui de *C. canis*.

4.1.1. Les hôtes et la survie sur l'hôte de *C. felis*

C. felis est l'espèce prédominante retrouvée sur les carnivores domestiques (Franc et al., 1998 b ; Durden et al., 2005 ; Beck et al., 2006 ; Bond et al., 2007). Sa spécificité d'hôte étant faible, elle peut être retrouvée sur d'autres animaux : petits ruminants, bovins, équins, porcins, primates, rongeurs, lagomorphes, volaille et également les opossums (El Bahrawy et al., 1993; Sorvillo et al., 1993 ; Pung et al., 1994 ; Ménier et al., 1997 ; Beaucournu et Ménier, 1998; Psaroulaki et al., 2006).

Cette espèce de puce est plus inféodée à un microclimat qu'à un hôte. Ainsi tous les mammifères vivant dans le même biotope sont susceptibles d'être parasités par *C. felis* (Bitam et al., 2010). Les chiens et les chats non traités sont source d'infestation pour d'autres animaux domestiques vivant dans le même foyer comme les lapins et les furets de compagnie (Hutchinson et al., 2001 ; Wenzel et al., 2008). La contamination de l'environnement se fait essentiellement par les œufs pondus sur l'hôte qui tombent sur le sol puis évoluent en larves et en adultes. Ainsi dans un foyer, les animaux s'infestent surtout par les adultes nouvellement émergés. Une fois sur leur hôte, la durée de survie des puces est limitée par les activités de toilettage de ce dernier, en particulier chez le chat. Elle est en moyenne de trois à quatre semaines, mais peut atteindre 113 jours sur chats onychectomisés et portant des collerettes (Dryden, 1989). Elle est de six à huit jours sur chats infestés en conditions naturelles (Hinkle et al., 1998). Après sept jours passés sur chats, seulement 25 % des puces déposées dans le pelage sont retrouvées ; ce taux chute à 17 % au neuvième jour. Sur chien, 25 % des puces déposées dans le pelage sont retrouvées au bout de six jours (Franc, 1998a).

La transmission directe entre individus est peu fréquente, et semble plus rare chez le chien que chez le chat (Franc et Cadiergues, 1997b). Chez ce dernier, il a été montré que jusqu'à 15 % des puces pouvaient être transférées entre deux individus vivant ensemble. Les femelles changent d'hôte significativement moins que les mâles (Dryden et Rust, 1994 ; Rust, 1994). Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus dans une étude récente dans laquelle nous nous sommes intéressés aux transferts directs de puces entre chats vivant en collectivité

(Article I). Pour cela six chats ont été infestés avec 100 puces et mis immédiatement en contact avec six chats non infestés. Le transfert de puces entre individus s'est effectué dans les 24 premières heures après infestation des chats donneurs : 1,2 % des puces ont été transférées au bout d'une heure, 6 % au bout de six heures, et 20 % au bout de 24 heures. Le taux de transfert augmente par la suite plus modérément et atteint 23 % en 48 heures. Dans une deuxième expérience, les six chats receveurs ont été mis en contact avec les chats donneurs qui avaient été préalablement infestés avec 100 puces 48 heures auparavant.

Après 24 heures, 3,8 % des puces ont été retrouvées sur les chats receveurs dont 67 % étaient des mâles. Dans ces conditions, toutes les puces retrouvées sur les chats receveurs étaient gorgées, et la majorité des puces femelles retrouvées contenait des œufs. Les puces matures sont donc plus sédentaires que les puces non gorgées et nouvellement émergées. Dans cette étude, nous avons montré que les puces peuvent changer rapidement d'hôtes ce qui peut jouer un rôle dans l'introduction rapide de nouvelles populations de puces dans l'environnement de chats, et dans la transmission d'éléments pathogènes. Bradbury et Lappin (2010) ont montré en effet montré que des transferts de puces entre deux groupes de chats s'accompagnaient d'une transmission de pathogènes comme *Bartonella henselae*.
Nos travaux sur les transferts de puces font l'objet de l'Article I présenté ci-après.

ARTICLE I

Parasite 2013, **20**, 49
© M. Franc et al., published by EDP Sciences, 2013
DOI: 10.1051/parasite/2013050

PARASITE
Available online at:
www.parasite-journal.org

RESEARCH ARTICLE OPEN ACCESS

Direct transmission of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) between cats exhibiting social behaviour

Michel Franc[1], Émilie Bouhsira[1], and Frédéric Beugnet[2,*]

[1] Université de Toulouse, INP, ENVT, F-3107 École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, 31079 Toulouse, France
[2] Merial, 29 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon, France

Received 13 August 2013, Accepted 27 November 2013, Published online 6 December 2013

Abstract – A study design was created to assess the potential for fleas to infest cats directly from other cats. In the first experiment, six cats were infested with 100 fleas each and then immediately put in contact with six flea-free cats for 24 h. After removal of all fleas the study was repeated and the contact between cats lasted 48 h. The total numbers of fleas recovered out of the 600 fleas deposited on the 6 donor cats after each infestation were 499 and 486 at 24 h and 48 h respectively. At 1 h post-contact, five fleas were found on the receiver cats, with three cats having one flea and one cat, two fleas. The number of fleas recovered on receiver cats increased towards the end of the study. At 24 h, 20% of the fleas were found on the receiver cats, and at 48 h, 23%. In a second experiment, the six flea-free cats were put in contact with the six donor cats which were each infested by 100 fleas 48 h before. Fewer fleas were found on the receiver cats (n = 15), representing 3.8% of all fleas recovered (n = 403). All the observed fleas had fed. The fleas collected on receiving cats comprised 10 males and 5 females, and 4 of the 5 females were engorged and contained eggs. The fleas collected on donor cats comprised 153 males and 235 females, they were all fed and all females contained eggs. This experiment demonstrated that gravid female fleas have a tendency to become permanently but not exclusively parasitic. Nevertheless, a few can change their cat host in as little as 1 h, which may play a role in the rapid introduction of a new flea population into a cat environment.

Key words: *Ctenocephalides felis felis*, Cat, Infestation, Biology.

Résumé – Transmission directe de la puce du chat (*Ctenocephalides felis*) entre chats ayant un comportement social. Une étude a été conçue pour évaluer la capacité des puces à infester directement des chats à partir d'autres chats. Dans un premier dispositif expérimental, six chats ont été infestés chacun par 100 puces et ont été mis immédiatement en contact avec 6 autres chats non infestés, pour une durée de 24 heures. Cette expérience a été renouvelée à l'identique mais en gardant les chats ensemble pendant 48 heures. Le nombre total de puces récupérées à partir des 600 puces déposées à l'origine sur les 6 chats donneurs a été de 499 à 24 heures et 486 à 48 heures. Une heure après contact, 5 puces ont été trouvées sur les chat receveurs, trois chats hébergeant une puce et un chat deux puces. Le nombre de puces récupérées sur les chats receveurs a augmenté tout au long de l'étude. A 24 heures, 20% des puces ont été retrouvées sur les chats receveurs, 23% à 48 heures. Dans une deuxième expérience, les 6 chats receveurs ont été mis en contact avec les chats donneurs qui avaient été préalablement infestés par 100 puces chacun, 48 heures avant. Très peu de puces ont été retrouvées sur les chats receveurs (n = 15), représentant 3,8% de la totalité des puces collectées (n = 403). Toutes les puces s'étaient nourries. Les puces collectées sur les chats receveurs comprenaient 10 mâles et 5 femelles, 4 des 5 femelles étaient gorgées et contenaient des œufs. Les puces collectées sur les chats donneurs comprenaient 153 mâles et 235 femelles, toutes les puces s'étaient nourries et toutes les femelles contenaient des oeufs. Cette étude a démontré que les puces gravides ont tendance à devenir des parasites permanents mais non exclusifs. Néanmoins, certaines peuvent changer d'hôtes en un temps aussi bref qu'une heure, ce qui peut jouer un rôle dans l'introduction rapide de nouvelles populations de puces dans l'environnement de chats.

*Corresponding author: frederic.beugnet@merial.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

The cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (Siphonaptera, Pulicidae) [1], is the most prevalent ectoparasite of cats in the world [8]. It is the cause of dermatological signs including pruritus, squamoseness, hairloss and the appearance of flea allergy dermatitis in some pets [7]. The cat flea is also a vector of several pathogens including *Bartonella henselae* and *Rickettsia felis*, and the intermediate host of the tapeworm *Dipylidium caninum* [3]. It is acknowledged that the main sources of cat fleas for pets are the newly emerged fleas present in the environment (households, gardens) [9, 12]. The pet's environment contains pre-emerged fleas in pupae. Following emergence stimuli, the new fleas hatch and need to find their host quickly. The females and males will take their first blood meal within 2 h and then 4–10 times per day. They mate during the first 24 h and the females will start to lay eggs within 24–48 h after having infested the host. They lay around 30 eggs per day during 2 weeks and they live for 2–3 weeks. The eggs fall off the host within 2–3 h. They hatch in a few days. Three larval stages will evolve within 10–14 days if temperature and humidity conditions are optimum and then finally form the pupae. The pupae are the resistant stage in the environment, they can survive for around 6 months waiting for a host [2, 7, 9]. It is accepted that the major source of new fleas comes from the emerging pupae present in the environment, nevertheless, taking into account the social contacts between cats, it can be hypothesised that the direct transfer of mature gravid fleas from one cat to another may not be negligible and could lead to the introduction of a new flea population in a cat's environment. This was firstly assessed by Rust in 1994 [10] on two cats with preliminary results demonstrating the possibility of flea movements between cats. The aim of this study was to better assess the rate of flea transmission between cats living together in an environment simulating natural behaviour, including feeding, sleeping and playing.

Materials and methods

This study was conducted in compliance with Good Scientific Practices in the Parasitology Contract Research Organization Facility of Toulouse Veterinary Faculty, approved by the French Agricultural Ministry and the European Medicinal Agency (Agreement C3155511), under the supervision of Professor Michel Franc (Agreement 31-08-555-04). Eighteen adult cats (>6 months) originated from the facility were first included in the study. These cats were European shorthair cats purchased from commercial research catteries (Charles River and Harlan NL). They were born between April 2002 and November 2009. They were identified by the last four numbers of their electronic microchip. All cats had a physical examination on Day-14 to ensure a healthy status. A complete combing lasting at least 7 min ensured that the cats were flea-free prior to initiation of the study.

On Day-14, the 18 cats were grouped in a 20 m^2 room simulating a natural environment, including games and resting areas in order to socialise them (Figure 1). The room was maintained under environmental controlled conditions: temperature 18–21 °C, ambient air exchanged 14 times per hour, lighting 12 h light/12 h dark; humidity was not controlled.



Figure 1. Experimental cat room.

Before the acclimation period, and before cats being introduced in the experimental rooms, all rooms were vacuumed and then cleaned out with hot water under pressure and hot steam. A delay of 1 week was respected before the introduction of cats. Then after the start of the study, the rooms were vacuumed and cleaned with water and soap and the litter trays changed every day.

On Day-10, all cats were infested with 100 *Ctenocephalides felis* adult fleas. The fleas used were *Ctenocephalides felis felis* belonging to the Toulouse Vet School laboratory strain. This strain was obtained from a laboratory-reared colony originating from a wild strain harvested from a cat and maintained on cats under laboratory conditions since 1990. The morphology of the fleas is regularly checked and confirmed to be *Ctenocephalides felis felis*. They have also been checked via quantitative molecular biology tools such as qPCR. DNA of *C. felis* is detected by amplification of a fragment of *C. felis* 18s rDNA derived from an available partial sequence of *C. felis* 18S rDNA in GenBank (Accession Number AF 136859).

The cats were observed carefully for 3 days to detect any excessive groomers or cats whose social attitude changed when they were infested with fleas (likely cats developing Flea Allergy Dermatitis), as well as any non-social cats.

On Day-7, all cats were flea-combed and 6 cats were removed, including the excessive groomers, non-social cats and cats with the lowest flea numbers. The 12 remaining cats were selected for the study. They were ranked by pair and allocated based on flea counts into group 1 and 2. The sex, age and hair length were not considered important for allocation purposes.

Finally two groups of six cats were obtained. The cats were not treated with ectoparasiticides or insect growth regulators (either topical or systemic) within 3 months of the start of the study.

Table 1. Schedule of the first experiment.

Study Day	Infestation	Event
Day 0	Flea infestation	Infest each cat from Group 1 with 100 (±5) *C. felis* fleas
		Put all cats (group 1 and group 2) in the room
+1 h		Comb and remove fleas from all group 2 cats, return the cats to the room
+6 h		Comb and remove fleas from all group 2 cats, return the cats to the room
+24 h (Day 1)		Comb and remove fleas from all cats (group 1 and 2), return the cats to the room
Day 2 (same week)	Second flea infestation	Re-infest each cat from group 1 with 100 (±5) fleas. Leave all cats in the room
+2 h		Comb and remove fleas from all group 2 cats, return the cats to the room
+12 h		Comb and remove fleas from all group 2 cats, return the cats to the room
+48 h (Day 6)		Comb and remove fleas from all cats (group 1 and 2)

Table 2. Schedule of the second experiment.

Study Day	Event
Day 0	Infest each cat of Group 1 with 100 (±5) *C. felis* fleas
	Put the cats together in the large room
Day 2 (48 h)	Introduce the six "receiver" flea-free cats (Group 2)
+1 h	Comb and remove fleas from group 2 cats, return the cats to the room
	Check the fleas to determine the number of males/females, feeding status and if the females contain eggs
+6 h	Comb and remove fleas from group 2 cats, return the cats to the room
	Look at the fleas to determine the number of males/females, if they are engorged and if the female contains eggs
+24 h (Day 3)	Comb and remove fleas from all cats (group 1 and 2)
	Look at the combed fleas to determine the number of males/females, if they are engorged and if the females contain eggs

Experiment 1 (Table 1)

The six cats in group 1 were each infested with 100 fleas on Day 0. The six cats in group 2 remained uninfested.

The cats in group 1 were placed in the experimental 20 m^2 room with space, games, resting areas and food (Figure 1). The six flea-free cats were introduced 15 min later into the room.

The group 2 cats were combed at 1 h, 6 h and 24 h, their fleas removed, and then the cats were placed back into the experimental room after each count. Twenty-four hours after the start, the fleas were also removed and counted from the cats in group 1.

The experiment was duplicated a second time during the same week. The room was cleaned and the cats were combed in order to ensure a flea-free status before the experiment started. The group 1 cats were again infested with 100 fleas each. The group 2 cats were mixed with them and then assessed for fleas at 2 h, 12 h and 48 h afterwards.

Experiment 2 (Table 2)

In the first experiment, the cats from group 1 were infested and then put together with the flea-free cats. Therefore the fleas were still young adult fleas, most probably fed, but still not gravid and not ready to lay eggs.

In the second experiment, the fleas were left on the infested cats for 48 h before introducing the six flea-free cats from group 2. Based on flea biology, it could be assumed that the female fleas would be fed and gravid. The majority of fleas bites had occurred between 40 min and 1 h after infesting their host [2, 9]. They reproduce during the first 24 h and start to lay eggs between 36 and 48 h after infestation [8].

The six cats from group 1 were infested with 100 fleas each on Day 0 while the six cats from group 2 remained uninfested. The group 1 cats were placed in the cleaned experimental room, offered space, games, resting areas and food. The six flea-free cats from group 2 were introduced into the room 48 h later.

The group 2 cats were checked for fleas 1 h, 6 h and 24 h after being introduced into the room. The fleas from the group 1 cats were also removed at the latest time point. All the removed fleas were observed microscopically in lactophenol to identify the sex (male versus female), feeding status (fed/unfed) and presence or absence of eggs.

Statistical analysis was done using Chi-square test.

Results

Experiment 1

Two successive flea infestations were done during the first week of the experiment to allow several time points to be used (Table 3). The total numbers of fleas recovered out of the 600 deposited on the six donor cats at each infestation were 499 and 486 at 24 h and 48 h respectively. This represents recovery rates of 83.12% at 24 h and 81% at 48 h.

At 1 h, five fleas were already found on the receiver cats, three cats having one flea and one cat having two fleas.

The number of fleas recovered from the receiver cats increased towards the end of the study (Table 3).

Table 3. Results of flea counts on cats in contact with cats infested by fleas 15 min previously.

		Groups	First flea infestation on donor cats			Second flea infestation on donor cats		
CAT ID	No. of fleas	Donor cats	1 h	6 h	24 h	2 h	12 h	48 h
3996	100	D	/	/	78	/	/	93
6533	100	D	/	/	57	/	/	82
2823	100	D	/	/	84	/	/	62
9165	100	D	/	/	65	/	/	53
6532	100	D	/	/	55	/	/	47
4117	100	D	/	/	60	/	/	38
		Sum	/	/	399	/	/	375
		Receiver cats	1 h	6 h	24 h	2 h	12 h	48 h
8261		R	2	5	15	4	5	14
7138		R	1	2	29	2	7	18
6502		R	1	4	21	3	5	20
4644		R	0	6	8	5	6	9
3812		R	0	0	1	2	6	10
6506		R	1	7	26	10	15	40
		Sum	5	24	100	26	44	111

At 2 h, all receiver cats were found to be flea infested. The difference in flea counts was not significantly different between the counts done at 24 and 48 h (Chi-square test).

At 24 h, 20% of the fleas were found on the receiver cats, 22.8% at 48 h, with a respective average of 16.7 and 18.5 fleas on receiver cats versus an average of 66.5 and 62.5 fleas on the donor cats at 24 h and 48 h.

Experiment 2

Out of the 600 fleas deposited on six cats, 403 fleas were recovered 3 days after infestation (67.16%), 388 on the donor cats and 15 on the naive cats. One hundred fleas from the infesting population were checked for sex ratio. The batch contained 58 females and 42 males, meaning a sex ratio F/M of 1.38.

Compared to experiment 1, a lower number of fleas was found on the receiver cats (n = 15) representing 3.7% of all fleas recovered (n = 405) (Table 4). All the observed fleas had fed. The collected fleas comprised 10 males and 5 females, and most interestingly four of the five females were engorged and contained eggs. This demonstrated the capacity of mature gravid fleas to infest new cats in as little as 24 h. The sex ratio in this group was 0.5.

Out of the 388 fleas recovered from the infested cats (group 2), 153 were male and 235 were female (sex ratio F/M = 1.53). All females were gravid.

The sex ratio in the originally infested cats was not significantly different at the time of infestation (1.58) and after 24 h (1.53). On the other hand, there was a significant difference at 24 h between the six donor cats (sex ratio = 1.53) and the six receiver cats (sex ratio = 0.5) ($p < 0.05$) indicating that male fleas were more likely to change their host than females.

Discussion

Cats usually display social behaviour when living in the same neighbourhood. They play and feed together, and of course also have skin contact during sexual activity. The first experiment aimed to prove that fleas could be transferred quickly and in a non-negligible percentage between cats with a similar lifestyle. These fleas were fed but not mature female fleas.

We demonstrated in the first experiment that within the first hour, fleas had already moved from infested cats to flea-free cats. The percentage of fleas having changed their host was at least 20% after one day. We did not assess movement between the infested cats, which could also have occurred. The decrease in the speed of transfer after 24 h may be due to several factors, including the increase of grooming behaviour in the infested cats but also the maturation of the fleas becoming engorged and gravid. This first experiment indicates that cats that have recently been infested and have contact with others facilitate the easy transfer of fleas.

In the second experiment all fleas matured on the infested cats before the contact phase with flea-free cats. The number of recovered fleas significantly decreased in the second experiment (403/600, 67.16%) compared to the first one (83.12% at 24 h) ($p < 0.05$). This is probably due to an increase in the grooming activity with time. A study conducted in 1998 showed that cats were able to groom and ingest up to 17.6% of their fleas each day, leading to a lifespan of about 8 days for a flea [8]. In our second experiment, the infestation of the introduced flea-free cats occurred as soon as 1 h after contact but at a lower rate than in the first experiment. It can be hypothesised that mature fleas have a greater tendency to be sedentary and to remain permanent parasites. This transfer of fleas was indirectly demonstrated by Bradbury and Lappin (2010) when studying the infections of cats by *Bartonella* [4]. In their study, the *Bartonella*-infected cats were placed in a cage and infested by fleas. Another group of cats was placed in a cage alongside. The cats could not have any contact but the meshed walls and the bottom of the cages allowed some passage for fleas. At the end of the trial, the naive cats were flea-infested and *Bartonella* positive. This design showed that fleas were able to fall off their host,

Table 4. Results of flea counts on cats in contact with cats infested by fleas 48 h previously.

		Groups	1 h	6 h	24 h	Total
CAT ID	No. of fleas	Donor cats				
3996	100	D	/	/	23 M 32 F	55
6533	100	D	/	/	21 M 48 F	69
2823	100	D	/	/	18 M 37 F	55
9165	100	D	/	/	31 M 30 F	61
6532	100	D	/	/	20 M 35 F	55
4117	100	D	/	/	40 M 53 F	93
		Sum	/	/	153 M 235 F	388
		Receiver cats				
8261		R	1 fed F	1 fed M	0	2
7138		R	1 fed M	1 fed M	1 fed F eggs	3
6502		R	1 fed F eggs	0	1 fed M	2
4644		R	1 fed M	1 fed M	1 fed M	3
3812		R	0	1 fed F eggs	0	2
6506		R	0	2 fed M	1 fed M 1 fed F eggs	3
		Sum	4	6	5	15

Fed/unfed; F = Female; M = Male; Eggs = presence of eggs inside female.

to walk on the floor or through the mesh and pass into the next cage. In a field study conducted in Tampa, Florida, Dryden et al. (2011) were able to collect fed fleas and mature female fleas in flea traps [5]. Thirty-four percent of the fleas found in traps were fed and 1.16% of those fed fleas were females containing eggs, demonstrating that mature fleas can be found on the floor. In his preliminary study using two cats and artificially coloured fleas, Rust demonstrated that interhost movement occurs and, similarly to our second experiment, that gravid female fleas move less than males [10]. He found that up to 15% of fleas may change their host which is close to what we observed in the first experiment.

In our study, the flea movement was probably direct, without passage in the environment, but this cannot be excluded. In the second experiment, all transferred fleas were found fed and almost all the females already contained eggs. Even if the rate of transfer was low in 24 h, it allowed mature males and females to infest new cats and to initiate a new flea population immediately. The comparison of the sex ratio between the groups indicated that males are more likely to change their host than mature females. Based on the known biology and the demonstrated role of newly emerged fleas as the main source of infestation, our study demonstrated that the direct infestation from cats to cats does exist and can be considered as a possible source of introduction in a new environment [10, 12]. This modality raises the importance of the use of a combination of insecticide and Insect Growth Regulator (IGR) on cats for the control of new flea infestations [2, 11]. In a situation where infestation by a gravid female flea occurs, its eggs would be laid before the death of the flea due to the adulticide, contrary to what is seen with new unfed fleas. The IGR would then ensure that the eggs were non-viable, blocking the evolution of those eggs and maintaining control of the environmental contamination, which has been shown by Franc et al. (2007) using a gravid flea infestation model [6].

Acknowledgements. This clinical study was funded by Merial S.A.S., 29 avenue Tony Garnier, 69007, Lyon, of which Frederic Beugnet is employee.

References

1. Beaucournu JC. 1990. Les Puces (Siphonaptera) de France et du Bassin méditérranéen occidental. Faune de France et régions limitrophes – 76. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris, 548 p.
2. Beugnet F, Franc M. 2012. Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. Trends in Parasitology, 28(7), 267–279.
3. Beugnet F, Marie JL. 2009. Emerging arthropod borne diseases of companion animals in Europe. Veterinary Parasitology, 163, 298–305.
4. Bradbury CA, Lappin MR. 2010. Evaluation of topical application of 10% imidacloprid – 1% moxidectin to prevent *Bartonella henselae* transmission from cat fleas. Journal of American Veterinary Medical Association, 236, 869–873.
5. Dryden M, Carithers D, McBride A, Riggs B, Smith L, Davenport J, Smith V, Payne P, Gross SJ. 2011. A comparison of flea control measurement methods for tracking flea populations in highly infested private residences in Tampa, FL following topical treatment of pets with Frontline Plus (Fipronil/(S)-methoprene). International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine, 9(4), 356–367.
6. Franc M, Beugnet F, Vermot S. 2007. Efficacy of fipronil-(S) methoprene on fleas, flea egg collection, and flea egg development following transplantation of gravid fleas onto treated cats. Veterinary Therapeutics, 8(4), 285–292.

7. Guaguère E, Beugnet F. 2008. Parasitic skin conditions in A Practical Guide to Canine Dermatology, Kalianxis, Paris, p. 179–226.
8. Hinkle NC, Koehler PG, Patterson RS. 1998. Host grooming efficiency for regulation of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) populations. Journal of Medical Entomology, 35(3), 266–269.
9. Krämer F, Mencke N. 2001. Flea Biology and Control. Springer, Berlin, 192 p.
10. Rust MK. 1994. Interhost movement of adult cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology, 31(3), 486–489.
11. Rust MK. 2005. Advances in the control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on cats and dogs. Trends in Parasitolology, 21(5), 232–236.
12. Rust MK, Dryden MW. 1997. The biology, ecology, and management of the cat flea. Annual Review of Entomology, 42, 451–473.

Cite this article as: Franc M, Bouhsira É & Beugnet F: Direct transmission of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) between cats exhibiting social behaviour. Parasite, 2013, **20**, 49.

PARASITE

An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.
All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
http://parasite.edmgr.com/

4.1.2. Les hôtes et la survie sur l'hôte de *C. canis*

C. canis présente un spectre d'hôtes beaucoup plus réduit que celui de *C. felis*. Cette espèce infeste principalement les canidés domestiques et sauvages. Le renard roux (*Vulpes vulpes*) semble être l'hôte primaire (Beaucournu et Launay, 1990 ; Doby et al., 1991 ; Schöffel et al., 1991). On la rencontre également chez le loup (*Canis lupus*), le chacal (*Canis aureus*) et accidentellement chez la fouine (*Martes foina*), le rat brun (*Rattus norvegicus*), le putois (*Mustela putorius*) et la panthère (*Panthera pardus*) (Beaucournu et Launay, 1990). Des infestations de petits ruminants ont également été décrites en Afrique (Obasaju et Otesile, 1980; Ugochukwu et Apeh, 1985) et au Bangladesh (Fueher et al., 2012). Ces observations sont à considérer avec précaution, car *C. canis* a souvent été confondue avec *C. felis strongylus*. Son hôte domestique habituel est le chien vivant généralement à l'extérieur et en altitude, en conditions dites semi-naturelles, comme les chiens de berger (Beaucournu et Launay, 1990 ; Franc et al., 1998b). Des études épidémiologiques ont montré que *C. canis* peut également être retrouvée sur chat, mais avec une prévalence nettement inférieure à celle de *C. felis* (Silaghi et al., 2012 ; Capari et al., 2013). En France, *C. canis* représente 0.5 % des puces retrouvées sur chats vivant à l'extérieur et ayant un comportement de chasse, (Cadiergues et al., 2000d). En Espagne, elle représente 1.1 % des espèces de puces retrouvées sur chats (Gracia et al., 2013). Au Mexique, 8 % des chats présentaient une co-infestation *C. felis* / *C. canis* (Cruz-Vazquez et al., 2001). Plus récemment, une autre étude menée au Mexique a montré une augmentation de cette prévalence à 33 % sur chats errants (Canto et al., 2013). Les chats peuvent donc servir d'hôtes à *C. canis* et des études menées en laboratoire ont montré que les œufs provenant de puces nourries sur chats sont viables. Cependant, la transformation de ces œufs en imagos se fait avec un rendement significativement plus faible que pour des œufs pondus par des *C. canis* femelles nourries sur chiens (Cadiergues, 2000a).

C. canis survit relativement longtemps sur chien. Après infestation, 45 % des puces sont retrouvées dans le pelage au bout de huit jours, et 25 % au bout d'un mois. Dans cette expérience, la survie d'une puce a même atteint 106 jours chez un chien. Elle semble persister plus longtemps sur son hôte que *C. felis*. Lors d'infestation mixte, le taux de persistance de *C. canis* est supérieur à celui de *C. felis* (Cadiergues, 2000a).

4.2. Le repas sanguin et l'émission de déjections.

Le repas sanguin a lieu plusieurs fois par jour. Il est indispensable à la maturation des ovaires et à l'initiation de la reproduction (Dryden et Rust, 1994). Deux études ont montré que les

repas sanguins de *C. felis* et de *C. canis* sont très précoces. La précocité du repas sanguin se définit comme le temps écoulé entre le dépôt de la puce sur son hôte et l'initiation du repas sanguin. Chez *C. felis*, 25 % des puces sont gorgées après cinq minutes de contact avec l'hôte ; au bout d'une heure, ce taux atteint 97 % (Cadiergues et al., 2000b). Chez *C. canis*, 21 % des puces ont commencé leur repas sanguin après 5 minutes de contact avec l'hôte ; au bout d'une heure, ce taux atteint 72 % (Cadiergues et al., 2001a). La précocité du repas est importante à connaître lorsqu'on met en place un protocole de lutte contre les puces. En effet, il est nécessaire de savoir si le produit utilisé est efficace avant que la puce n'ait le temps de piquer, donc d'inoculer de la salive responsable de phénomènes allergiques, notamment chez le chien, ou de la transmission d'éléments pathogènes. Le repas est en effet initié par l'injection de salive qui est suivie par l'aspiration de sang dans le canal alimentaire. La salive permet de faciliter l'absorption du sang grâce à une enzyme de type estérase, empêchant l'agrégation plaquettaire (Cheeseman et al., 2001), et à une hyaluronidase qui désorganiserait partiellement les tissus cutanés favorisant la pénétration des pièces buccales (Volfova et al., 2008). Récemment, le sialotranscriptome de *C. felis* a été analysé, mettant en évidence des peptides de petite taille qui auraient des propriétés anti-hémostatiques et anti-inflammatoires (Ribeiro et al., 2012).

Les femelles *C. felis* peuvent prendre jusqu'à 15 fois leur poids en sang et leur consommation journalière a été estimée à 13,6 µL (Dryden et Rust, 1994). Cette détermination peut se faire par pesée des puces avant et après repas sanguin, ou par marquage du sang de l'hôte à l'aide de radio-isotopes (^{51}Cr, ^{125}I), puis par détermination de la radioactivité totale des puces et de leurs déjections (Dryden et Gaafar, 1991). Plus récemment, une technique de PCR quantitative (quantitative Polymérase Chain Reaction), ciblant l'ADN de sang de chien dans la puce, a été utilisée pour quantifier la quantité de sang consommée lors du repas sanguin (Wang et al., 2012). Cette méthode a permis d'avoir accès aux données individuelles, et non à celles de pools d'individus. Le volume de sang éliminé dans les déjections n'étant pas pris en compte, cette étude rapporte les valeurs minimales de sang consommé. Après 15 minutes passées sur chien, les puces (mâles et femelles) ont consommé au minimum 1,1 nL de sang ; après une heure, la consommation minimale est de 100 nL.

Dans les huit à dix premières minutes après l'initiation du repas, les déjections sont émises de manière continue. Elles sont en forme de spirales et sont constituées de sang séché. Mâles et femelles émettent environ 0,77 mg de déjections par jour (Dryden et Rust, 1994). Après ingestion, les érythrocytes sont rapidement hémolysés et très peu digérés ; la

composition protéique des fèces est très proche de celle du sang de l'hôte (Vaughan et Azad, 1993; Silverman et Appel, 1994).

5. Distribution géographique de *C. felis* et de *C. canis*

5.1. *Ctenocephalides felis*

Originaire d'Afrique, elle est bien adaptée aux climats chauds. Sa répartition est cosmopolite, et elle est retrouvée aussi bien en zone urbaine qu'en zone rurale sur des animaux vivant à l'intérieur et à l'extérieur. C'est l'espèce de puce qui infeste majoritairement les carnivores domestiques dans de nombreux pays du monde comme l'Argentine, l'Australie, le Danemark, la France, l'Allemagne, l'Angleterre, l'Amérique du Sud, les États-Unis… (Wall et al., 1997 ; Franc et al., 1998b ; Durden et al., 2005 ; Dantas-Torres et al., 2009 ; Farkas et al., 2009 ; Tavassoli et al., 2010). Elle se rencontre toute l'année sur les animaux vivant en intérieur, car les conditions environnementales y sont favorables pour le déroulement du cycle biologique. Une abondance accrue est observée en période estivale (Beaucournu et Launay, 1990).

5.2. *Ctenocephalides canis*

C. canis est l'espèce prédominante retrouvée sur les chiens dans certains pays. C'est le cas de l'Albanie (Xhaxhiu et al., 2009), de l'Argentine (Gonzalez et al., 2004), du Brésil (Klimpel et al., 2010), du Chili (Alcaino et al., 2002), de la Corée (Chee et al., 2008), de la Grèce (Koutinas et al., 1995), de la Hongrie (Farkas et al., 2009), de l'Iran (Mosallanejad et al., 2012). Dans des études menées au Bangladesh et en Pologne, 100 % des puces récoltées sur chiens étaient *C. canis* (Rudzińska et Sulgostowska, 1996 ; Fuehrer et al., 2012). Dans les régions où *C. felis* est prédominante, *C. canis* peut être présente en proportion élevée : 12.5 % en Allemagne (Beck et al., 2006), 10 % en Espagne (Gracia et al., 2008), 11.2 % en France (Franc et al., 1998b), 20 % au Royaume-Uni (Bond et al., 2007) et 21 % aux États-Unis (Durden et al., 2005).

La répartition de *C. canis* au sein d'un pays varie selon les régions : elle se retrouve préférentiellement sur animaux vivant en extérieur et en zones rurales en altitude (Franc et al., 1998b ; Cadiergues, 2000a).

6. Importance médicale

Les puces sont des parasites causant de l'inconfort et une gêne chez leur hôte. Elles ont un rôle pathogène direct dû à l'inoculation de salive lors de la piqûre. Cette salive a des propriétés irritantes et est à l'origine de dermatoses, voire de phénomènes allergiques chez certains individus. Lors d'infestation massive, la spoliation sanguine cause des anémies et des déficiences en Fer. Les puces ont également un rôle pathogène indirect, car elles sont hôtes intermédiaires de parasites et vecteurs d'agents viraux et bactériens.

6.1. Rôle pathogène direct

6.1.1. Spoliation sanguine

Comme nous l'avons vu précédemment une puce adulte consomme en moyenne 13.6 µl de sang par jour. Ainsi lors d'infestation massive, la spoliation peut être à l'origine d'anémies chroniques ferriprives chez les chats, les chiens, les bovins et les petits ruminants (Obasaju et Otesile, 1980 ; Fagbemi, 1982 ; Yeruham et al., 1989 ; Dryden et al., 1993 ; Dryden et Rust, 1994 ; Ménier et al., 1997 ; Yao et al., 2006). En Israël, des anémies sévères ont été responsables de mortalité chez des veaux et des agneaux (Yeruham et al., 1989). En Afrique, et notamment en Côte d'Ivoire, *C. felis strongylus* a été responsable de mortalité importante dans les troupeaux d'élevage ovin (Yao et al., 2006).

6.1.2. La pulicose du chien et du chat

Elle désigne une infestation par des puces sans réaction d'hypersensibilité, ce qui explique que le prurit est presque toujours modéré. La lésion initiale est une piqûre isolée qui évolue rapidement en papule. Des papules et un léger squamosis sont observés en régions dorso-lombaire, périnéale et sur les cuisses. Secondairement, on observe une légère alopécie et, chez les chiens à pelage clair, une coloration jaunâtre du poil due au léchage répété (Prélaud, 1999 ; Bourdoiseau, 2000). L'intensité des symptômes est directement liée au degré d'infestation de l'animal.

6.1.3. La dermatite par allergie aux piqûres de puces (DAPP)

C'est la dermatose prurigineuse la plus fréquente chez les carnivores domestiques, notamment chez le chien, et une des premières causes de consultation chez un vétérinaire. Certains individus se sensibilisent à la suite d'expositions répétées aux piqûres de puces. Le prurit est alors très intense et son intensité est indépendante du nombre de puces présentes dans le pelage. Les zones prurigineuses se localisent le plus souvent à la base de la queue, puis

s'étendent en région dorsolombaire, en région périnéale, à la face postérieure des cuisses et à l'abdomen. Chez les chiens, les symptômes cutanés se caractérisent par de l'érythème, des papules, une alopécie, un squamosis, des croûtes et des excoriations auto-induites. Lors d'évolution chronique, ce tableau clinique peut s'aggraver par un syndrome de prolifération bactérienne, une pyodermite superficielle ou profonde. On observe plus tardivement une hyperpigmentation de la peau accompagnée d'une lichénification, souvent associée à une dermatite à Malassezia. La DAPP peut également se manifester sous la forme d'une dermatite pyotraumatique caractérisée par des lésions douloureuses, oedémateuses et exsudatives d'apparition brutale, le plus souvent sur la face externe des cuisses. Chez le chat, on observe une dermatite miliaire se traduisant par des petites lésions papulo-croûteuses, plus ou moins érosives ou ulcérées, localisées sur la ligne du dos, la face et le cou ou généralisées, pouvant s'accompagner d'alopécie. Plus rarement, on observe du prurit facial, des granulomes éosinophiliques, ou des plaques éosinophiliques. L'infestation par les puces est une des étiologies possibles du complexe granulome éosinophilique félin (Wilkerson et al., 2004 ; Guaguère et Prélaud, 2005).

6.2. Rôle pathogène indirect

Ce rôle réside dans la transmission d'agents pathogènes par les puces. *C. felis* et *C. canis* ont une importance reconnue en médecine vétérinaire et en médecine humaine. Ces deux espèces de puces transmettent des helminthes, des bactéries et potentiellement des virus.

6.2.1. Vecteur d'helminthes

6.2.1.1. Dipylidium caninum

C'est le cestode le plus fréquemment retrouvé chez le chat et le chien dans le monde entier. Il a pour hôtes intermédiaires les puces (*C. felis* et *C. canis*) (Guzman, 1984), et accessoirement les poux mallophages (*Trichodectes* spp.). Les chiens et les chats sont les hôtes définitifs. Le vers adulte présent dans l'intestin grêle émet des segments ovigères (ou proglottis) contenant des oeufs. Cette élimination a lieu durant la défécation ou en dehors de celle-ci. Dans le milieu extérieur, les proglottis se dessèchent et se désintègrent rapidement libérant les œufs. Les larves de puces en se nourrissant de débris organiques, ingèrent les œufs qui contiennent un embryon hexacanthe, ou oncosphère. Après ingestion par les larves de puces, les oncosphères à l'aide de leurs crochets et d'enzymes protéolytiques traversent la paroi digestive, gagnent la cavité générale où elles évoluent en métacestode, deuxième stade larvaire, pendant que la larve de puce évolue en nymphe puis en adulte. La maturation en

larves cysticercoïdes infestantes n'est complète que lorsque la puce adulte s'est gorgée. Le chien ou le chat s'infestent en ingérant la puce. Dans l'intestin grêle du carnivore, le scolex se dévagine et se fixe à la paroi du tube digestif. L'émission des segments ovigères commence dans les 2-3 semaines suivantes. La libération active des segments aux marges de l'anus en dehors de la défécation, est à l'origine de prurit et se traduit chez le chien par des mordillements de la région anale, ou par le signe du traîneau. Un engorgement des sacs anaux ainsi qu'une dermatite de la région périnéale sont parfois notés. De légers signes gastro-intestinaux peuvent être présents (Mani et Maguire, 2009 ; Beugnet et al., 2013).

D. caninum est un agent de zoonose. La dipylidiose est généralement décrite chez les enfants, mais peut exister chez les adultes (Adam et al., 2012). La contamination se fait par ingestion accidentelle d'une puce contenant des larves infestantes (Guzmann, 1984; Dobler et Pfeffer, 2011; Beugnet et al., 2013). L'infestation souvent asymptomatique peut s'accompagner de légères douleurs abdominales, de diarrhées et de démangeaisons péri-anales (Narasimham et al., 2013 ; Taylor et Zitzmann, 2011).

6.2.1.2 Acanthocheilonema reconditum

Cette filaire a pour vecteurs et hôtes intermédiaires plusieurs arthropodes hématophages comme les puces (*C. felis*, *C. canis*, *Pulex* spp.), et les poux (*Linognathus* spp.) (Pennington et Phelps, 1969 ; Anderson, 2000). Le chien est l'hôte définitif. La filaire adulte est peu pathogène pour le chien et se localise principalement dans le tissu sous-cutané des membres antérieurs et parfois du tronc et dans le tissu adipeux proche des reins. La filaire adulte pond des centaines de microfilaires par jour qui peuvent rester dans le tissu sous-cutané ou migrer dans la circulation générale. La puce adulte ingère ainsi des microfilaires circulantes lors du repas sanguin. Dans l'organisme de la puce, les microfilaires migrent dans les corps gras et y évoluent en larves de deuxième stade (LII) puis en larves infestantes de troisième stade (LIII) (Anderson, 2000). Par migration, les larves LIII parviendraient au canal salivaire et seraient inoculées lors de la piqûre. Chez l'hôte définitif ou un hôte accidentel, les LIII évoluent en LIV puis en LV et enfin en adultes, complétant ainsi leur cycle évolutif. Chez l'homme, une localisation oculaire des larves et des adultes est décrite. Les modalités de migration ne sont pas bien connues, mais les larves semblent suivre le nerf optique, ou bien être transportées jusqu'à l'œil par la circulation générale. Il n'est pas défini si la localisation oculaire est le résultat d'une migration préférentielle ou accidentelle. Une fois dans l'œil, les larves, mieux protégées de la réponse immunitaire de l'hôte, y termineraient leur cycle (Otranto et Eberhard, 2011; Brianti et al., 2012). Les parasites sont généralement retrouvés dans la chambre

antérieure de l'œil, sous la conjonctive et dans l'humeur vitrée pouvant provoquer une hyperhémie conjonctivale et un chémosis (Huynh et al., 2001 ; John et al., 2012).

6.2.2. Vecteur de virus

De nombreux virus sont vectorisés par les arthropodes hématophages, mais très peu semblent être transmis par les puces. Des auteurs se sont intéressés à la capacité vectorielle de *C. felis* pour deux virus très fréquemment rencontrés chez les chats : le virus de la leucémie féline (FeLV) et le calicivirus félin.

Des puces ont été gorgées artificiellement à l'aide d'un système de nourrisseurs à membrane avec du sang contaminé par le virus du FeLV. Le virus est détecté dans les puces pendant 30 heures à température ambiante et 115 heures à 4 °C. À température ambiante, il persiste au moins 15 jours dans les fèces. Les puces infectées peuvent contaminer du sang sain dans les 24 heures suivant le repas infectant (Vobis et al., 2003 ; Vobis et al., 2005). Le même dispositif a été utilisé avec du sang contaminé par le calicivirus félin. Le virus a été détecté dans les puces et les déjections dans lesquelles il reste infectant pendant huit jours à température ambiante. Les déjections ont été inoculées par voie intranasale à quatre chats Specific Pathogen Free (SPF). Tous les chats ont séroconverti et le virus a été isolé de leurs cavités nasales. Deux des quatre chats ont développé des signes cliniques. Des puces contaminées ont été placées sur quatre autres chats SPF. Un des chats a été infecté par cette voie (Mencke et al., 2009).

En conditions expérimentales, *C. felis* a la capacité vectorielle de transmettre le FeLV et le calicivirus félin par la piqûre et de l'excréter dans les déjections.

6.2.3. Vecteur de bactéries

Les puces transmettent des bactéries directement par inoculation lors de la piqûre, ou indirectement par contamination de lésions cutanées par des fèces infectées.

6.2.3.1. Mycoplasma

Les mycoplasmes hémotropes ou hémoplasmes (anciennement *Haemobartonella* et *Eperythrozoon* spp.) sont des bactéries épiérythrocytaires responsables d'anémies hémolytiques chez le chien et le chat. Les mycoplasmes hémotropes ont souvent été confondus à tort avec les bartonelles qui sont des bactéries intraérythrocytaires. Trois espèces infectent les chats sauvages et domestiques : *Mycoplasma haemofelis*, *Canditatus Mycoplasma turicensis* et *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (Sykes, 2010). Les

principales espèces infectant le chien sont *Mycoplasma haemocanis*, *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* et *Mycoplasma haemominutum* (Messick, 2003; Sykes et al., 2005; Willi et al., 2010). Le mode de transmission de ces bactéries n'a pas été clairement démontré et *C. felis* pourrait en être le vecteur. L'ADN de *M. haemofelis* et de *Candidatus Mycoplasma haemominutum* a été détecté dans *C. felis* prélevées sur des chats au Royaume-Uni et aux États-Unis, mais sans démonstration d'un rôle vecteur potentiel (Shaw et al., 2004 ; Lappin et al., 2006). Une étude menée aux États-Unis indique que 12,7 % des chats domestiques donneurs de sang étaient infectés par des mycoplasmes hémotropes félins et le taux d'infection était plus élevé chez les chats infestés par des puces (Hackett et al., 2006). Des études expérimentales se sont intéressées à la transmission de *M. haemofelis* et *Candidatus Mycoplasma haemominutum* par *C. felis*. Des puces gorgées sur chats bactériémiques ont été transférés sur six chats naïfs pendant cinq jours. Un seul des six chats a présenté une PCR positive de manière transitoire, sans signe clinique (Woods et al., 2005). Des puces et leurs déjections contaminées ne causent pas d'infection lorsqu'elles sont ingérées par des chats naïfs (Woods et al., 2006). *C. felis* semble avoir un faible rôle vecteur en conditions expérimentales. En conditions naturelles, le mode de contamination principal entre chats semblerait être direct et par morsures.

M. haemocanis aurait pour vecteur *Rhipicephalus sanguineus* (Seneviratna et al., 1973). En Europe, la séroprévalence de l'infection à mycoplasme chez les chiens est plus importante dans le bassin méditerranéen où la tique *R. sanguineus* est prédominante chez le chien (Novacco et al., 2010).

Les mycoplasmes sont des agents de zoonose. Récemment un cas de co-infection à *M. haematoparvum*, *Bartonella henselae* et *Anaplasma platys* a été rapporté chez une vétérinaire suite à de nombreux contacts avec des arthropodes hématophages (puces, tiques, moustiques, mouches…) et à des morsures par des chiens et de chats (Maggi et al., 2013).

6.2.3.2. Yersinia pestis

C'est une bactérie Gram négatif (Gram -). Elle est responsable de la peste, maladie des rongeurs transmissible à l'homme. Cette zoonose fait partie des maladies quarantenaires à déclaration obligatoire avec le typhus et le choléra. Cette bactérie est transmise par les puces.

La peste a été récemment reconnue comme maladie ré-émergente, et reste un problème de santé publique notamment en Afrique (Bertherat et al., 2005 ; Neerinckx et al., 2008 ; Neerinckx et al., 2010). Des foyers sont présents dans l'ouest des États-Unis, en Amérique du Sud (Brésil, Pérou, Equateur et Bolivie), en Algérie et en Asie. Elle est absente en Europe, en

Australie et en Antarctique (Ben Ari et al., 2008 ; Bitam et al., 2010). Le rôle vecteur des puces a été décrit pour la première fois en 1898 (Simond et al., 1998). Les puces comme *Xenopsylla* spp., *Nosopsyllus spp., Neopsylla spp., Citellophillus spp.* contribuent à la transmission de la bactérie parmi les rongeurs. *Pulex irritans* quant à elle jouerait un rôle important dans la transmission inter humaine (Perry et Fetherston, 1997 ; Laudisoit et al., 2007 ; Stenseth et al., 2008 ; Eisen et al., 2009). Les puces se contaminent lors du repas sanguin sur un hôte septicémique. Les bactéries ingérées restent localisées au canal alimentaire et ne sont pas transmises par voie transovarienne. (Stenseth et al., 2008 ; Bitam et al., 2010). Une étape clé de la transmission de *Y. pestis* est le blocage du proventricule de la puce, démontré pour la première fois en 1914 (Bacot et Martin). Les bacilles colonisent le proventricule où ils adhèrent à une matrice extracellulaire et s'y multiplient (Jarrett et al., 2004). Le bouchon bactérien ainsi formé obstrue plus ou moins complètement le proventricule empêchant la puce de prélever du sang correctement. Ainsi, les puces vont tenter de se nourrir infructueusement et à chaque tentative de piqûre, le sang ingéré est régurgité avec des bacilles. Les tentatives de piqûres se multiplient en différents points de l'hôte ou sur un autre hôte. Après le décès de l'hôte, sa température corporelle diminue rapidement poussant ainsi les puces à rechercher un nouvel hôte favorisant ainsi la dissémination de la maladie.

Les espèces de puces qui ne présentent pas ou peu de blocage du proventricule, comme *C. felis* et *C. canis* sont de mauvais vecteurs du bacille (Burroughs, 1947). Eisen et al. (2008) ont montré que *C. felis* infectée artificiellement pouvait transmettre *Y. pestis* à des souris. Cependant seulement 4 % des puces *C. felis* infectées ont transmis *Y. pestis*, contre 100 % des puces *Oropsylla montana* dans les mêmes conditions.

C. felis est l'espèce de puce prédominante retrouvée libre dans les habitations de régions où la peste est endémique. Son rôle de vecteur secondaire ne doit donc pas être négligé.

Les rats du genre *Rattus* (*Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*), souvent proches des habitations humaines, sont d'importants réservoirs de *Y. pestis*, notamment à Madagascar (Brouat et al., 2013). En Amérique du Nord (Etats-Unis), Amérique du Sud (Pérou, Bolivie, Brésil) et en Afrique du Nord, Afrique Centrale et Afrique du Sud, de nombreux petits rongeurs sauvages (*Cynomys gunnisoni*, *Mastomys natalensis, Microtus californicus*, *Otomys irroratus*, *Peromyscus maniculatus*…) sont également réservoirs (Mackenzie, 1972 ; Shepherd et al., 1983 ; Alonso, 1999 ; Davis et al., 2002 ; Lang , 2004 ; Stapp et al., 2008 ; Mulungu et al., 2013). En Asie, d'autres rongeurs jouent un rôle épidémiologique important en tant que réservoirs de *Y. pestis* : les gerbilles, notamment les espèces *Meriones persicus* et *M. libycus* en Iran (Esamaeli et al., 2013), *Meriones unguiculatus*, les écureuils mongols (*Citellus*

alaschanicus) et les marmottes (*Marmotta sibiricada*) en Mongolie (Fukushima et al., 2001 ; Galdan et al., 2010).

Dans les foyers naturels, la peste circule à bas bruits entre les rongeurs résistants selon le cycle rongeur-puce-rongeur. Lorsque le biotope de ces populations est perturbé (inondations, compétitions territoriales, irrigation, développement agricole…), les rencontres et les échanges de puces entre populations de rongeurs résistants et sensibles sont favorisées, ce qui déclenche des épizooties (Duplantier et al., 2005). *X. cheopis,* majoritairement responsable de la transmission du bacille, est peu spécifique, et peut infester les carnivores domestiques et accidentellement l'homme (Koutinas et al., 1995 ; Mosallanejad et al., 2012 ; Tavassoli et al., 2010 ; Dobler et Pfeffer, 2011). Les chats sont sensibles au bacille de la peste et peuvent être des réservoirs potentiels (Gage et al., 2000 ; Dobler et Pfeiffer, 2011). Chez les chiens, l'infection est généralement peu sévère (Orloski et Eidson, 1995). Ils peuvent être à l'origine de l'introduction du bacille de la peste par leurs ectoparasites contaminés dans l'environnement humain. Une corrélation positive a été montrée entre patients atteints de peste et patients dormant avec leurs chiens (Chomel et Sun, 2011). Une attention particulière doit donc être portée aux animaux domestiques et aux puces qu'ils véhiculent.

6.2.3.3. Rickettsia

Les rickettsies sont des bactéries Gram -, obligatoirement intracellulaires (Raoult et Roux, 1997). *C. felis* est vecteur de deux espèces de rickettsies agents de zoonose : *Rickettsia typhi* agent du typhus murin, et *Rickettsia felis* agent de la rickettiose boutonneuse à puces.

6.2.3.3.1. Rickettsia typhi

Cette bactérie est vectorisée par les puces de rongeurs, principalement *X. cheopis*, et secondairement par la puce du chat, *C. felis* (Noden et al., 1998 ; Psaroulaki et al., 2006 ; Abramowicz et al., 2012 ; Nogueras et al., 2013a). Les puces se contaminent en prenant un repas sur un hôte bactériémique. Elles restent infectées toute leur vie et la transmission à la descendance par voie transovarienne est possible, mais rare (Azad, 1990 ; Azad et al., 1992). Les rickettsies se multiplient dans le tube digestif et sont excrétées viables dans les fèces. L'infection d'un hôte et de l'homme en particulier se fait par contamination d'une plaie cutanée par les déjections (Azad et al., 1997; Civen et Ngo, 2008). Les réservoirs de cette bactérie sont essentiellement les rats du genre *Rattus*, principalement *R. rattus* et *R. norvegicus* (Azad et al., 1997 ; Duchemin et al., 2006). *R. typhi* peut être également transmise par *C. felis* et a pour réservoir les chiens, les chats et également les opossums (Azad, 1990 ;

Williams et al., 1992 ; Schriefer et al., 1994 ; Azad et al., 1997 ; Civen et Ngo, 2008 ; Abramowicz et al., 2012).

La séroprévalence de *R. typhi* chez les chats et les chiens est importante en Europe et aux États-Unis. En Espagne, 10 à 12 % des chiens et 16 % des chats présentent des anticorps anti-*R. typhi* (Lledo et al., 2003 ; Nogueras et al., 2009 ; Nogueras et al., 2013b). Aux États-Unis, le typhus murin est endémique dans certaines régions comme le Texas, la Californie et Hawaï (Liddell et Sparks, 2012). Lors d'enquêtes, 90 % des chats étaient séropositifs dans certaines régions de Californie (Sorvillo et al., 1993) et 44 % des chiens au Texas, lors d'une épidémie de typhus murin (Adjemian et al., 2010).

6.2.3.3.2. Rickettsia felis

C. felis est le vecteur principal de *R. felis*. L'ADN de cette bactérie a été également retrouvé chez d'autres arthropodes et d'autres espèces de puces dont *P. irritans* et *C. canis* (Parola et al., 2003 ; Rolain et al., 2005). Les puces se contaminent lors du repas sanguin, et les bactéries colonisent le proventricule et l'intestin moyen où elles se multiplient. Secondairement, elles se disséminent par l'hémocoele à d'autres organes, dont les glandes salivaires, les tissus reproducteurs et les organes excréteurs comme les tubes de Malpighi, l'intestin postérieur et l'ampoule rectale. Les bactéries sont détectées dans les puces et dans les fèces jusqu'à 28 jours après le repas contaminant (Reif et al., 2011 ; Thepparit et al., 2013). Les puces peuvent se contaminer entre elles lors d'un partage de repas sanguin, et transmettre les bactéries aux générations suivantes (Wedincamp et Foil, 2002 ; Hirunkanokpun et al., 2011). Des puces contaminées par *R. felis* transmettent la bactérie à des chats SPF (Wedincamp et Foil, 2000). La détection de cette bactérie dans les glandes salivaires de *C. felis* suggère une transmission possible lors de la piqûre (Macaluso et al., 2008).

En fonction des pays, la séroprévalence chez le chat varie de 4 à 100 % (Reif et Macaluso, 2009). Moins de données épidémiologiques sont disponibles chez le chien. En Espagne, la séroprévalence est de 16 % (Nogueras et al., 2009). En Australie, des études menées dans le territoire du Nord et dans le Sud-Est du Queensland rapportent une séroprévalence chez les chiens de 50.7% et une détection par PCR de *R. felis* chez 2.3 et 9% des chiens testés (Hii et al., 2011a, Hii et al., 2011b, Hii et al., 2013). Deux études menées en Allemagne et en Espagne ont montré que des cas humains de rickettiose boutonneuse étaient associés à des chiens séropositifs présents dans le foyer (Richter et al., 2002 ; Otéo et al., 2006). Le rôle des chiens et des chats en tant que réservoirs possibles de *R. felis* n'est cependant toujours pas confirmé.

La répartition géographique de *R.felis* est corrélée à celle de son vecteur principal, *C. felis*, elle est donc cosmopolite. L'ADN de *R. felis* est fréquemment retrouvé dans *C. felis* dans tous les pays du monde (Higgins et al., 1994 ; Marquez et al., 2002 ; Oliveira et al., 2002 ; Zavala-Velazquez et al., 2002 ; Kenny et al., 2003 ; Parola et al., 2003 ; Rolain et al., 2003b ; Kelly et al., 2005 ; Sackal et al., 2008 ; Bitam et al., 2010).

6.2.3.4. Bartonella spp.

Les bartonelles sont des petites bactéries Gram -, aérobies et facultativement intracellulaires. Elles appartiennent à la classe des alpha-protéobactéries et à la famille des *Bartonellaceae.* Actuellement, 26 espèces de bartonelles sont décrites (Kaiser et al., 2011), et chacune semble adaptée à un ou plusieurs mammifères réservoirs et à un arthropode hématophage vecteur (Tsai et al., 2011b). Les vecteurs compétents sont par exemple, *Lutzomyia verrucarum* pour *Bartonella bacilliformis* (Noguchi et Battistini, 1926), *Pediculus humanus corporis* pour *B. quintana* (Maurin et Raoult, 1996), *Ctenophthalmus nobilis* pour *Bartonella grahamii* et *Bartonella taylorii* (Bown et al., 2004) et *C. felis* pour *Bartonella henselae* (Chomel et al., 1996). L'ADN de *Bartonella* spp. a par ailleurs été détecté dans de nombreuses espèces d'arthropodes hématophages, dont d'autres espèces de puces comme *Pulex irritans* et *C. canis*, plusieurs espèces de tiques (*Dermacentor* spp., *Ixodes* spp., *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis* spp), certaines espèces d'hippobosques (*Lipoptena cervi*, *Lipoptena mazamae*) et de mouches piqueuses (*Haematobia* spp., *Stomoxys* spp.) (Chung et al., 2004 ; Dehio et al., 2004 ; Halos et al., 2004 ; Halos et al., 2005 ; Reeves et al., 2006 ; Sreter-Lancz et al., 2006 ; Podsially et al., 2007 ; Sun et al., 2008). La détection d'ADN de bartonelles chez ces arthropodes ne signifie pas qu'ils ont la capacité vectorielle de transmettre ces bactéries. A ce jour, seul le rôle vecteur d'*Ixodes ricinus* a été investigué pour *B. henselae* et *B. birtlesii* (Cotté et al., 2008 ; Reis et al., 2011). Les auteurs ont montré que des larves et des nymphes d'*I. ricinus* nourries avec du sang contenant *B. henselae* ou *B. birtlesii* transmettent les bactéries aux stades suivants. Les bactéries ont été détectées viables dans les glandes salivaires de nymphes et d'adultes issues de larves ou de nymphes contaminées. Les tiques ont également transmis des bactéries viables dans du sang sain sur lequel elles se sont gorgées. En conditions expérimentales, *I. ricinus* est donc un vecteur compétent de *B. henselae* et de *B. birtlesii.*

Ctenocephalides felis *et* C. canis *sont les deux espèces de puces majoritairement retrouvées chez les carnivores domestiques à travers le monde.* C. felis *a un spectre d'hôtes plus large que* C. canis*, et elle est aussi bien retrouvée sur des animaux vivant en appartement que vivant à l'extérieur.* C. canis *est habituellement retrouvée sur des chiens vivant à l'extérieur et en altitude. A l'état imaginal, ces puces sont sédentaires sur leur hôte, et dans l'heure qui suit l'introduction sur le pelage, la quasi-totalité des puces est gorgée. Le cycle biologique peut s'effectuer en deux semaines en conditions optimales de température et d'humidité. Les cocons constituent des formes de résistance qui peuvent contribuer au maintien de l'infestation dans un foyer pendant au moins six mois. Nous avons montré que chez des chats vivant en collectivité, des transferts de puces peuvent avoir lieu et qu'ils s'effectuent dans la première heure de mise en contact entre animaux infestés et animaux non infestés. Ce transfert rapide de puces peut être à l'origine d'une contamination rapide d'un foyer, et également du transfert de pathogènes entre individus. Les puces sont responsables de nuisances pour les carnivores domestiques et à l'origine de réactions allergiques (DAPP) notamment chez le chien. Elles sont également hôtes intermédiaires d'un cestode, D. caninum et d'une filaire* A. reconditum*, tous deux transmissibles à l'homme. Elles sont également vecteurs de bactéries comme* R. felis*, secondairement* R. typhi *et de bartonelles. Les espèces de bartonelles identifiées dans* C. felis *et* C. canis *sont développées dans le chapitre suivant.*

CHAPITRE II

Bartonella spp. identifiées chez *C. felis* et *C. canis.*

Synthèse bibliographique

Ce chapitre est consacré à l'étude des espèces de bartonelles identifiées à ce jour chez *C. felis* et *C. canis*. Nous y développons également les principaux signes cliniques dus à ces espèces de bartonelles et observés chez le chat, le chien et l'homme.

1. *Bartonella* spp. isolées de *C. felis* et *C. canis*

Les bartonelles ont une répartition mondiale avec une prévalence importante dans les régions dont les conditions climatiques sont favorables à la transmission par un arthropode vecteur (Edouard et Raoult, 2010; Guptill, 2010a; Guptill, 2010b).

1.1. *C. felis* et *Bartonella* spp.

Plusieurs espèces de bartonelles ont été détectées chez *C. felis* dans de nombreux pays du monde. Une des premières études épidémiologiques a été menée en Hollande en 1997. L'ADN de *B. henselae* et de *B. clarridgeiae* a été détecté dans des puces prélevées sur des chats d'un refuge (Bergmans et al., 1997). Par la suite de nombreuses études ont été menées dans le monde entier, et ont mis en évidence l'ADN de *B. henselae*, de *B. clarridgeiae*, de *B. koehlerae* et également de *B. quintana* chez *C. felis* prélevées sur chien ou chat. L'ADN de *B. henselae* et de *B. clarridgeiae* a également été identifié chez des puces *C. felis* prélevées sur des opossums aux États-Unis (Reeves et al., 2006 ; Nelder et al., 2009) (Tableau 1).

1.2. *C. canis* et *Bartonella* spp.

La détection de *Bartonella* spp. chez *C. canis* est moins décrite, mais a déjà été rapportée dans certains études épidémiologiques. Ainsi, l'ADN de *B. henselae* et de *B. clarridgeiae* a été mis en évidence chez *C. canis* en France, en Hongrie, et également au Japon (Tableau 1).

Tableau 1. Espèces de *Bartonella* identifiées dans *C. felis* et *C. canis* lors d'enquêtes épidémiologiques

Continent	PAYS	*Bartonella* spp. détectées dans les puces	Prévalence (détection par PCR)	Hôtes	Sources
	Congo	*B. clarridgeiae* *Candidatus B. rochalimae*	*C. felis strongylus* *P. irritans*	Environnement	Sackal et al., 2008
	Ethiopie	*B. henselae*	*C. felis* (2/34) *C. felis* (0/242) *C. canis* (0/16) *P. irritans* (0/9)	Chats Chiens Chiens Chiens	Kumsa et al., 2014
	Maroc	*B. henselae,* *B. clarridgeiae*	*C. felis*	Chats, chiens	Boudebouch et al., 2011
Amérique du Nord	**Alabama Maryland Texas**	*B. henselae* *B. clarridgeiae*	*C. felis* (37/92) *C. felis* (46/92)	Chats	Lappin et al., 2006
	Caroline du Nord	*B. clarridgeiae*	*C. felis*	Opossums	Nelder et al., 2009
	Caroline du Sud	*B. henselae*	*C. felis*	Opossums	Reeves et al., 2005
	Floride	*B. vinsonii subsp. berkhoffii* *B. rochalimae* *B. clarridgeiae*	*C. felis* (0 %), *P. irritans* (5.5%) *C. felis* (0%), *P. irritans* (11.1%) *C. felis* (5%), *P. irritans* (5.5%)	Chiens Chiens Chiens	Yore et al., 2014
	Ontario	*B. henselae* *B. clarridgeiae*	*C. felis* (45/50) *C. felis* (6/50)	Chats errants	Kamrani et al., 2008
Amérique du Sud	**Chili**	*B. henselae, B. clarridgeiae*	*C. felis* (4/37), *C. canis* (0/11)	Chats et chiens	Pérez-Martinez et al., 2009
Asie	**Chine**	*B. henselae* *B. clarridgeiae* *B. koehlerae*	*C. felis* (26/420) *C. felis* (9/420) *C. felis* (3/420)	Chats et chiens	Tsai et al., 2011a
	Japon	*B. henselae*	*C. felis* (12/36) *C. felis* (5/24) *C. canis* (2/2)	Chats Chiens Chiens	Ishida et al., 2001
	Laos	*B. clarridgeiae* *Bartonella spp.* *B. clarridgeiae*	*C. felis felis* (1/3) *C. felis orientis* (0/16) *C. canis* (3/3) *C. felis* (3/90)	Chiens Chats et chiens Chiens Chiens	Varagnol et al., 2008 Kernif et al., 2012
	Liban	*B. henselae*	*C. felis (8/104)* *C. canis (0/51)*	Chats Chiens	Mba et al. 2011

Continent	PAYS	*Bartonella* spp. détectées dans les puces	Prévalence (détection par PCR)	Hôtes	Sources
Asie	Malaisie	*B. henselae* *B. clarridgeiae*	*C. felis (24/209)* *C. felis (40/209)*	Chats chiens	Mokhtar et Tay, 2011
		B. clarridgeiae	*C. felis (2/360)*	Chiens	Kernif et al., 2012
	Thaïlande	*B. henselae*	*C. felis* (2/20) *C. canis* (0/34)	Chiens Chiens	Parola et al. 2003
		B. clarridgeiae	*C. felis* (3/20)	Chats furets blaireaux	
		B. henselae, B. clarridgeiae	*C. felis* (18 %)	Chats	Foongladda et al., 2011
		B. clarrigdeiae	4 *C. felis*, 1 *C. canis* / 137 puces	Chiens	Billeter et al., 2012
		B. henselae, B. clarridgeiae	Puces 25/226 (dont *C. felis*, *C. canis*, *P. irritans*)	Chats	Assarasakorn et al. 2012
Europe	Albanie	*B. henselae,* *B. clarridgeiae*	*C. felis (24/371), C. canis (0/5)*	Chats	Silaghi et al., 2012
	Espagne	*B. henselae, B. clarridgeiae*	*C. felis* (12/68), *C. canis* (1/20)	Chats, chiens	Blanco et al., 2006
		B. henselae	*C. felis* (15/41) *C. canis* (7/14) *C. felis* (9/224) *C. canis* (0/26)	Chats Chiens	Marquez et al., 2009
		B. clarridgeiae	*C. felis* (3/41) *C. canis* (0/26)	Chats Chiens	
	France	*B. henselae* *B. clarridgeiae*	*C. felis* (83 %) *C. felis* (16.7 %)	Chats	La Scola et al., 2002
		B. henselae *B. clarridgeiae* *B. koehlerae* *B. quintana*	*C. felis* (9/81) *C. felis* (55/81) *C. felis* (3/81) *C. felis* (14/81)	Chats	Rolain et al., 2003
	Hongrie	*B. henselae, B. clarridgeiae* *Bartonella* spp.	*C. felis* (2/50) *C. canis* (0/45)	Chats Renards	Sréter-Lancz et al. 2006

Continent	PAYS	*Bartonella* spp. détectées dans les puces	Prévalence (détection par PCR)	Hôtes	Sources
Europe	**Pays-bas**	*B. henselae*	*C. felis* (12/13)	Chats	Bergman et al. 1997
		B. clarridgeiae	*C. felis* (1.5 %) *C. canis* (0 %)	Chats	Tijsee-Klasen et al., 2011
	Portugal	*B. clarridgeiae*	*C. felis (6/29)* *C. canis (0/1)*	Chats	Alves et al. 2009
	Royaume-Uni	*B. henselae*	*C. felis* (22 %) *C. felis* (0 %)	Chats Chiens	Shaw et al. 2004
Océanie	**Australie**	*B. henselae* *B. clarridgeiae* *B. henselae* + *B. clarridgeiae*	*C. felis* (2/111) *C. felis* (2/111) *C. felis* (1/111)	Chats	Barrs et al., 2010
		B. henselae *B. clarridgeiae*	*C. felis*	Renards	Kaewmongkol et al., 2011
	Nouvelle Calédonie	*B. henselae*	*C. felis* (0/12)	Chats, chiens	Mediannikov et al., 2011
	Nouvelle Zélande	*B. clarridgeiae* *B. henselae*	*C. felis* (7 %) *C. felis (*11 %)	Chats Chiens	Kelly et al., 2005

2. Le chien et le chat, réservoirs de *Bartonella* spp.

Les chats sont les réservoirs naturels de *B. henselae* et également de *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae*, et peuvent être hôte accidentel de *B. bovis* (anciennement *B. weissi*) (Breitschwerdt et al., 1995b ; Lawson et al., 1996 ; Breitschwerdt et Kordick, 2000 ; Avidor et al., 2004 ; Saisongkorh et al., 2009 ; Chomel et Kasten, 2010 ; Kernif et al., 2011 ; Tsai et al., 2011c). Ces bactéries ont été isolées à partir de sang de chats dans de nombreuses régions du monde : Amérique du Nord, Europe, Japon, Australie, Nouvelle-Zélande, Israël… (Gutiérrez et al., 2013). La prévalence d'individus bactériémiques varie de 4 à 70 % en fonction du mode de vie du félin, de son âge, du degré d'infestation par les puces et du pays où il habite (Chomel et al., 1995 ; Maruyama et al., 2000 ; Rolain et al., 2004). Généralement, plus de 50 % des chats sont bactériémiques à *B. henselae* dans les régions où les puces sont endémiques, avec une proportion plus importante chez les chats errants (Heller et al., 1997). En Norvège, où la prévalence des puces est faible, voire nulle, aucun chat bactériémique n'a été détecté, alors que dans les pays chauds et humides, le taux de bactériémie peut atteindre 60 % (Chomel et al., 1999 ; Boulouis et al., 2005). La prévalence de la bartonellose est plus importante chez les chatons que chez les adultes (Chomel et al., 1995).

Les chiens peuvent être naturellement infectés par *B. henselae.* Des enquêtes menées sur des chiens cliniquement sains ont montré des séroprévalences de 6 %, 10 %, 14 % et 28 % aux États-Unis, au Zimbabwe, en Italie et en Sardaigne respectivement (Solano-Gallego et al., 2004 ; Kelly et al., 2004 ; Di Francesco et al., 2007 ; Capitta et al., 2010). Dans une autre étude, 9 % des chiens suivis présentaient une PCR et une culture positive pour *Bartonella* spp., la moitié d'entre eux étant infectés par *B. henselae* (Pérez et al., 2011). L'ADN de *B. henselae* a été détecté dans la salive de chiens au Japon et aux États-Unis (Murano et al., 2001 ; Duncan et al., 2007). Dans l'étude japonaise, le chien étudié avait des contacts étroits avec un enfant chez qui une bartonellose a été diagnostiquée. Des cas de bartonelloses humaines ont été rapportés chez des patients ne rapportant aucun contact avec des chats, mais étant propriétaires de chiens (Kusaba et al., 1999 ; Chung et al., 2005). Les chiens et les chats sont donc des réservoirs de *Bartonella* spp.

3. Rôles pathogènes des bartonelles

Les principales espèces de bartonelles retrouvées chez *C. felis* et secondairement chez *C. canis* sont *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* et *B. quintana*. Après avoir vu la modalité de contamination des érythrocytes par *Bartonella* spp., nous développerons les principales manifestations cliniques de chacune de ces espèces chez le chat, le chien et l'homme.

B. vinsonii sb. *berkhoffi* est la deuxième espèce de bartonelle détectée chez le chien après *B. henselae* (Pérez et al., 2001 ; Yore et al., 2014). Elle aurait pour réservoir les canidés domestiques et sauvages chez qui elle provoque une bactériémie intraérythrocytaire de longue durée (Breitschwerdt et Kordick, 2000 ; Dobler et Pfeffer, 2011 ; Billeter et al., 2012). Les tiques ont été suggérées comme vecteurs possibles de cette bactérie, mais leurs rôles dans la transmission de cette espèce de bartonelle n'a pas encore été démontré (Pappalardo et al., 1997; Breitschwerdt et Kordick, 2000). Une étude récente rapporte l'identification de l'ADN de *B. vinsonii* sb. *berkhoffi* chez des puces *P. irritans* prélevées sur chiens, suggérant ainsi un potentiel rôle vecteur de cette espèce de puces (Yore et al., 2014). *B. vinsonii* sb. *berkhoffi* n'ayant à ce jour pas été identifiée chez *C. felis* ou *C canis*, l'étude de cette espèce de bartonelle ne sera pas envisagée par la suite.

B. bacilliformis est l'agent responsable de la maladie de Carrion chez l'homme, maladie endémique dans certaines régions des Andes. Cette bactérie est transmise par les phélobotomes *Lutzomyia verrucarum*. L'étude de cette bactérie ne sera pas développée ici.

3.1 Invasion des érythrocytes chez le réservoir

Les bartonelles sont à l'origine d'une bactériémie intra érythrocytaire, généralement sans signe clinique chez leur hôte. Des modèles de l'invasion des érythrocytes existent chez les rongeurs notamment chez la souris pour *B. birtlesii* et chez le rat pour *B. tribocorum* (Boulouis et al., 2001 ; Marignac et al., 2010 ; Schülein et al., 2001). Chez le rat, après inoculation intraveineuse de *B. tribocorum*, les bactéries disparaissent en quelques heures de la circulation générale, et on ne peut pas détecter la présence de la bactérie dans le sang pendant 3-4 jours. Cette phase traduit l'existence d'une niche de colonisation primaire, avant l'invasion des érythrocytes. Les bartonelles ayant un tropisme particulier pour les cellules endothéliales, les auteurs suggèrent que celles-ci pourraient constituer la niche primaire (Schülein, 2001; Dehio, 2005). Par la suite, les bactéries sont libérées, adhèrent aux érythrocytes matures, les envahissent et s'y multiplient (Figure 6). La bactériémie augmente

ainsi jusqu'au 10-12ème jour et persiste pendant 6 à 8 semaines. La multiplication des bactéries atteint un plateau et ne conduit pas à la lyse des hématies qui restent infectées toute leur vie. Par la suite, des vagues de bactériémies sont récurrentes tous les 3 à 6 jours. Cette libération depuis la niche primaire pourrait expliquer les vagues de fièvre observées chez l'homme dans les cas de la fièvre des tranchées due à *B. quintana*. Dans ce modèle d'infection chez le rat, les vagues de bactériémie n'ont pas été associées à des signes cliniques. La modalité de colonisation des érythrocytes par *Bartonell*a spp. semble être la même chez tous les hôtes réservoirs, et s'accompagner de peu ou pas de signes cliniques. Seule *B. bacilliformis* provoque chez l'homme des hémolyses importantes accompagnées de signes cliniques sévères (Hendrix, 2000).

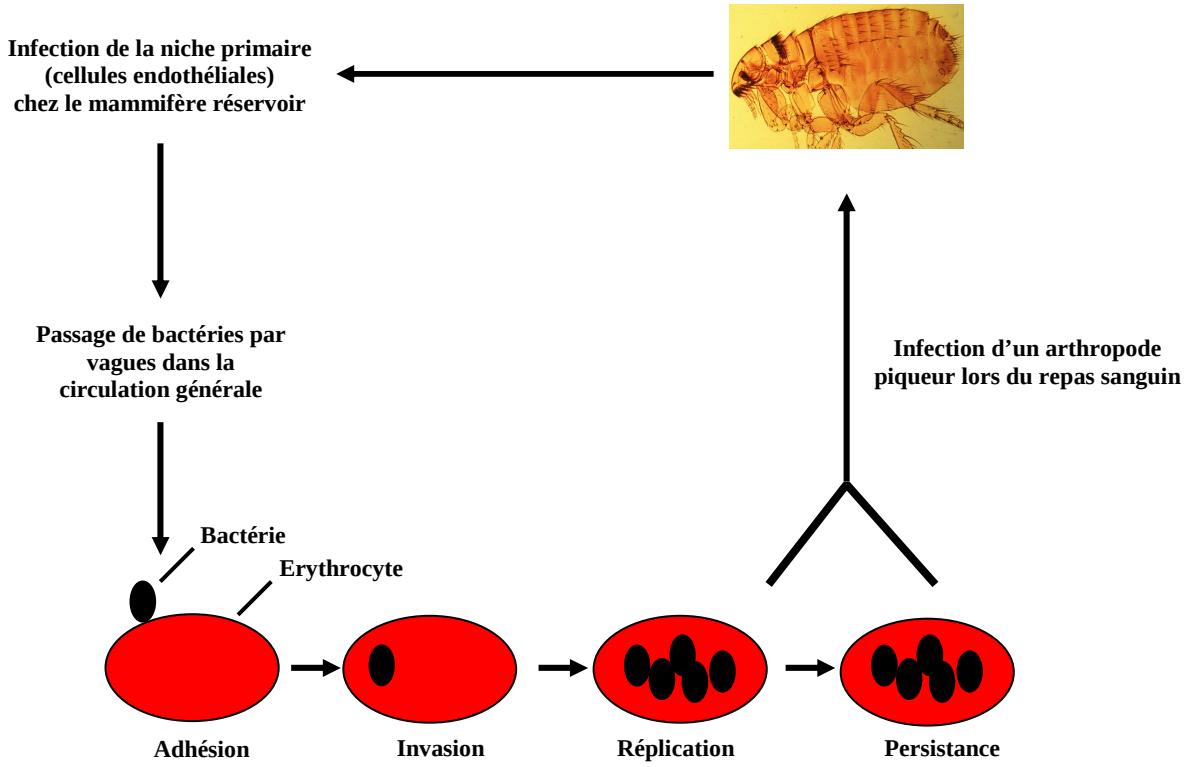


Figure 6. Invasion des érythrocytes par *Bartonella* spp. chez un hôte réservoir (d'après Pulliainen et Dehio, 2012)

3.2. Stimulation de l'angiogenèse

Chez les individus immunodéprimés, *B. henselae* est responsable de lésions vasculaires prolifératives reposant sur deux mécanismes principaux : l'inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales et la stimulation de l'angiogenèse qui serait principalement due à une protéine de surface appelée BadA (*Bartonella* adhesin A). Cette protéine est en effet exprimée

lors d'infection à *B. henselae* chez l'homme ou chez des lapins inoculés expérimentalement. Elle permettrait à *B. henselae* d'adhérer à la matrice extracellulaire et aux cellules endothéliales et de prévenir la phagocytose de la bactérie par les macrophages. Cette protéine stimule la sécrétion de cytokines proangiogéniques, comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor (VEFG)), sécrété par les cellules endothéliales et les lymphocytes et macrophages recrutés sur le site de l'infection. Les vaisseaux sanguins et les cellules de l'endothélium vasculaire prolifèrent de manière anormale, à l'origine des lésions observées en cas d'angiomatose bacillaire (Kempf et al., 2001 ; Riess et al., 2004 ; Kaiser et al., 2008).

4. Manifestations cliniques

4.1. Chez le chat

Des manifestations cliniques ont été rapportées chez des animaux infectés naturellement ou expérimentalement.

4.1.1. *Bartonella henselae*

L'infection naturelle à *B. henselae* est généralement asymptomatique. Elle s'accompagne d'une bactériémie intraérythrocytaire qui dure en moyenne 60 jours et qui peut être récurrente pendant plusieurs mois voire plusieurs années (Kordick et Breitschwerdt, 1995; Jacomo et al., 2002). La présence d'anticorps à *B. henselae* a été associée chez le chat à diverses manifestations cliniques : fièvre, lymphadénopathie, stomatite, gingivite, uvéite, troubles du tractus urinaire et rénal (Glaus et al., 1997 ; Lappin et Black, 1999 ; Breitschwerdt et Kordick, 2000). *B. henselae* peut être également à l'origine d'endorcardites chez le chat (Chomel et al., 2003 ; Chomel et al., 2009b). La pathogénicité de *B. henselae* pourrait être augmentée en cas de co-infections avec les virus du FeLV ou de l'immunodéficience féline (FIV). Ueno et al. (1996) ont montré que des chats co-infectés par le FIV et *B. henselae* présentaient significativement plus de gingivites et de lymphadénopathies que des chats séropositifs pour un seul des agents pathogènes. Cependant une telle corrélation n'a pas été retrouvée dans une étude ultérieure (Quimby et al., 2008). Buchmann et al., (2010) ont montré que les taux d'infection à *B. henselae* étaient significativement plus importants chez les chats porteurs du FeLV, mais aucune lésion histopathologique caractéristique de *B. henselae* n'a été détectée chez ces animaux. Dans cette étude, aucun des chats porteurs du FIV ou du virus de la panleucopénie féline n'était co-infecté par *B. henselae*.

Les principales manifestations cliniques dues à *B. henselae* ont été observées après inoculations expérimentales. Les signes les plus souvent rapportés sont : épisode fébrile de courte durée (48-96 h après inoculation), anémie modérée, désordres neurologiques transitoires. Certains chats peuvent être léthargiques et anorexiques pendant les épisodes fébriles. Des troubles de la reproduction (fertilité diminuée, taux d'avortements augmentés) ont également été décrits (Kordick et Breitschwerdt, 1997 ; Guptill et al., 1998 ; Kordick et al., 1999 ; O' Reilly et al., 1999). Une myocardite accompagnée d'épanchement péricardique et pleural, un ictère et une ataxie ont également été rapportés (Bradburry et Lappin, 2010). La sévérité du tableau clinique varie en fonction de la souche utilisée, de la taille de l'inoculum et de la voie d'inoculation (O'Reilly et al., 1999 ; Mikolajczyk et O'Reilly, 2000). Dans une étude comparative, 100 % des chats inoculés par voie intradermique sont devenus bactériémiques, contre seulement 1.25 % des chats par voie intraveineuse. La voie intradermique a donc été plus efficace (Abbott et al., 1997). Lors d'inoculation par voie intradermique, un abcès peut apparaître au site d'inoculation (O' Reilly et al., 1999 ; Guptill, 2010a). L'infection de chats âgés de 10 à 12 mois par cette voie a conduit à une bactériémie sans signe clinique qui apparaît en une à trois semaines et atteint un pic entre le 21ème et 44ème jour. Les IgM apparaissent en une à deux semaines, avec un titre maximal entre la deuxième et la cinquième semaine. Les IgG apparaissent la deuxième semaine et peuvent persister plus de 12 mois (Abbott et al., 1997 ; Guptill et al., 1999).

4.1.2. *Bartonella clarridgeiae*

Son isolement chez le chat est moins fréquent que celui de *B. henselae*. La prévalence de cette bactérie varie de 17 à 36 % dans des études conduites en France, en Hollande, aux Philippines et en Thaïlande (Maruyama et al., 2001 ; Boulouis et al., 2005). Aucune pathologie spécifique n'a été associée à cette bactérie chez les chats naturellement infectés. Des co-infections avec *B. henselae* existent (Gurfield et al., 1997 ; Chomel et al., 1999). Lors d'une infection expérimentale, de légers signes cliniques ont été notés tels que troubles neurologiques transitoires, cataractes et éosinophilies. Après autopsie des chats inoculés, les analyses histologiques ont montré une atteinte chronique des nœuds lymphatiques périphériques, de la rate, du foie, du myocarde et des reins (Kordick et al., 1999).

4.1.3. *Bartonella koehlerae*

Cette bactérie a rarement été identifiée chez le chat (Avidor et al., 2004). Jusqu'à présent, elle a été isolée chez deux chats en Californie, un chat en France et un chat en Israël (Droz et al.,

1999 ; Rolain et al., 2003a ; Boulouis et al., 2005). Une inoculation chez le chat est suivie d'une bactériémie apparaissant entre 14 et 36 jours, mais sans signe clinique (Yamamoto, 2002).

4.1.4. *Bartonella quintana*

Cette bactérie a été isolée chez deux chats asymptomatiques aux États-Unis et mise en évidence dans la pulpe dentaire d'un chat en France (La et al., 2005 ; Breitschwerdt et al., 2007). Ainsi les chats pourraient être des sources possibles de contamination pour les hommes.

Bartonella henselae, B. clarridgeiae et B. koehlerae sont bien adaptées à leur réservoir naturel. En effet, les chats naturellement infectés présentent une bactériémie de longue durée et sont habituellement asymptomatiques. Parfois certains signes non spécifiques (endocardites, troubles neurologiques, stomatites, uvéites et fièvre) ont été rapportés.

4.2. Chez le chien

Le rôle des chiens en tant que réservoir de *Bartonella* spp. est moins bien connu que celui des chats. Ils sont considérés comme des hôtes accidentels.

4.2.1. *Bartonella henselae*

Elle est la cause de 19 à 28 % des endocardites chez le chien, avec principalement une atteinte des valves aortiques, et secondairement des valves mitrales (Breitschwerdt et al., 1995a ; Pesavento et al., 2005 ; Sykes et al., 2006). La survie des chiens ayant une endocardite est raccourcie lors d'une infection à *Bartonella* spp. (Sykes et al., 2006). Les autres signes cliniques associés à une sérologie positive sont : fatigue, épistaxis, polyarthrite chronique, thrombocytopénie, éosinophilie, vascularite cutanée et uvéite (Goodman et Breitschwerdt, 2005 ; Henn et al., 2005 ; Diniz et al., 2009). Des atteintes granulomateuses avec des localisations variées ont été décrites : lymphadénites granulomateuses, adénites et rhinites granulomateuses, ou plus généralement maladies granulomateuses atteignant la rate, le coeur, les nœuds lymphatiques, le foie, les reins, les poumons, le médiastin, et les glandes salivaires (Pappalardo et al., 2000 ; Gillespie et al., 2003). La péliose hépatique est une des lésions associées à une infection à *B. henselae* chez l'homme. Elle a été décrite chez un Golden Retriever, associée à une fatigue généralisée, une distension abdominale accompagnée d'ascite et à de multiples nodules hépatiques (Kitchell et al., 2000). Plus récemment, une étude a montré que *B. henselae* et *B. koehlerae* pourraient être à l'origine de lésions

vasculaires prolifératives (Beerlage et al., 2012). Un cas de gammapathie monoclonale associé à un syndrome d'hyperviscosité dû à *B. henselae* a été décrit chez un chien de 3 ans en Espagne (Tabar et al., 2011). Les cas de gammapathies monoclonales sont généralement rapportés en médecine humaine lors d'infection à *B. henselae* et *B. quintana* (Krause et al., 2003, Sève et al., 2006).

Peu de modèles expérimentaux sont disponibles chez le chien. Deux études récentes rapportent le suivi de chiens après inoculation intradermique de *B. henselae*. Dans la première étude, une séroconversion sans signe clinique est notée, les cultures et les PCR réalisées sur sang sont restées négatives. Après autopsie, la présence de bactéries a été mise en évidence après ensemencement de la moelle osseuse dans un milieu de culture spécifique à *Bartonella* (*Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium (BAPGM) (Balakrishnan et al., 2013). Dans la deuxième étude, les chiens ont développé des lésions nécrotiques au site d'inoculation, mais ne sont pas devenus bactériémiques (Chomel et al., 2014). Aucune bactériémie de longue durée n'a été décrite à ce jour chez le chien qui ne semble donc pas être un réservoir naturel de *B. henselae*, mais plutôt un hôte accidentel.

4.2.2. *Bartonella clarridgeiae*

Elle est principalement associée à des cas d'endocardites et d'hépatites lymphocytaires (Chomel et al., 2001 ; Gillepsie et al., 2003). Cette bactérie a été détectée chez des chiens asymptomatiques au Gabon (Gundi et al., 2004), en Corée (Kim et al., 2009), en Thaïlande (Inoue et al., 2009) et en Algérie (Kernif et al., 2010).

4.2.3. *Bartonella koehlerae*

La détection de cette bactérie chez le chien est peu rapportée dans la littérature. Son ADN a été identifié chez un boxer atteint d'endocardite en Israël (Ohad et al., 2010). Plus récemment, une étude menée sur 61 chiens positifs par PCR à *Bartonella* spp. a mis en évidence la présence de l' ADN de *B. koehlerae* chez sept d'entre eux (Pérez et al., 2011).

4.2.4. *Bartonella quintana*

Bartonella quintana a été identifiée chez deux chiens présentant une endocardite aux États-Unis et en Nouvelle-Zélande (Kelly et al., 2006). L'ADN de cette bactérie a été détecté dans le sang et les noeuds lymphatiques de chiens présentant ou non des lymphomes aux États-Unis (Duncan et al., 2008), et dans le sang de chiens errants en Thaïlande (Bai et al., 2010). Il

a été également détecté dans la salive de chiens, suggérant la morsure comme transmission possible de cette bactérie (Duncan et al., 2007).

Les chiens infectés par Bartonella spp. peuvent présenter un tableau clinique similaire à celui de l'Homme (endocardites, péliose hépatique, lésions vasculaires) (Breitschwerdt et al., 2010). Les espèces de bartonelles pathogènes pour le chien sont également pathogènes pour l'homme (Chomel et al., 2006). Ainsi les chiens pourraient jouer le rôle de sentinelles pour les infections humaines (Chomel et Kasten, 2010).

4.3. Chez l'homme

4.3.1. *Bartonella henselae*

Chez les individus immunocompétents, l'infection à *B. henselae* est soit asymptomatique, soit responsable de la maladie des griffes du chat (MGC) (Regnery et al., 1992 ; Anderson et Neuman, 1997 ; Chomel et al., 2004).

4.3.1.1. Maladie des griffes du chat

Quelques jours après une griffure de chat infecté par *B. henselae*, une papule ou une pustule apparaît au site d'inoculation de la bactérie (Figure 7A) (Boulouis et al., 2005 ; Chung et al., 2005). Dans les deux à huit semaines suivantes, une adénopathie survient dans la zone de drainage de la lésion cutanée. Le nœud lymphatique est alors douloureux, ferme et tendu. Les localisations préférentielles de l'adénopathie sont la région axillaire, cervicale, rétromandibulaire et fémorale (Carithers, 1985). Un malaise général, de la fièvre, et des céphalées sont parfois rapportés (Zenone, 2011). Plus rarement, les nœuds lymphatiques atteints peuvent suppurer (Figure 7B). L'évolution se fait généralement vers la régression spontanée en quelques semaines. La MGC touche majoritairement les enfants et les jeunes adultes chez qui elle est une des causes les plus communes de lymphadénopathies (Carithers, 1985 ; Massei et al., 2004).

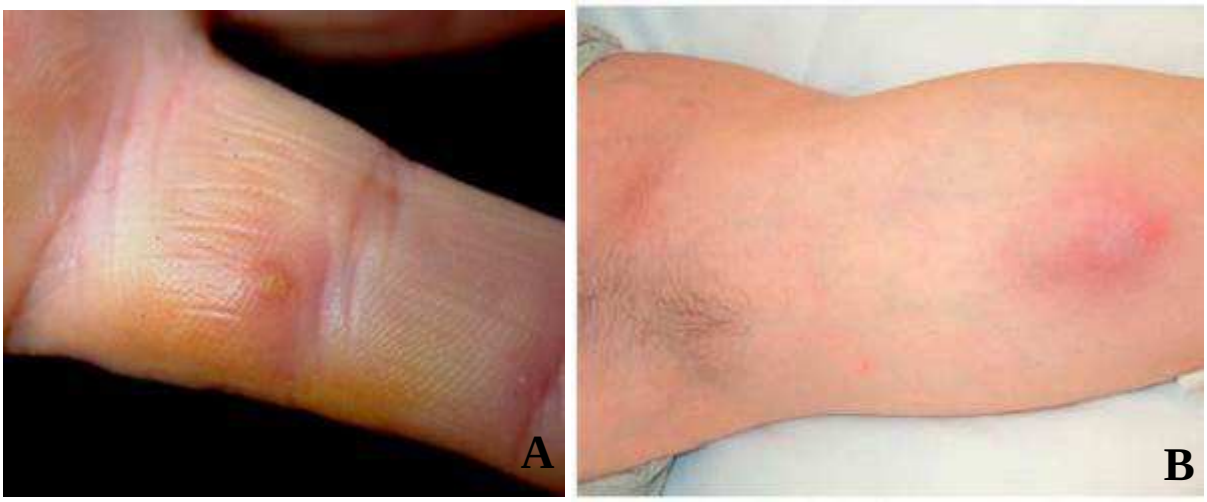


Figure 7. Lésions rencontrées lors d'infection à *B. henselae*.
(A) Papule au site d'inoculation de *B. henselae* après une griffure par un chat. (d'après : http://ifr48.timone.univ-mrs.fr/Fiches/Bartonella_henselae.html#toc7), (B) Adénopathie suppurative lors de maladie des griffes du chat. (d'après Boillat et Greub, 2008).

4.3.1.2. Endocardites

Bartonella henselae est à l'origine de nombreux cas d'endocardites, survenant le plus souvent sur une pathologie valvulaire préexistante, et affectant majoritairement la valve aortique, comme cela a été décrit chez le chien (Raoult et al., 1996 ; Gouriet et al., 2007 ; Chomel et al., 2009b ; Teoh et al., 2010). Une chirurgie de remplacement valvulaire est généralement nécessaire. En raison de la croissance lente de cette bactérie sur les milieux de culture classiques, les résultats d'hémocultures sont souvent négatifs chez les patients atteints d'endocardite à *B. henselae*. Le diagnostic se fait alors par sérologie et/ou PCR. *B. henselae* est la cause de 25 % d'endocardites à hémoculture négative en France (Raoult et al., 1996 ; Fournier et al., 2001 ; Houpikian et Raoult, 2005).

4.3.1.3. Angiomatose bacillaire et péliose viscérale

Chez les individus immunodéprimés, une infection à *B. henselae* est grave, voire létale, si aucun traitement n'est mis en place. Les manifestions les plus fréquentes sont l'angiomatose bacillaire, la péliose hépatique et des fièvres avec bactériémie (Slater et al., 1992 ; Welch et al., 1992 ; Koehler et al., 2003). Les lésions histologiques observées dans l'angiomatose bacillaire se situent dans le derme superficiel et profond, et peuvent s'étendre aux organes. Elles se caractérisent par une prolifération des capillaires lobulaires et des cellules endothéliales constituant la paroi des néovaisseaux. Ces cellules endothéliales peuvent saillir dans la lumière vasculaire et l'obstruer (Riess et al., 2004 ; Edouard et Raoult, 2010). Les lésions se présentent sous forme de papules violacées ou de nodules friables et

hémorragiques, pouvant évoquer le sarcome de Kaposi ou l'hémangiome épithélioïde (Figure 8) (Tappero et Koehler, 1997; Mancuso et al., 2013). Les localisations viscérales se retrouvent au niveau du foie, de la rate, du tube digestif, des nœuds lymphatiques et du système nerveux (Koehler et Cederberg, 1995).

La péliose viscérale est une atteinte tissulaire profonde qui se caractérise par une prolifération intense des capillaires sinusoïdes du foie, de la rate, du poumon et des nœuds lymphatiques. Elle se caractérise par la présence de petites cavités remplies de sang disséminées dans le parenchyme (Koehler et al., 1997 ; Ahsan et al., 1998).

4.3.1.4. Formes atypiques d'une infection à Bartonella henselae

Elles représentent environ 5 % des cas et peuvent être localisées ou systémiques.

Formes oculaires : Les affections oculaires sont assez fréquemment rencontrées et touchent 5 à 10 % des patients (Biancardi et Curi, 2013). Le syndrome oculoglandulaire de Parinaud est une manifestation fréquente d'une infection à *B. henselae*. Il se caractérise par une conjonctivite unilatérale granulomateuse et une adénopathie préauriculaire accompagnées parfois d'un œdème des paupières. Cette forme clinique est consécutive à l'inoculation de l'agent infectieux par voie conjonctivale. Les autres affections oculaires rencontrées sont des conjonctivites folliculaires, des uvéites, des infections du vitré, des neurorétinites, des décollements de la rétine, des occlusions de l'artère rétinienne (Ormerod et al., 1998 ; Ormerod et Dailey, 1999 ; Font et al., 2011 ; Batsos et al., 2013 ; Biancardi et Curi, 2013 ; Georgios et al., 2013, Kilonback et al., 2014).

Formes systémiques : elles sont surtout présentes chez l'enfant. Elles se manifestent par des malaises, une dégradation de l'état général avec fatigue et perte de poids. Elles peuvent s'accompagner d'hépatomégalie et de splénomégalie granulomateuses (Lamps et Scott, 2004). Un cas d'abcès splénique a été décrit chez un adulte immunocompétent (Anyfantakis et al., 2013).

Autres formes : elles comprennent des encéphalopathies généralement transitoires qui s'accompagnent de troubles neurologiques (irritabilité, perte d'orientation, troubles de la mémoire, syndrôme de Guillain-Barré…) (Carman et al., 2013 ; Maggi et al., 2013a ; Mascarelli et al., 2013). D'autres manifestations cliniques ont été attribuées à une infection à *B. henselae* : érythème noueux (Naji et al., 2013), arthrites, ostéomyélites (Dusser et al., 2013 ; Mascarelli et al., 2013), anomalies osseuses détectées par scintigraphie chez des enfants (Donoso et al., 2013). Un cas de bactériémie persistante a été décrit pour la première fois chez un patient immunocompétent (Maggi et al., 2013a).

Les personnes ayant des contacts répétés avec les animaux réservoirs à *B. henselae* et des arthropodes vecteurs constituent des populations à risques (Chang et al., 2006 ; Lin et al., 2011 ; Maggi et al., 2013b). Ainsi aux États-Unis, 9 % des vétérinaires ont contracté la MGC au cours de leur activité professionnelle, et trois d'entre eux étaient bactériémiques au moment de l'étude (Noah et al., 1997). Dans les années 2000, la séroprévalence à *B. henselae* était de 1,5 % à Taiwan et de 15 % au Japon chez les vétérinaires et les professions associées (assistantes, toiletteuses) (Kumasaka et al., 2001 ; Chang et al., 2006).

4.3.2. *Bartonella clarridgeiae et Bartonella koehlerae*

Bartonella clarridgeiae peut être responsable de MGC (Kordick et al., 1997; Margileth et Baehren, 1998). *Bartonella koehlerae* a été identifiée dans des cas d'endocardites, de troubles neurologiques et récemment dans un cas de syndrome douloureux régional complexe de type I (algoneurodystrophie) chez un vétérinaire *(*Avidor et al., 2004 ; Breitschwerdt et al., 2011 ; Vera et al., 2013).

4.3.3. *Bartonella quintana*

Bartonella quintana a pour vecteur principal le pou du corps *Pediculus humanus corporis* et pour réservoir principal l'homme (Maurin et Raoult, 1996). Son ADN a été détecté chez *C. felis*, suggérant ainsi un rôle possible de la puce du chat dans le cycle naturel de cette bactérie (Rolain et al., 2003b). *B. quintana* est l'agent responsable de la fièvre des tranchées, ou fièvre quintane, qui a décimé un million de soldats pendant la Première Guerre Mondiale (Raoult et Roux, 1999 ; Karem et al., 2000). De nos jours, cette bactérie est ré-émergente dans des camps de réfugiés en Afrique et chez les sans abris et les patients alcooliques en Europe, aux États-Unis et en Russie (Spach et al., 1995b ; Stein et Raoult, 1995 ; Raoult et al., 1998 ; Brouqui et al., 1999 ; Raoult et Roux, 1999 ; Rydkina et al., 1999). On parle de « fièvre des tranchées urbaine ». La phase aiguë se caractérise par une fièvre accompagnée de vertiges, de céphalées et de douleurs osseuses intenses au niveau du dos et des tibias. On observe parfois une éruption fugace maculaire ou papuleuse accompagnée d'une hépatomégalie et d'une splénomégalie. La fièvre peut persister cinq à six jours. Dans 50 % des cas, des poussées fébriles se succèdent à intervalles de cinq à six jours, d'où le nom de fièvre quintane. La phase chronique est sans fièvre et se caractérise par une bactériémie prolongée (Brouqui et al., 1999 ; Foucault et al., 2006). *B. quintana* est également responsable d'endocardites et d'adénopathies chroniques (Drancourt et al., 1995 ; Spach et al., 1995a ; Dimopoulos et al.,

2012). Chez les patients immunodéprimés, *B. quintana* est également responsable d'angiomatose bacillaire (Figure 8) (Koehler et al., 1992 ; Colson et al., 1996 ; Koehler et al., 1997 ; Santos et al., 2000 ; Fulchini et al., 2013). Des lyses osseuses peuvent apparaître en regard des lésions cutanées (Koehler et al., 1992, Koehler et al., 1997).

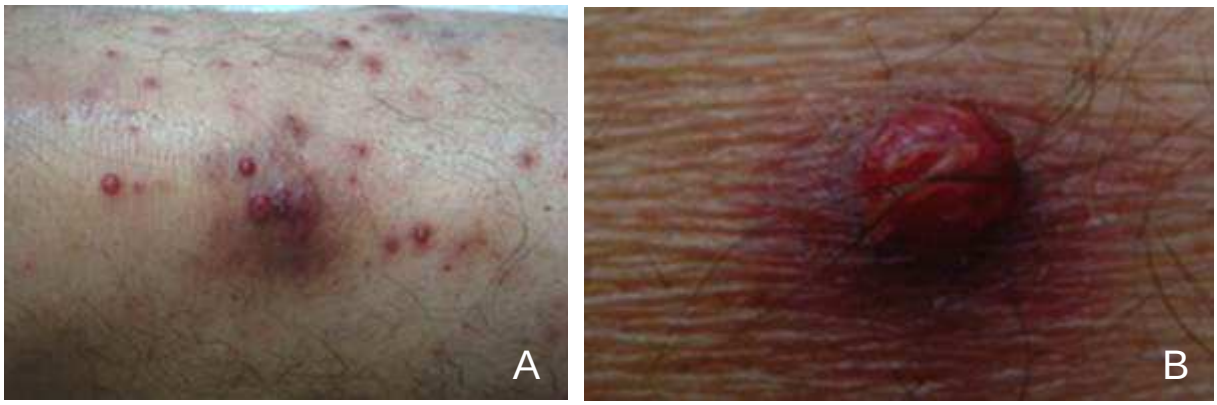


Figure 8. Angiomatose bacillaire lors d'infection à *B. quintana* chez un patient atteint de leucémie chronique.
(A) multiples nodules et papules vasculaires, (B) lésion de type angiome entouré d'une zone érythémateuse (Fulchini et al., 2013).

Les bartonelles sont des bactéries qui colonisent les érythrocytes et les cellules endothéliales favorisant ainsi leur vectorisation par des arthropodes hématophages. Leur localisation intra-érythrocytaire leur assure également une protection vis-à-vis de la réponse immunitaire de l'hôte, et de l'action de certains antibiotiques, rendant leur traitement difficile. B. henselae *et* B. quintana *sont capables de stimuler l'angiogénèse : elles induisent une prolifération anormale des cellules endothéliales des petits capillaires sanguins, tout d'abord au niveau cutané et dermique puis sous-cutané. Cette prolifération vasculaire est à l'origine des lésions vasculaires prolifératives observées lors d'angiomatose bacillaire ou de péliose viscérale chez les individus immunodéprimés.* B. henselae *est l'espèce de bartonelle la plus répandue et c'est un important agent de zoonose. Chez son réservoir, le chat, l'infection est généralement asymptomatique. Chez le chien, les manifestations cliniques décrites se rapprochent souvent de celles de l'homme. Chez l'homme, une infection à* B. henselae *peut parfois être très grave chez les individus immunodéprimés.*
Le vecteur principal de cette bactérie est la puce du chat C. felis*. Une bonne connaissance des interactions entre* B. henselae *et son vecteur est nécessaire afin d'envisager des moyens de prévention de sa transmission.*

CHAPITRE III

C. felis, vecteur de *Bartonella* spp.

Travaux personnels

Ce chapitre est consacré à l'étude du rôle vecteur de *C. felis* pour *B. henselae*. Après une brève synthèse des informations disponibles dans la littérature, nous présentons nos travaux expérimentaux.

Les premières études établissant clairement un lien entre l'angiomatose bacillaire, la maladie des griffes du chat (MGC) et *C. felis,* datent des années 1990. Zangwill et al. (1993) ont montré que la majorité des patients atteints de MGC était généralement propriétaires d'un chat de moins de 12 mois, avaient un antécédent de griffure ou de morsure par leur chat, et que ce dernier était infesté de puces. *Bartonella henselae* a été identifiée pour la première fois dans la puce du chat par Koehler et al. en 1994. Par la suite, Flexman et al. (1995) ont isolé l'ADN de *B. henselae* à partir des puces et du sang d'un chat dont le propriétaire était atteint de MGC. Ce même isolement a été réalisé chez des chats dont les propriétaires présentaient les signes cliniques d'une angiomatose bacillaire (Koehler et al., 1996). Enfin, les chats infestés par des puces sont plus souvent contaminés par *B. henselae* que les chats non infestés (Chomel et al., 1995).

Le rôle vecteur de *C. felis* a été démontré pour la première fois par Chomel et al. en 1996. Le transfert de puces de chats bactériémiques à des chats SPF a entraîné une bactériémie dans un délai de deux à six semaines. Cette transmission ne s'est pas produite lorsque des chats bactériémiques ont été mis en contact avec des chats SPF en l'absence de puces (Chomel et al., 1996). Dans ces conditions, la transmission ne se fait pas par contact direct de type griffure, morsure, léchage, partage de repas et de litière ou accouplement (Abbot et al., 1996 ; Guptill et al., 1997 ; Guptill et al., 1998). Les puces sont donc nécessaires à la transmission de *B. henselae* chez le chat. Lorsque des puces sont gorgées sur un nourrisseur artificiel avec du sang contenant *B. henselae*, les bactéries sont détectées dans le tube digestif des puces dès trois heures après le début du repas contaminant. Elles persistent par la suite dans le tube digestif et sont excrétées viables dans les déjections pendant au moins neuf jours (Higgins et al., 1996). Une fois dans le milieu extérieur, les bactéries survivent au moins trois jours dans les déjections (Finkelstein et al., 2002). Le mode de transmission de *B. henselae* par *C. felis* a été investigué chez le chat par Foil et al. (1998). Pour cela, des puces ont été placées pendant quatre jours sur chats bactériémiques à *B. henselae*. Les puces et leurs déjections ont ensuite été récoltées. Un premier groupe de chats SPF a ingéré un mélange de puces et de leurs déjections, un deuxième groupe également SPF a reçu une injection intradermique des déjections et enfin, le dernier groupe de chats SPF a été exposé à des puces placées sur leur flanc, et maintenues dans des petites cages permettant aux puces de piquer,

mais empêchant le contact entre leurs déjections et la peau du chat. Seule l'inoculation intradermique de fèces a conduit à une séroconversion et à une bactériémie chez les chats receveurs. Dans cette étude, la transmission par la piqûre n'a quant à elle pas été démontrée. Dans l'état des connaissances actuelles, le rôle de la salive comme source d'infection pendant le repas sanguin n'a pas encore clairement été prouvé (Chomel et al., 2009a).

Les puces contaminées par *B. henselae* émettent des déjections contenant des bactéries sur le pelage d'un chat infesté. Ce dernier contamine sa bouche et ses griffes en se toilettant ou en se grattant. De l'ADN de *Bartonella* spp. a en effet été détecté sur des écouvillons gingivaux et dans les bourrelets unguéaux de chats (Lappin et Hawley, 2009 ; Oskouizadeh et al., 2010). Les maladies parodontales associées à une infection à *B. henselae* sont parfois à l'origine de saignements gingivaux qui peuvent contaminer la salive du chat (Koehler et al., 1994 ; Chomel et al., 1996). Les bactéries sont ainsi inoculées lors de griffures ou de morsures. En caressant un animal infecté hébergeant des puces, il est possible de souiller ses doigts par les déjections de puces. Puis en se frottant l'œil, les déjections contaminantes sont inoculées directement sur la conjonctive. C'est l'explication du mode de contamination lors du syndrome de Parinaud, pour lequel il n'est pas fait mention de griffures (Escarmelle et al., 2004). La compétence vectorielle de *C. felis* vis-à-vis de *B.henselae* est donc avérée.

Comme nous l'avons présenté dans le chapitre précédent, l'ADN de plusieurs espèces de *Bartonella* a été détecté chez *C. felis* (voir Tableau 1), suggérant un rôle possible de cette puce dans le cycle évolutif de ces différentes espèces de bartonelles. C'est le cas de *B. clarridgeiae*, et de *B. quintana*, espèces zoonotiques responsables respectivement de la MGC et de la fièvre des tranchées. Dans de nombreux pays du monde, les rongeurs pourraient être des réservoirs d'autres espèces de bartonelles zoonotiques pour l'homme. *B. tribocorum et B. elizabethae*, par exemple, ont été détectées chez des patients atteints de fièvre aiguë (Kosoy et al., 2010). La transmission au sein du réservoir animal et à l'homme n'est pas connue, et le rôle des puces retrouvées sur les rongeurs a été suggéré (Bai et al., 2009). À notre connaissance, le rôle de la puce du chat dans ce type de transmission n'a pas fait l'objet de recherche approfondie, malgré la faible spécificité d'hôtes de *C. felis*, et sa fréquente détection chez des rongeurs, comme le rat ou la souris. Les fèces de puces semblent être le matériel infectieux le plus important, et la voie de contamination principale serait l'inoculation intradermique de ces dernières.

Des études utilisant des nourrisseurs artificiels ont montré que *C. felis*, une fois infectée, pouvait contaminer du sang sain avec des agents pathogènes comme le virus du FeLV, ou

avec *R. felis* lors d'un repas ultérieur (Vobis et al., 2005 ; Hirunkanokpun et al., 2011). Ce type d'étude n'a jamais été réalisé pour *C. felis* et *Bartonella* spp.

La transmission verticale transovarienne de *Bartonella* spp. chez la puce a été peu investiguée et des conclusions contradictoires sont trouvées dans la littérature. L'ADN de *Bartonella* spp. a été identifié dans les ovaires de puces collectées sur des renards roux, des chiens de prairies (Brinkerhoff et al., 2010) ou des petits rongeurs (Kabeya et al., 2011). Suite à ces résultats, les auteurs ont suggéré une transmission verticale de *Bartonella* spp. chez la puce (Brinkerhoff et al., 2010). Dans une autre étude, des puces *X. ramesis* nourries sur rongeurs infectés par *Bartonella* spp. se sont contaminées, mais n'ont pas transmis les bactéries aux œufs et aux larves de la génération suivante (Morick et al., 2011). L'hypothèse de transmission verticale de *Bartonella* spp. chez la puce a alors été réfutée (Chomel et al., 2011). Cependant, la transmission verticale de *Bartonella* spp. n'a fait l'objet d'aucune étude chez *C. felis.*

Ainsi, de nombreuses inconnues persistent dans les connaissances du rôle vecteur de *C. felis* pour *Bartonella* spp. Nous avons donc choisi d'explorer le rôle vecteur de cette espèce de puce pour cinq espèces de *Bartonella* spp disponibles au laboratoire de l'UMR BIPAR de l'ANSES, Maisons-Alfort. Pour cela, nous avons étudié, les possibilités de persistance chez *C. felis* de *B. henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. birtlesii* et *B. tribocorum*, ces deux dernières espèces étant adaptées aux rongeurs et jamais détectées chez ce vecteur, ainsi que la capacité de transmission horizontale et verticale de ces espèces *via* les œufs et les larves de cette puce. Ces résultats sont présentés et discutés dans l'Article II publié en 2013 dans *Comparative Immnulogy, Microbiology and Infectious Diseases* et intitulé : « ***Ctenocephalides felis*** **an in vitro potential vector for five** ***Bartonella*** **species** ».

En outre, *B. henselae* persisterait au moins neuf jours dans le tube digestif de la puce et serait capable de s'y multiplier tout en conservant son pouvoir infectant (Higgins et al., 1996). Ces résultats ont été rapportés dans une seule étude, et obtenus par PCR classique et immunofluorescence indirecte qui sont respectivement une méthode qualitative et une méthode semi-quantitative. La durée maximale de présence de *B. henselae* dans son vecteur n'a pas été à notre connaissance encore clairement définie. De plus, la capacité de multiplication au sein de *C. felis* nécessiterait également d'être évaluée plus finement. Aussi, nous avons développé un protocole de PCR en temps réel afin de répondre à ces deux objectifs. Nos travaux ont fait l'objet de l'Article III intitulé « **Assessment of persistence of** ***Bartonella henselae*** **in** ***Ctenocephalides felis*** » paru en 2013 dans *Applied and Environmental Microbiology*.

1. Contamination expérimentale de *C. felis* par *Bartonella* spp.

Les contaminations des puces de l'espèce *C. felis* par différentes souches de *Bartonella* spp ont été réalisées en laboratoire à l'aide de nourrisseurs artificiels à membrane.

1.1. Élevage de puces

Les puces utilisées proviennent d'un élevage de *C. felis* maintenues dans notre laboratoire depuis 1990. L'élevage a été mis en place à partir de puces récoltées sur un chat européen de la région toulousaine. Le gorgement des puces adultes, indispensable à la reproduction, est réalisé sur des chats Européens n'ayant reçu aucun traitement insecticide dans les trois mois précédents leur utilisation. Ces animaux sont placés en cage individuelle et sur caillebotis, dans un local maintenu à une température constante de 20 ± 1 °C et à un taux d'humidité relative de 55 ± 5 %. Le nombre de puces utilisé pour infester les chats dépend des besoins de production pour les différentes études. En moyenne, chaque chat reçoit entre 50 et 80 puces par semaine, avec un *sex ratio* proche de 1. Les œufs sont récoltés toutes les 48 heures sur un plateau métallique situé sous le caillebotis de chaque cage. Le contenu de chaque plateau est filtré par un tamis métallique de 630 µm de maille, retenant les divers débris et laissant ainsi passer les œufs et les déjections de puces. Ces œufs sont ensuite mélangés à un milieu nutritif constitué de sable, d'aliments pour carnivores sous forme de croquettes broyées, et de sang lyophilisé. L'évolution de l'œuf à l'adulte est achevée entre 15 et 21 jours, en étuve à une température de 27 ± 1 °C et à un taux d'humidité relative de 75 ± 5 %.

1.2. Gorgement artificiel sur nourrisseur à membrane et contamination des puces

Pour assurer le gorgement des puces, quelques heures ou quelques jours après l'émergence de leur cocon, un système de nourrisseur à membrane est utilisé (voir Figure 9). Dans ce système, l'eau maintenue à 38 °C circule dans la chambre extérieure du nourrisseur. La chambre intérieure fermée en partie basse par la membrane contient le sang. Les puces, en quantité connue, sont placées dans une petite cage dont la partie supérieure est mise en contact avec la membrane, à travers laquelle les puces piquent. Le maillage de la partie inférieure de la cage assure le passage des œufs et des déjections qui sont récoltées dans une boite en plexiglas placée sous les puces. Les déjections et les œufs sont ainsi séparés des puces. Le sang contenu dans le nourrisseur peut être contaminé par un ou plusieurs agents pathogènes en quantité connue et suivant les besoins des études. Ce système a été mis en œuvre pour les deux études publiées ci-après.

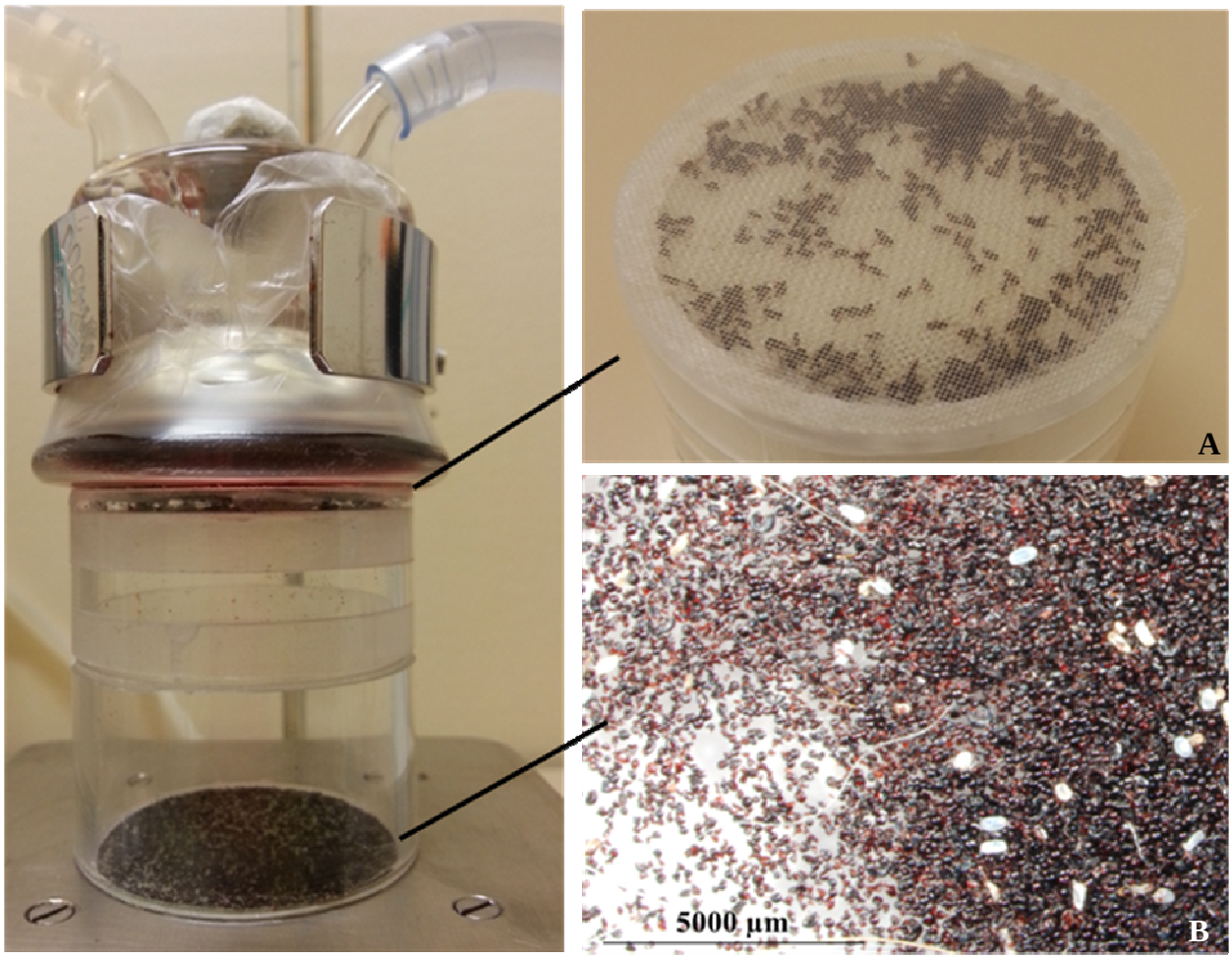


Figure 9. Système de gorgement des puces sur nourrisseur à membrane.
Les puces *C. felis* sont placées dans une petite cage (A) positionnée sous une membrane en parafilm. Le sang présent dans le nourrisseur contient du sang mélangé à une suspension de *Bartonella spp.* Les puces se nourrissent en piquant à travers la membrane, les déjections et les œufs tombent dans le collecteur placé sous la cage contenant les puces (B).

Pour nos études, 500 ou 1000 *C. felis* adultes, âgées de 10 à 12 jours, se sont gorgées avec du sang de chien contenant une suspension bactérienne d'une des cinq espèces de *Bartonella* spp suivante : *B. henselae*, *B. tribocorum*, *B.birtlesii*, *B. clarridgeiae* et *B. quintana*. Les puces sont exposées à ce sang contaminé pendant 48 heures. Ce sang est ensuite remplacé par du sang de chien sain jusqu'à la fin de chaque étude et renouvelé toutes les 24 heures. À chaque changement de sang, le nourrisseur est lavé et désinfecté et une membrane neuve est installée. De même, les puces, leurs déjections, les œufs émis et le reste de sang contenu dans le nourrisseur sont prélevés pour la recherche d'ADN bactérien par PCR.

En fonction des essais, le volume de sang nécessaire quotidiennement variait de 5 ml (pour une série de puces) à 15 ml (pour 3 séries de puces). Pour éviter toute variabilité, le même animal a été utilisé tout au long d'une série (6 à 12 jours de durée en fonction des essais). *C.*

felis étant peu spécifique et se nourrissant aussi bien sur chien que sur chat, il nous a été plus aisé d'utiliser du sang de chien pour nos études. Les chiens utilisés pesant entre 12 et 13 kg, un prélèvement de 15 ml de sang par jour correspond à environ 1 % de leur volume de sang total, respectant ainsi les recommandations de Diehl et al. (2001).

1.3. Viabilité des bactéries dans les puces ou leurs fèces

La mise en évidence d'ADN bactérien (une région conservée du gène de la citrate synthase ou le gène BH02390 pour *B. henselae*) dans les puces ou dans leurs déjections ne permet pas de déterminer s'il provient de bactéries vivantes ou mortes. Afin de démontrer la viabilité des bactéries mises en évidence par leur ADN, deux études préalables ont été réalisées. Dans un premier temps, les puces ont été nourries pendant 48 heures avec du sang de chien contenant une suspension de *B. henselae*, puis elles ont été nourries pendant trois jours avec du sang sain. La recherche d'ADN bactérien a été effectuée pendant les trois jours suivant le repas contaminant dans les puces, leurs déjections et dans le sang sain sur lequel elles se sont nourries. Tous les prélèvements effectués ont été positifs. Dans un second temps, les puces ont été exposées pendant 48 heures à du sang contenant une suspension de bactéries tuées préalablement dans une solution de kanamycine à 50 µg/ml pendant 24 heures à température ambiante. Elles ont ensuite été exposées à du sang sain pendant trois jours. L'efficacité d'action de la kanamycine contre *B. henselae* a été démontrée auparavant par l'absence de colonies suivant l'ensemencement d'une gélose au sang par cette solution. Au cours des 48 heures de gorgement avec la suspension de bactéries mortes, l'ADN de *B. henselae* a été détecté dans les puces et dans leurs déjections prouvant la contamination des puces. Après 24 heures de gorgement sur du sang sain, l'ADN bactérien n'est déjà plus détecté dans les puces, leurs déjections ni dans le sang du nourrisseur. Les mêmes résultats ont été obtenus au cours des deux jours de suivis supplémentaires. Ainsi, en 24 heures, les bactéries tuées sont éliminées de l'organisme de la puce. Seules les bactéries vivantes semblent ainsi pouvoir persister dans les puces. Par extension, cette étude montre que l'ADN bactérien détecté dans les puces et leurs déjections au-delà de 24 heures de gorgement sur sang sain correspond à de l'ADN de bactéries vivantes dans les puces.

2. ARTICLE II : survie chez C. felis de cinq espèces de Bartonella spp. au cours de 72 heures suivant un repas contaminant

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 36 (2013) 105–111

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cimid

Ctenocephalides felis an *in vitro* potential vector for five *Bartonella* species

Emilie Bouhsira[b,1], Yann Ferrandez[a,1], MaFeng Liu[a], Michel Franc[b], Henri-Jean Boulouis[a], Francis Biville[a,c,*]

[a] Université Paris-Est, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR INRA-Anses-UPEC-ENVA, F-94700 Maisons-Alfort, France
[b] Université de Toulouse, INP, ENVT, F-31076 Toulouse, France
[c] Pasteur Institute, 25-28, rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 July 2012
Received in revised form 12 October 2012
Accepted 27 October 2012

Keywords:
Bartonella henselae
Ctenocephalides felis
Arthropod vector

ABSTRACT

The blood-sucking arthropod *Ctenocephalides felis* has been confirmed as a vector for *Bartonella henselae* and is a suspected vector for *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella quintana* and *Bartonella koehlerae* in *Bartonella* transmission to mammals. To understand the absence of other *Bartonella* species in the cat flea, we have developed an artificial flea-feeding method with blood infected successively with five different *Bartonella* species. The results demonstrated the ability of these five *Bartonella* species to persist in *C. felis* suggesting an ability of fleas to be a potential vector for several *Bartonella* species. In addition, we demonstrated a regurgitation of *Bartonella* DNA in uninfected blood used to feed *C. felis* thus suggesting a potential horizontal transmission of *Bartonella* through *C. felis* saliva. On the contrary, no vertical transmission was detected in these artificial conditions.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bartonellae are Gram-negative bacteria belonging to the class of alpha-proteobacteria and have vertebrates as reservoir/host. Animal hosts of *Bartonellae* include cats, dogs, rabbits, bovines, and multiple rodent species [1,2]. Among the 26 species and subspecies of *Bartonella* described, about half are known to infect healthy or immunocompromised humans [3–5]. These bacteria can infect and invade erythrocytes and endothelial cells leading to persistent infections and some *Bartonella* species were associated with endocarditis, bacillary angiomatosis and myocarditis [6–9]. Among these species, three are associated with well characterized diseases: Carrion disease for *Bartonella bacilliformis* (*B. bacilliformis*), trench fever for *Bartonella quintana* (*B. quintana*) and cat scratch disease for *Bartonella henselae* (*B. henselae*) [10]. Various arthropods showed the ability to be potential vectors for transmission of *Bartonella* to a mammalian host. The list of arthropods species found naturally infected with *Bartonella* is still growing [11,12]. To date, five arthropods were confirmed as competent vectors for *Bartonella*: the sandfly *Lutzomyia verrucarum* for *B. bacilliformis* [13], the louse *Pediculus humanus humanus* for *B. quintana* [14], *Ctenophtalmus nobilis* for *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* [15] and *Ctenocephalides felis* (*C. felis*) for *B. henselae* [16] and *Ixodes ricinus* for *Bartonella birtlesii* [17]. *C. felis* commonly called the "cat's flea" is the most common external parasite found worldwide on cats and dogs [18–20]. There are four recognized subspecies of *C. felis* all of them mainly parasites of carnivores: *C. felis strongylus* (Jordan, 1925) and *C. felis damarensis* [21] mainly found in Africa, *C. felis orientis* in southeast Asia and in the East Indies [22] and *C. felis felis* (Bouché, 1835) in North

* Corresponding author at: Unité Postulante Infections Bactériennes Invasives, Pasteur Institute, 25-28, rue du Dr. Roux, 75015 Paris, France. Tel.: +33 149772253; fax: +33 149772257.
E-mail address: fbiville@pasteur.fr (F. Biville).
[1] These authors contributed equally to this work.

0147-9571/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.10.004

America, North Africa and Europe. *C. felis* is a sedentary parasite spending almost its entire life on their host [23] and rarely move from on host to the other [24]. Once adult flies had acquired a host, the blood meal starts almost immediately. Female *C. felis* can gain until 15 times their weight in blood; they can consume 13.6 μL of blood daily [23]. Real Time PCR assays performed on *C. felis* fed on dogs showed that after 15 min spent on their host almost all fleas were similarly engorged and the amount of blood uptake was 1.1 nL for both males and females. Saturation uptake was observed at 30 min and 60 min after the introduction of fleas on dogs and was 118 and 100 nL of blood respectively [25]. Feces (or dejection) are small dark pellets of dried blood and their emission occurs quickly after the beginning of the blood meal: on membrane feeding system they were excreted within the 8–9 min after the contact with blood [23]. Consumption of blood is necessary before *C. felis* could initiate reproduction. Mating occurs after fleas have fed. Females lay between 20 and 30 eggs per day. Laid eggs fall onto the ground and after three larval stages give rise to nymphs followed by adults. After hatching, the young adults or imago, jump onto the host animal [23,26]. *C. felis* has been experimentally shown as a competent vector for *B. henselae* transmission. Fleas collected from bacteriemic cats were placed on five specific-pathogen-free cats. After 2 weeks, four cats were found bacteriemic for *B. henselae* [16]. *C. felis* acquire *B. henselae* after feeding on infected cat and the bacteria persists in fleas and feces [27,28]. The potential mechanisms of transmission of *B. henselae* among cats could include the inoculation of contaminated flea feces through skin lesions, ingestion of infected fleas or infected feces. A successful transmission was demonstrated after intradermal injection of flea feces to cats [29]. More recently Bradbury and Lappin confirmed that *C. felis* can transmit *B. henselae* among cats and that cats treated with a topical combination of imidacloprid and moxidectin were efficiently protected from fleas infestations and thus from *B. henselae* transmission [30]. For human *B. henselae* infection could occur when flea fecal material is introduced via cat scratch or bite [31]. The contamination of a woman with B. quintana, following a bite by a feral cat, was demonstrated. Although the contamination route of cats in this study remained unknown authors suggested a flea transmission to the cats [32]. *B. quintana* infections were reported for patients with close contact with cats and flea-infested kitten [33,34]. DNA of *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* and *B. koehlerae* was detected in fleas collected in France. These findings led the authors to propose that *C. felis* was a potential vector for *B. clarridgeiae*, *B. quintana* and *B. koehlerae* [35]. The detection of these species in fleas was also described in many other countries [36]. Besides *Bartonella* transmission, fleas can be vectors of several other pathogens such as *Mycoplasma* spp., *Rickettsia felis* [35–37] and are intermediate host for the tapeworm *Dipylidium caninum* present in both cats and dogs [38]. The absence of others *Bartonella* species than *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* and *B. koehlerae* in cat fleas may be related to the specificity of fleas toward their hosts which are animal reservoirs for these four *Bartonella* species. Another explanation may be that only *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* and *B. koehlerae* are able to survive and develop inside *C. felis*. To investigate this question, we undertook the feeding of *C. felis* with blood artificially infected with five *Bartonella* species whose genomes were sequenced. The vertical transmission of these five *Bartonella* species in *C. felis* was checked. Finally, we investigated for the contamination of free-fresh-blood by *C. felis* already fed on infected blood.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Five reference strains of Bartonella were used: *B. henselae* Houston-1 ATCC 49882 [39], *B. tribocorum* CIP 105476T [40], *B. quintana* str. Toulouse [41], *B. birtlesii* LL-WM9 [42] and *B. clarridgeiae* 73 [43].

2.2. Media and growth conditions

All *Bartonella* strains were grown on sheep blood agar medium (CBA) (BioMerieux, Craponne, France) in humidified atmosphere at 35 °C in 5% CO_2 atmosphere. For flea infection assays, *Bartonella* strains were collected after 5 days growth on CBA plates and suspended in PBS sterile buffer. The bacterial suspension was diluted with PBS to obtain a cell density of 2×10^8 bacteria per ml. The survival of bacteria in PBS buffer was not significantly decreased after 24 h storage at room temperature (data not shown). To obtain dead *Bartonella*, Kanamycin was added to bacterial suspension at 50 μg/ml final concentration and incubates one night at room temperature.

2.3. Fleas maintenance and supply

Strain *C. felis* (Siphonaptera: Pulicidae) originating from a wild strain harvested from a cat has been maintained on cat under laboratory conditions since 1990. A new generation is obtained every 2–4 weeks. Fleas were controlled to be PCR negative for *Bartonella* spp. using primers CS.140 5′-TTACTTATGATCCTGGTTTTAC-3′ and BhCS 5′-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3′ [44].

2.4. Feeding of C. felis with Bartonella spp.-infected blood

Dog blood used in all experiments was obtained from 3 beagles (15 ml obtained from each dog) from the Ectoparasite Laboratory of the National Veterinary School in Toulouse, France. The absence of *Bartonella* spp. in the blood of these dogs was confirmed by PCR using primers CS.140 5′-TTACTTATGATCCTGGTTTTAC-3′ and BhCS 5′-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3′ [44]. Lithium heparin-coated vacutainer tubes (Venosafe, Terumo Europe) were used to draw blood by venipuncture. Blood functional complement was deactivated by maintaining blood samples at room temperature for 1 h after blood test and before storing them at 4 °C. Blood samples were stored less than 48 h at 4 °C. When required, Kanamycin, that kills *B. henselae*, was added to blood at 50 μg/ml final concentration. Kanamycin was previously determined to have no impact on *C. felis* feeding, viability and eggs production (data not shown). 500 unfed (males and females aged between 8–10

days) fleas were placed in Plexiglas box in contact with a glass feeder closed at the bottom by a Parafilm membrane. To stimulate fleas blood-feeding, a constant temperature (38.5 °C) was maintained by a water-jacket circulation system through the glass feeder. For blood infection, 500 μL of *Bartonella* spp. suspension at a concentration of approximately 2×10^8 bacteria per ml in PBS were added to 5 ml of blood. The viability of *Bartonella* spp. after 2 h incubation in blood was performed by the numeration of bacteria on sheep blood agar plates. Fleas were fed on glass feeders for 5 days. The first two days with blood infected with bacteria and the following 3 days with uninfected blood. Day 0 stands for the first day fleas were in contact with infected blood. On day 0 before exposure to contaminated blood, fleas were sampled and controlled to be PCR negative for *Bartonella*. Every 24 h, the glass feeder was cleaned with a quaternary ammonium disinfectant (Anios, D.D.S.H., Laboratoires Anios) and then with clear water, a new Parafilm membrane was stretched and blood was changed. At the same time, 1 ml of blood was collected from the feeder and dejections (feces), eggs and 3–5 still alive engorged fleas were collected. Ethanol 70% was added to fleas eggs and dejections samples and samples were stored at −20 °C until PCR analysis were performed.

2.5. Extraction of DNA from samples

DNA was extracted from all samples by using the Nucleospin Tissue kit according to the company's instructions (NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel). The quantity of biological material used for DNA extraction was 3–5 fleas, about 30–40 mg of feces, around twenty eggs and 200 μL of blood. The fleas, eggs and feces were incubated overnight at 56 °C for the pre-lyse step. Before the pre-lyse step, fleas were incised with a scalpel. For all sample, the final elution volume was 100 μL. The concentration of DNA extraction in all samples was calculated using Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific).

2.6. PCR amplification

DNA of *Bartonella* species was detected by amplification of a 1137-bp fragment of the *gltA* gene by primers CS.140 5′-TTACTTATGATCCTGGTTTTAC-3′ and BhCS 5′-AATGCAAAAAGAACAGTAAACA-3′ [44]. Comparison of *Bartonella* genomes yet sequenced have shown that the gene BH02390 was only present in the *B. henselae strain Houston 1* genome (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php). This gene encodes for a putative ABC transporter permease protein. Two primers, bh2390fo 5′-GGTGAATGTGTGCAAAGTTTTAAG-3′ and bh2390re 5′-CCAATAAACGCCAACAAAGAC-3′ were designed to amplify a 1052-bp fragment containing *B. henselae bh02390* gene. DNA of *C. felis* was detected by amplification of a fragment of *C. felis* 18S rDNA using primers Cf18S 5′-TGCTCACCGTTTGACTTGG-3′ and Cf18S 5′-GTTTCTCAGGCTCCCTCTCC-3′ [45]. Amplifications were performed with at least 20 ng of DNA extract for feces and blood samples and 10 ng of DNA extract for fleas. Each reaction was conducted in a total volume of 20 μL with 0.5 μM of each primer, 200 μM of each dNTP, 4 μL of 5× PCR buffer G/C, and 0.02 U/μL of Taq DNA polymerase (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific). The PCR program was: an initial denaturation step for 30 s at 98 °C followed by 35 cycles of denaturation for 10 s at 98 °C, annealing for 30 s at 55 °C, and extension for 1 min at 72 °C; and a final extension step at 72 °C for 7 min. The amplicons were analyzed using electrophoresis on a 1.2% agarose gel, followed by ethidium bromide staining and visualization on a UV transilluminator.

3. Results

3.1. B. henselae persistence in C. felis

We first validated our flea feeding method with blood infected with *B. henselae*. During 5 days, fleas were fed with infected blood and the presence of *B. henselae* was assessed in fleas and their feces using PCR method (Table 1). Previous paper showed that *B. henselae* could persist in the flea gut for up to 9 days since they were detected in flea feces [27]. An increase of the *B. henselae* population inside the gut flea was shown, using immunofluorescence [27]. We investigated the same question by comparing the ability of living or dead bacteria to be detected inside the flea. Fleas were fed two days with blood infected with *B. henselae* and then up to 5 days with uninfected blood. Same experiments were performed in parallel with dead bacteria obtained after one night exposure to Kanamycin before blood inoculation. As seen in Table 1, DNA of *B. henselae* can be detected in fleas and flea feces from day 1 to day 5. This show a persistence of the bacteria inside the fleas even when feeding with inoculated blood stopped. When killed bacteria were used to feed fleas, *B. henselae* DNA was detected only on day 1 and 2. For day 3 to day 5, only PCR performed with primers specific to *C. felis* produce amplification fragment (Table 1). No amplification was obtained with primers specific for *B. henselae* thus showing that bacteria were rapidly cleared from fleas and feces when feeding with infected blood ceased.

3.2. No vertical transmission of B. henselae in C. felis

To determine a potential vertical transmission of *B. henselae* in *C. felis*, eggs laid by *C. felis* infected with *B. henselae* were harvested and tested by PCR (Table 2). As seen in Table 2, DNA of *B. henselae* was not detected in eggs obtained on day 2 to day 5 while DNA of *C. felis* was detected. These results show the absence of *B. henselae* in the eggs laid by *C. felis* infected with *B. henselae* and suggest that there is no vertical transmission in these conditions.

3.3. Regurgitation of B. henselae DNA during the C. felis in vitro blood-meal

Many studies suggested that the biting flies, lice, fleas, or ticks can transmit *Bartonella* spp. during the blood meal [46]. *B. henselae* and *B. birtlesii* were demonstrated as being able of replication in the ticks *I. ricinus* salivary glands, after an experimental feeding on membrane with *B. henselae* or *B. birtlesii*-contaminated blood [47,17]. Using electronic microscopy, ricketsia like organisms were identified in

Table 1
Detection of *B. henselae* alive or killed in the feces, fleas and blood.

	Sampling day	*B. henselae strain Houston 1*		*B. henselae strain Houston 1* killed	
		C. felis 18S rDNA fragment	*BH2390* fragment	*C. felis 18S rDNA* fragment	*BH2390* fragment
Feces	Day 1	+	+	+	+
	Day 2	+	+	+	+
	Day 3	+	+	+	–
	Day 4	+	+	+	–
	Day 5	+	+	+	–
Fleas	Day 0	+	–	+	–
	Day 1	+	+	+	+
	Day 2	+	+	+	+
	Day 3	+	+	+	–
	Day 4	+	+	+	–
	Day 5	+	+	+	–
Blood	Day 0	–	–	–	–
	Day 1	+	+	+	+
	Day 2	+	+	+	+
	Day 3	+	+	+	–
	Day 4	+	+	+	–
	Day 5	+	+	+	–

Detection of *B. henselae* DNA was performed by PCR using primer specific BH2390. Detection of *C. felis* DNA was performed by PCR using primers specific *C. felis 18S rDNA*. Results obtained on days when *C. felis* were fed with blood infected with *B. henselae* alive or killed, are highlighted in gray. +, positive; –, negative.

salivary glands of *C. felis* fed on cats infected by *R. felis* [45]. This result suggests a horizontal transmission of this bacterium by *C. felis*. The question raised in the current study was to determine if the fleas *C. Felis*, was able to regurgitate *Bartonella* spp. DNA while the blood meal. Fleas were fed with infected blood during 2 days and then with uninfected blood during 3 days. *B. henselae* DNA was successfully amplified in all blood samples from day 1 to day 5 (Table 1). The presence of *B. henselae* DNA in blood, after feeding, days 3–5 suggested then a potential regurgitation of the pathogens during the flea blood-meal. In addition, no *B. henselae* DNA was amplified from the blood samples collected from day 3 to day 5, after feeding, when the fleas were fed the first two days with blood infected with killed *B. henselae* (Table 1). This result shows that regurgitation of *B. henselae* DNA by *C. felis* occurred only with living bacteria.

3.4. Persistence of *B. tribocorum, B. quintana, B. birtlesii and B. clarridgeiae* in *C. felis*

Among the 26 species or subspecies of *Bartonella* known, only DNA of *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana* and *B. koehlerae* were found in the flea *C. felis* [12,36]. These observations lead to questioning whether there is a specificity of fleas toward reservoir hosts of these four *Bartonella* species or whether only these *Bartonella* species can persist inside *C. felis*. To answer this question, *C. felis* has been fed with blood infected with living *B. tribocorum*, *B. quintana*, *B. birtlesii* or *B. clarridgeiae*. DNA of *B. claridgiae* and *B. quintana* was detected in feces and fleas and from day 1 to day 5 even when fleas were fed with non infected blood from day 3 to day 5 (Table 3). Also, similarly with *B. henselae*, positive PCR detection suggests regurgitation of *B. claridgiae* and *B. quintana* in blood. These results demonstrated the ability

Table 2
Detection of *Bartonella* species in eggs.

		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
B. henselae strain Houston 1	*C. felis 18S rDNA* fragment	/	/[a]	+	+	+	+
	GltA fragment	/	/[a]	–	–	–	–
B. tribocorum CIP 105476	*C. felis 18S rDNA* fragment	/	/[a]	+	+	+	+
	GltA fragment	/	/[a]	–	–	–	–
B. quintana str. Toulouse	*C. felis 18S rDNA* fragment	/	/[a]	+	+	+	+
	GltA fragment	/	/[a]	–	–	–	–
B. birtlesii LL-WM9	*C. felis 18S rDNA* fragment	/	/[a]	+	+	+	+
	GltA fragment	/	/[a]	–	–	–	–
B. clarridgeiae 73	*C. felis 18S rDNA* fragment	/	/[a]	+	+	+	+
	GltA fragment	/	/[a]	–	–	–	–

Detection of DNA of *Bartonella* species was performed by PCR using primer specific *gltA*. Detection of *C. felis* DNA was performed by PCR using primers specific *C. felis 18S rDNA*. Results obtained on days when *C. felis* were fed with blood infected by *B. henselae* alive, are highlighted in gray. +, positive; –, negative; /, no samples.

[a] Not laying.

Table 3
Detection of *Bartonella* species in the feces, fleas and blood.

		Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
B. henselae strain Houston 1	Fleas	–	+	+	+	+	+
	Feces	/	+	+	+	+	+
	Blood	–	+	+	+	+	+
B. tribocorum CIP 105476	Fleas	–	+	+	+	+	+
	Feces	/	+	+	+	+	+
	Blood	–	+	+	+	+	+
B. quintana str. Toulouse	Fleas	–	+	+	+	+	+
	Feces	/	+	+	+	+	+
	Blood	–	+	+	+	+	+
B. birtlesii LL-WM9	Fleas	–	+	+	+	+	+
	Feces	/	+	+	+	+	+
	Blood	–	+	+	+	+	+
B. clarridgeiae 73	Fleas	–	+	+	+	+	+
	Feces	/	+	+	+	+	+
	Blood	–	+	+	+	+	+

Detection of *Bartonella* species DNA was performed by PCR using primer specific *gltA*. Results obtained on days when *C. felis* were fed with blood infected with *Bartonella* spp., alive, are highlighted in gray. +, positive; –, negative; /, no samples.

of *B. birtlesii* and *B. tribocorum* to persist in *C. felis* like *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, and *B. quintana*. Similarly with *B. henselae* no vertical transmission of *B. tribocorum, B. quintana*, *B. birtlesii* and *B. clarridgeiae* has been demonstrated in *C. felis* (Table 2).

4. Discussion

In the present study, we examined whether some species of *Bartonella* had a particular specificity for the cat flea, or whether the detection of a narrow range of species in this arthropod could be explained by the host-specificity of the cat flea to domestic animals that are reservoir of a restricted amount of *Bartonella* species. To answer this question, fleas were fed *in vitro* with Bartonella species previously isolated from cat fleas such as *B. henselae*, *B. clarrigeiae* and *B. quintana*, and also with *Bartonella* species not previously isolated from cat fleas such as *B. birtlesii* and *B. tribocorum*. In our artificial conditions of feeding no difference of persistence in the cat flea or in feces excretion was observed among the tested species. Thus only a specificity of *C. felis* toward its animal hosts can explain that only four *Bartonella* species were detected in *C. felis*. *C. felis* has been reported to parasitize many species of wild and domestic animals including wild cats [48], goats, sheep, cattle, chicken, bears, raccoon, ferrets, opossums, lizards, rats and mice [49–52] but is mainly associated with cats and dogs and represents the great majority of fleas in human homes [53]. Hosts that are similar in their ecologies or that share the same home are likely to share flea species and thus have the potential of hosting the same pathogens [53]. *C. felis* are believed of remaining on their host for their entire adult life, with only up to 15% of adult *C. felis* shown to move to another host [24]. Despite a low switch rate tendency of the cat flea, Bradbury and Lappin revealed evidence of flea transmission among cats in controlled conditions. The use of an insecticide product was able to block flea and then *Bartonella* transmission among the treated cats [30].

B. henselae, *B. clarridgeiae* and *B. koehlerae* have cats as mammalian reservoir and are known as important zoonotic species [54]. *B. birtlesii* and *B. tribocorum* have respectively rats and mice as reservoir. *B. quintana* have human as mammalian reservoir but only one study has detected *B. quintana* in cat fleas [35]. Thus the sedentary behavior of *C. felis* may explain the absence of detection of *B. birtlesii* and *B. tribocorum* in *C. felis* evidenced by epidemiological studies.

Many studies suggested that the biting flies, lice, fleas, or ticks can transmit *Bartonella* spp. during the blood meal [11,16,55,56,15,57,47]. One of the first cases of transmission of *Bartonella* by blood feeding was described with the sandflies *L. verrucarum* who could transfer *B. bacilliformis* to monkeys [58]. In *C. felis*, the detection of Rickettsia-like organisms in salivary glands of *C. felis*, previously fed on a cat infected by *R. felis*, suggest a horizontal transmission of this bacterium by *C. felis* [45]. Indeed, flea blood meal has been well described and starts with the injection in the host of a small amount of saliva before blood aspiration [23]. Thus mouthparts act as syringe introducing in the host pathogens contained in the saliva. *B. henselae* and *B. birtlesii* were demonstrated as being able of replication in the ticks *I. ricinus* salivary glands, after an experimental feeding on membrane with *B. henselae* or *B. birtlesii*-contaminated blood [47,17]. *B. birtlesii* DNA was regurgitated into uncontaminated blood during feeding [17]. In the current study, we demonstrated a regurgitation of *B. henselae* DNA in fresh blood suggesting that it may be possible for *Bartonella* to be transmitted during the flea blood meal. In an other study [29] the only mode of contamination of cats was demonstrated via intradermal injection of fleas contaminated feces.

Some viruses and a few symbiotic bacteria showed the ability to have a vertical transmission in some arthropod vectors. These vertical transmissions depend on several factors such as the specificity between the transmitted species and its arthropod, the environment or the geographical location [59–63]. In the sheep louse *Melophagus ovinus*, 100% of 20 adults and 10 pupae collected in France contained *Bartonella* DNA, suggesting a vertical transmission [64]. For the cat flea, the only available data of vertical

transmission of bacteria concern *R. felis*. But, these data are contradictory. Indeed, in 2002 Wedincamp et al. demonstrated a vertical transmission of the species *R. felis* in the cat flea [65,39] while in 2011, Hirunkanokpun et al. did not detect any vertical transmission [66]. In our study, the experimental conditions did not lead to any vertical transmission in fleas as no *Bartonella* DNA was amplified in laid eggs but these conclusions cannot be extended to natural conditions. Indeed *Bartonella* DNA was amplified in reproductive tissues of fleas collected from several mammals following field samplings. This led the authors to conclude to a potential vertical transmission of *Bartonella* in fleas [67].

Humans and other mammals are the major reservoirs of several *Bartonella* species but can also be infected by many other *Bartonella* species for which they are not the natural reservoir. These "accidental" infections could include the bites of arthropod vectors such as fleas, sand flies, lice, biting flies and ticks. These arthropods can be infected with various *Bartonella* species and thus transmit them to their animal hosts [46,36]. We have experimentally demonstrated that *C. felis* may be a potential vector of several species of *Bartonella* which some of them do not have the cat as natural reservoir. The tested species can be transmitted via flea feces or during the flea blood meal.

Further investigations are needed, including natural or experimental infections of different potential vectors with *Bartonella* species, to assess whether this adaptation can be extrapolated to different arthropods species.

Acknowledgments

This work was supported by the Pasteur Institute, the Centre National de la Recherche Scientifique (URA2172), the Agence Nationale pour la Recherche [ANR-06-MIME-019-01], Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Yann Ferrandez was supported by a grant from DIM Malinf (dim100103). Ma Feng Liu was supported by the grant of China Scholarship Council. We thank Elisabeth Petit from UMR BIPAR INRA-Anses-UPEC-ENVA, Sonia Gounaud and Martine Roques from ENVT for their technical support.

References

[1] Breitschwerdt EB, Kordick DL. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clinical Microbiology Reviews 2000;13:428–38.
[2] Chomel BB, Kasten RW. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. Journal of Applied Microbiology 2010;109:743–50.
[3] Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB, Kasten RW, Vayssier-Taussat M, Birtles RJ, et al. Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Veterinary Research 2009;40:29.
[4] Minnick MF, Battisti JM. Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. Future Microbiology 2009;4:743–58.
[5] Mogollon-Pasapera E, Otvos Jr L, Giordano A, Cassone M. Bartonella: emerging pathogen or emerging awareness? International Journal of Infectious Diseases 2009;13:3–8.
[6] Brouqui P, Raoult D. New insight into the diagnosis of fastidious bacterial endocarditis. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2006;47:1–13.
[7] Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. Veterinary Research 2005;36:383–410.
[8] Koehler JE, Quinn FD, Berger TG, LeBoit PE, Tappero JW. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. New England Journal of Medicine 1992;327:1625–31.
[9] Koehler JE, Sanchez MA, Garrido CS, Whitfeld MJ, Chen FM, Berger TG, et al. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. New England Journal of Medicine 1997;337:1876–83.
[10] Harms A, Dehio C. Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. Clinical Microbiology Reviews 2012;25:42–78.
[11] Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB. *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2011;34:299–314.
[12] Billeter SA, Levy MG, Chomel BB, Breitschwerdt EB. Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. Medical and Veterinary Entomology 2008;22:1–15.
[13] Noguchi H, Battistini TS. Etiology of oroya fever: I. Cultivation of *Bartonella bacilliformis*. Journal of Experimental Medicine 1926;43:851–64.
[14] van der Laan JR, Smit RB. Back again: the clothes louse (*Pediculus humanus* var. *corporis*). Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde 1996;140:1912–5.
[15] Bown KJ, Bennet M, Begon M. Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. Emerging Infectious Diseases 2004;10:684–7.
[16] Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. Journal of Clinical Microbiology 1996;34:1952–6.
[17] Reis C, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, et al. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. PLOS Neglected Tropical Diseases 2011;5:e1186.
[18] Alcaino HA, Gorman TR, Alcaino R. Flea species from dogs in three cities of Chile. Veterinary Parasitology 2002;105:261–5.
[19] Gracia MJ, Calvete C, Estrada R, Castillo JA, Peribanez MA, Lucientes J. Fleas parasitizing domestic dogs in Spain. Veterinary Parasitology 2008;151:312–9.
[20] Franc M, Cadiergues MC. Comparative activity in dogs of deltamethrin- and diazinon-impregnated collars against *Ctenocephalides felis*. American Journal of Veterinary Research 1998;59:59–60.
[21] Husseneder C, Garner SP, Foil LD, Macaluso KR. Development of microsatellites for genetic analyses and population assignment of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology 2010;47:1028–33.
[22] Lewis RE. Notes on the geographical distribution and host preferences in the order Siphonaptera. 1. Pulicidae. Journal of Medical Entomology 1972;9:511–20.
[23] Dryden MW, Rust MK. The cat flea: biology, ecology and control. Veterinary Parasitology 1994;52:1–19.
[24] Rust MK. Interhost movement of adult cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology 1994;31:486–9.
[25] Wang C, Mount J, Butler J, Gao D, Jung E, Blagburn BL, et al. Real-time PCR of the mammalian hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene for analysis of flea (*Ctenocephalides felis*) feeding patterns on dogs. Parasites and Vectors 2012;5:4.
[26] Franc M, Cadiergues MC. Susceptibility of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) to four pyrethroids. Parasite 1997;4:91–3.
[27] Higgins JA, Radulovic S, Jaworski DC, Azad AF. Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology 1996;33:490–5.
[28] Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp Jr J, Foil LD. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology 2002;39:915–9.
[29] Foil L, Andress E, Freeland RL, Roy AF, Rutledge R, Triche PC, et al. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephaides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. Journal of Medical Entomology 1998;35:625–8.
[30] Bradbury CA, Lappin MR. Evaluation of topical application of 10% imidacloprid–1% moxidectin to prevent *Bartonella henselae* transmission from cat fleas. Journal of the American Veterinary Medical Association 2010;236:869–73.
[31] Eisen RJ, Gage KL. Transmission of flea-borne zoonotic agents. Annual Review of Entomology 2012;57:61–82.
[32] Breitschwerdt EB, Maggi RG, Sigmon B, Nicholson WL. Isolation of *Bartonella quintana* from a woman and a cat following putative bite transmission. Journal of Clinical Microbiology 2007;45:270–2.

[33] Drancourt M, Moal V, Brunet P, Dussol B, Berland Y, Raoult D. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* infection in a seronegative hemodialyzed patient. Journal of Clinical Microbiology 1996;34:1158–60.
[34] Raoult D, Drancourt M, Carta A, Gastaut JA. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* isolation in patient with chronic adenopathy, lymphopenia, and a cat [letter]. Lancet 1994;343:977.
[35] Rolain JM, Franc M, Davoust B, Raoult D. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. Emerging Infectious Diseases 2003;9:338–42.
[36] Tsai KH, Huang CG, Fang CT, Shu PY, Huang JH, Wu WJ. Prevalence of *Rickettsia felis* and the first identification of *Bartonella henselae* Fizz/CAL-1 in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from Taiwan. Journal of Medical Entomology 2011;48:445–52.
[37] Barrs VR, Beatty JA, Wilson BJ, Evans N, Gowan R, Baral RM, et al. Prevalence of *Bartonella* species, *Rickettsia felis*, haemoplasmas and the Ehrlichia group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. Australian Veterinary Journal 2010;88:160–5.
[38] Guzman RF. A survey of cats and dogs for fleas: with particular reference to their role as intermediate hosts of *Dipylidium caninum*. New Zealand Veterinary Journal 1984;32:71–3.
[39] Solder B, Allerberger F, Covi B, Maurer K, Scheminzky C, Kreczy A, et al. Cat scratch disease caused by *Bartonella henselae*. Immunitat und Infektion 1995;23:228–31.
[40] Heller R, Riegel P, Hansmann Y, Delacour G, Bermond D, et al. *Bartonella tribocorum* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rats. International Journal of Systematic Bacteriology 1998;48(Pt 4):1333–9.
[41] Alsmark CM, Frank AC, Karlberg EO, Legault BA, Ardell DH, et al. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004;101:9716–21.
[42] Bermond D, Heller R, Barrat F, Delacour G, Dehio C, et al. *Bartonella birtlesii* sp. nov., isolated from small mammals (*Apodemus* spp.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2000;50(Pt 6):1973–9.
[43] Yamamoto K, Chomel BB, Kasten RW, Hew CM, Weber DK, Lee WI, et al. Infection and re-infection of domestic cats with various *Bartonella* species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II. Veterinary Microbiology 2003;92:73–86.
[44] Birtles RJ, Raoult D. Comparison of partial citrate synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. International Journal of Systematic Bacteriology 1996;46:891–7.
[45] Reif KE, Stout RW, Henry GC, Foil LD, Macaluso KR, et al. Prevalence and infection load dynamics of *Rickettsia felis* in actively feeding cat fleas. PLoS One 2008;3:e2805.
[46] Tsai YL, Lin CC, Chomel BB, Chuang ST, Tsai KH, Wu WJ, et al. *Bartonella* infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2011;11:1023–30.
[47] Cotte V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, et al. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. Emerging Infectious Diseases 2008;14:1074–80.
[48] Lappin MR, Griffin B, Brunt J, Riley A, Burney D, Hawley J, et al. Prevalence of *Bartonella* species, haemoplasma species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. Journal of Feline Medicine and Surgery 2006;8:85–90.
[49] Dipeolu OO, Ayoade GO. Various hosts of *Ctenocephalides felis* strongylus. Veterinary Quarterly 1982;4:191–2.
[50] Menier K, Beaucournu JC. Taxonomic study of the genus Ctenocephalides Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters. Journal of Medical Entomology 1998;35:883–90.
[51] Beaucournu JC, Menier K. The genus Ctenocephalides Stiles and Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae). Parasite 1998;5:3–16.
[52] Rust MK, Dryden MW. The biology, ecology, and management of the cat flea. Annual Review of Entomology 1997;42:451–73.
[53] Bitam I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. International Journal of Infectious Diseases 2010;14:e667–76.
[54] Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB. Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. Journal of the American Veterinary Medical Association 2004;224:1270–9.
[55] Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. Journal of Clinical Microbiology 2001;39:1221–6.
[56] Guptill L. Bartonellosis. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 2003;33:809–25.
[57] Podsiadly E, Chmielewski T, Marczak R, Sochon E, Tylewska-Wierzbanowska S. *Bartonella henselae* in the human environment in Poland. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2007;39:956–62.
[58] Noguchi H. The etiology of Verruga Peruana. Journal of Experimental Medicine 1927;45:175–89.
[59] Saridaki A, Bourtzis K. Wolbachia: more than just a bug in insects genitals. Current Opinion in Microbiology 2010;13:67–72.
[60] Leigh Jr EG. The evolution of mutualism. Journal of Evolutionary Biology 2010;23:2507–28.
[61] Chen Y, Evans J, Feldlaufer M. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology 2006;92:152–9.
[62] Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. Lancet Infectious Diseases 2007;7:319–27.
[63] Knell RJ, Webberley KM. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 2004;79:557–81.
[64] Halos L, Jamal T, Maillard R, Girard B, Guillot J, Chomel B, et al. Role of Hippoboscidae flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. Applied and Environment Microbiology 2004;70:6302–5.
[65] Wedincamp Jr J, Foil LD. Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouche). Journal of Vector Ecology 2002;27:96–101.
[66] Hirunkanokpun S, Thepparit C, Foil LD, Macaluso KR. Horizontal transmission of *Rickettsia felis* between cat fleas, *Ctenocephalides felis*. Molecular Ecology 2011;20:4577–86.
[67] Brinkerhoff RJ, Kabeya H, Inoue K, Bai Y, Maruyama S. Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and reproductive tissues of fleas collected from sympatric mammals. ISME Journal 2010;4:955–8.

AEM Journals.ASM.org

Assessment of Persistence of *Bartonella henselae* in *Ctenocephalides felis*

Emilie Bouhsira,[a] Michel Franc,[a] Henri-Jean Boulouis,[b] Philippe Jacquiet,[a] Isabelle Raymond-Letron,[c] Emmanuel Liénard[a]

Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires, INP-ENVT, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France[a]; Université Paris-Est, UMR BIPAR, INRA-Anses-UPEC-ENVA, Maisons-Alfort, France[b]; Université de Toulouse, UPS-INP-ENVT, UMS006, Laboratoire d'Histopathologie, Toulouse, France[c]

***Bartonella henselae* (*Rhizobiales*: *Bartonellaceae*) is a Gram-negative fastidious bacterium of veterinary and zoonotic importance. The cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) is the main recognized vector of *B. henselae*, and transmission among cats and humans occurs mainly through infected flea feces. The present study documents the use of a quantitative molecular approach to follow the daily kinetics of *B. henselae* within the cat flea and its excreted feces after exposure to infected blood for 48 h in an artificial membrane system. *B. henselae* DNA was detected in both fleas and feces for the entire life span of the fleas (i.e., 12 days) starting from 24 h after initiation of the blood meal.**

Bartonella henselae is a Gram-negative facultative intracellular bacterium of veterinary and zoonotic importance distributed worldwide (1). At present, its major competent vector is the cat flea, *Ctenocephalides felis* (2). Viable *B. henselae* or its DNA has also been detected in several other blood-feeding arthropods, such as ticks (*Dermacentor* spp., *Ixodes* spp.) (3–6) and biting flies (*Haematobia* spp., *Stomoxys* spp.) (7); however, no evidence of the role of these insects as competent vectors exists. Cats, particularly kittens, represent the major reservoir of *B. henselae* (8). Infected cats are usually asymptomatic but experience chronic recurring bacteremia (9). Clinical signs observed after experimental infection of cats include febrile illness, transient anemia, neurological dysfunction, and endocarditis (10–12).

In humans, *B. henselae* is the causative agent of cat scratch disease (CSD), a syndrome characterized by a persistent regional lymphadenopathy that is usually self-limiting within 2 to 4 months in immunocompetent patients (13). However, infected immunocompromised individuals (such as those with AIDS or organ transplant recipients) can develop severe vasoproliferative tumors known as bacillary angiomatosis and bacillary peliosis (13, 14, 15).

Although the prevalence of *B. henselae* infection in cats fluctuates significantly, the highest levels of infection occur in temperate regions where conditions are most favorable for the development of *C. felis* (1, 16, 17). The seroprevalence of antibodies against *B. henselae* in healthy cat populations ranges from 25 to 45% throughout the world (17). Nonetheless, in North America, where *C. felis* is endemic, seroprevalence was reported to reach up to more than 90% in some cat colonies (18). Fleas acquire *B. henselae* during their blood meal on highly bacteremic cats (16). Once in the arthropod vector, the bacterium seems to replicate within the gut and is then excreted in the feces (19, 20). While transmission by flea saliva still requires further investigation (21), the exposure to infected flea feces appears to be the main route of infection for cats and, accidentally, humans (22–24). *B. henselae* can also be inoculated into the skin of a naive host via scratching or biting by a flea-contaminated carrier animal (16, 20, 25).

Knowledge of the kinetics of *B. henselae* in *C. felis* and its feces throughout the life span of the cat flea is an essential prerequisite for devising efficient control strategies against this arthropod-borne microorganism. To date, however, among the limited number of studies carried out in this respect, only one monitored the presence of *B. henselae* in the flea gut and excretion in feces, yet monitoring was for a limited time (i.e., up to 9 days) and was by means of qualitative immunofluorescence (19).

Therefore, the aim of this study was to assess, using quantitative molecular approaches, the earliest detectability of *B. henselae* in artificially fed *C. felis* fleas and their excreted feces and to monitor the persistence of *B. henselae*, on a daily basis, for the whole life span of the fleas.

The findings will help address future culture-based investigations aiming to assess the occurrence of possible extragut routes of dissemination or replication of *B. henselae* in *C. felis*.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. Animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant European standards of welfare for animals in research. Work performed on animals at the École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), Toulouse, France, was reviewed and approved by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Toulouse/ENVT Ethics Committees (agreement no. MP/01/22/06/09).

Bacterial strain. The reference strain *B. henselae* Houston-1 ATCC 49882 (26) was used to infect the blood on which fleas were fed.

Medium and growth conditions. The *B. henselae* strain was grown on sheep blood agar (Columbia blood agar [CBA] base) medium (bioMérieux, Craponne, France) in a humidified atmosphere at 35°C in a 5% carbon dioxide atmosphere. For flea infection assays, the bacteria were collected after 5 days of growth on CBA plates and suspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS) buffer. The bacterial suspension was diluted with PBS to obtain approximately 2×10^8 bacteria per ml.

Flea maintenance and supply. The *C. felis* strain employed was obtained from a laboratory-reared colony originating from a wild strain that was harvested from a cat and that has been maintained on cats under laboratory conditions at ENVT since 1990. Prior to use for this experi-

Received 2 August 2013 Accepted 17 September 2013
Published ahead of print 20 September 2013
Address correspondence to Emilie Bouhsira, e.bouhsira@envt.fr.
Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AEM.02598-13
The authors have paid a fee to allow immediate free access to this article.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on February 5, 2014 by McGregor FR

ment, fleas were ascertained to be quantitative PCR (qPCR) negative for *Bartonella* species infection (see below).

Feeding of *C. felis* with *B. henselae*-infected blood. Canine blood used in all experiments was obtained from three healthy 6-year-old beagle dogs (weight, 13 kg) from ENVT. The dogs had been vaccinated every year with the vaccine DHPPi/L, which protects dogs against canine distemper virus, canine adenovirus type 2, canine parvovirus, canine parainfluenza virus, and *Leptospira interrogans*. Blood smears and the microhematocrit of the three dogs were checked before their inclusion in the study, and none of the dogs showed any abnormalities. The absence of *Bartonella* spp. in dog blood was also confirmed by qPCR. Blood obtained by venipuncture was placed in lithium heparin-coated Vacutainer tubes (Venosafe; Terumo Europe, Heverlee, Belgium). Blood functional complement was deactivated by storing blood samples at room temperature for 1 h after the blood was drawn and before storage at 4°C. Blood samples were kept at 4°C for no longer than 48 h.

One thousand unfed fleas were placed in a Plexiglas box in contact with a glass feeder closed at the bottom with a thin Parafilm membrane (Parafilm3 M; Pechiney Plastic Packaging, IL). The fleas had never received any blood meal before the start of the study. To stimulate the fleas to feed on blood, a constant temperature of 38.5°C, mimicking the host's body temperature, was maintained by a water jacket system that circulated water through the glass feeder. Fleas were fed on the glass feeder until no more live fleas were retrieved in the Plexiglas box. For the first 48 h of feeding, fleas were fed 5 ml of blood mixed with 500 μl of *B. henselae* in suspension in PBS at a concentration of approximately 2×10^8 bacteria per ml. Uninfected blood was then placed in the feeder until the end of each trial. Every 24 h, the glass feeder was cleaned with a quaternary ammonium disinfectant (Anios, D.D.S.H.; Laboratoires Anios, Lille-Hellemmes, France) and then with distilled water. A new Parafilm membrane was stretched and blood was changed. At the same time, 20 mg of the feces excreted by the flea colony daily and 20 live engorged fleas were collected. All removed fleas were identified as having fed successfully by observation of distension of the abdomen with the naked eye. About 1 ml of 70% ethanol was added to the fleas and the feces that were collected. Samples were then stored at −20°C until PCR analyses.

Simultaneously, 1,000 negative-control fleas were fed on uninfected canine blood and were sampled at the same time points. They were followed until no more live fleas were retrieved from the box.

Three trials of infected fleas and two trials of uninfected fleas were conducted at the same time.

DNA extraction. DNA was extracted from all samples (including negative and positive controls) by using a NucleoSpin tissue kit according to the manufacturer's recommendations (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). The daily quantity of biological material used for independent DNA extraction was a pool of 20 fleas (230 ng/μl of DNA) and 20 mg of flea feces (6.7 ng/μl of DNA). Fleas and feces were incubated overnight to 56°C for the proteinase K lysis step. For all samples, the final elution volume was 100 μl.

qPCR amplification. First, for qPCR amplification, the DNA of *C. felis* was detected by amplification of a fragment of *C. felis* 18S ribosomal DNA (rDNA) derived from a partial sequence of *C. felis* 18S rDNA available in GenBank (accession number AF136859). The primers and TaqMan probe were designed with online GenScript real-time PCR (TaqMan) Primer Design software (accessed 12 June 2012) to generate a 122-bp amplicon. The sequences of the primer set were 5′-AGCGGAACCGTTTACAAGTC-3′ for forward primer 18SF and 5′-GGAACTCGAACGCTCATACA-3′ for reverse primer 18SR. The TaqMan probe was labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) at the 5′ end and *N*,*N*,*N*′,*N*′-tetramethyl-6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) at the 3′ end. The sequence of the probe, named 18ST, was 5′-6-FAM-CCGTATCTCCCGACGGCGTC-TAMRA-3′. This amplification was used as a reference for the efficiency of DNA extraction from fleas and fecal samples. Second, amplification of *B. henselae* DNA was performed by targeting a conserved region on the citrate synthase gene (*gltA*), as described by Molia et al. (27). The sequences of the primers and probe were 5′-GTGCTAATCCATTTGCATGTATT-3′ for forward primer Bart.738f, 5′-GTAACATTTTTAGGCATGCTTCATTA-3′ for reverse primer Bart.831r, and 5′-6-FAM-AGCTGGTCCCCAAAGGCATGCAA-TAMRA-3′ for the fluorescent TaqMan probe Bart.772p, labeled as described above for the 18ST probe with FAM at the 5′ end and TAMRA at the 3′ end. The size of the *gltA* fragment targeted was 96 bp (27).

Each reaction was carried out in a final volume of 25 μl. For the *B. henselae* qPCR, 400 nM each primer and 80 nM fluorogenic TaqMan probe were added to TaqMan buffer containing carboxy-X-rhodamine (ROX) as a passive reference (TaqMan Universal PCR master mix; Life Technologie SAS, Saint-Aubin, France). For the *C. felis* qPCR, the concentrations were optimized to 100 nM each primer and 50 nM probe. Five microliters of DNA template was added to each reaction mixture, and reactions with each template were conducted in triplicate. Amplifications were run using a Stratagene MX3005P thermal cycler (Agilent Technologies, La Jolla, CA).

Data acquisition and analysis were performed using MxPro QPCR (version 4.10) software (Agilent Technologies, La Jolla, CA). Cycling conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C, as previously reported (27). The signal of FAM as the reporter dye was measured against the signal of ROX, used as an internal reference dye, in order to normalize for the non-PCR-related fluorescence fluctuations between wells. The *B. henselae* DNA concentration was determined using a Genova spectrophotometer (Jenway, United Kingdom).

For *C. felis* qPCR amplification, ultrapure water (Simplicity UV; Millipore) and a sample of 1 ng/μl of *B. henselae* DNA, corresponding to 2.5×10^6 bacteria, were used as negative controls. DNA extracted from fleas engorged on noninfected blood was used as a positive control. For the *B. henselae* qPCR amplification, ultrapure water (Simplicity UV; Millipore) and a solution of DNA extracted from fleas engorged on uninfected canine blood were used as negative controls. A solution of extracted *B. henselae* DNA at a concentration of 1 ng/μl was used as a positive control. Negative and positive controls were included in each reaction plate.

Standard curve and reproducibility of the detection of *B. henselae* by qPCR. To generate a standard curve and to assess the detection limit of the qPCR using the primers and probe described by Molia et al. (27), a *B. henselae* suspension was serially diluted 10-fold in canine blood to achieve levels of *B. henselae* bacteremia ranging from 2×10^6 to 2×10^1 total bacteria. The standard curve obtained with these primers and the related linear equation were previously generated by Molia et al. (27), with cycle threshold (C_T) values (*y* axis) being plotted against *B. henselae* plasmid concentrations (*x* axis). However, the standard curve was determined again in the present study in order to express the data on the *x* axis as the log of the number of bacteria. The amplification efficiency (*E*) of the qPCR was calculated with the formula $E = (10^{(-1/S)}) - 1$, where *S* is the slope of the standard curve. To determine the intra-assay reproducibility, assays with eight replicates of 10-fold serial dilutions of *B. henselae* DNA (from 2×10^6 to 2×10^1 bacteria) were performed. The interassay reproducibility was assessed on independently repeated amplifications performed over six consecutive days with three replicates per day.

qPCR assay specificity. Both the *C. felis* and *B. henselae* qPCRs were tested for inhibition and potential cross-hybridization between probes and nontarget DNA. The *B. henselae* qPCR was tested against DNA extracted from *C. felis*, and the *C. felis* qPCR was tested against *B. henselae* DNA. Both PCRs were tested against DNA extracted from uninfected canine blood sampled from each of the three dogs used in the study.

Data analysis. To correct each sample size according to the quality of DNA extraction, the *B. henselae* C_T values were modified by computing the difference between the daily and the average flea C_T values for all trials. The result of this difference was added to the associated *B. henselae* C_T values for each sample. The corrected C_T value was then transformed into

Downloaded from http://aem.asm.org/ on February 5, 2014 by McGregor FR

TABLE 1 Distribution of C_T values obtained by qPCR from batches of 20 *Ctenocephalides felis* fleas for each replicate[a]

Trial	C_T value				
	Minimum	Maximum	Mean	SD	CV
1	12.26	14.35	13.3	0.7	5.24
2	11.62	14.37	12.92	0.64	4.98
3	12.7	14.42	13.5	0.57	4.23
All	11.62	14.42	13.23	0.67	5.06

[a] Fleas were fed on blood containing *B. henselae*. C_T, cycle threshold.

TABLE 2 Distribution of C_T values obtained by qPCR from 20 mg of *Ctenocephalides felis* feces for each replicate[a]

Trial	C_T value				
	Minimum	Maximum	Mean	SD	CV
1	15.39	23.79	18.23	2.18	11.98
2	15.35	20.77	18.46	1.57	8.49
3	15.46	24.57	18.76	2.4	12.81
All	15.35	24.57	18.48	2.03	11

[a] Fleas were fed on blood containing *B. henselae*. C_T, cycle threshold.

the number of bacteria according to the equation of the linear regression of the standard curve.

The means, standard deviations (SDs), and coefficients of variation (CVs) of the ranges of C_T values of flea DNA obtained daily from both 20 individual *C. felis* fleas and 20 mg of flea feces were computed with Microsoft Excel 2010 software (Microsoft Corporation). The CVs of flea DNA and *B. henselae* from the standard curve were calculated by dividing the SD of the C_T values of replicates by the mean C_T value of replicates. Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means between the C_T values for fleas and their feces and was carried out to compare the data between the three trials using the software package StatXact, release 3.1 (Cytel Software Corporation).

RESULTS

Standard curve, sensitivity, and reproducibility of the *B. henselae* qPCR assay. A linear correlation was obtained for both intra- and interassay standard curves, with R^2 equal to 0.99 and efficiency equal to 97% for the intra-assay standard curve and R^2 equal to 0.98 and efficiency equal to 93% for the interassay standard curve. The efficiency (E) of the qPCR by use of the combination of the intra- and interassay standard curves was 92%, with a strong linear correlation ($R^2 = 0.9816$), a y-intercept value of 44.027, and a slope of −3.5507. The detection limit determined from the standard curve was 20 bacteria, corresponding to a C_T value of 39. This value was calculated on the basis of the mean C_T value at which all replicates of the highest 10-fold dilution of *B. henselae* DNA provided amplification plots among the intra- and interassay standard curves. Amplification of lower numbers of bacteria (<20) provided inconstant and nonreproducible C_T values even when an increased number of cycles was used (data not shown).

The intra- and interassay results were combined to assess the reproducibility of the *B. henselae* qPCR. The coefficient of variation ranged from 2.59% for 2×10^2 bacteria to 3.86% for 2×10^6 bacteria, showing strong reproducibility. Inhibition of the PCR was not recorded in the presence of the highest *B. henselae* load (2×10^6 bacteria). Cross-hybridization between *B. henselae* probes and *C. felis* DNA and between *C. felis* probes and *B. henselae* DNA was not recorded.

Reproducibility of the *C. felis* batch and flea excrement qPCR. The reproducibility of qPCR assays based on the same number of fleas (20) and the same quantity of flea feces (20 mg) was determined by computation of CVs for each of the three trials. In the three trials carried out for fleas and flea excrement, the CVs of the C_T values ranged from 4.23% to 5.24% and from 8.49% to 12.81%, respectively (Tables 1 and 2). As they were all lower than 15%, these CV values were consistent with previously published data and were highly reproducible (28). The mean C_T values did not significantly differ between the three trials of batches of 20 *C. felis* fleas or between the three trials of 20 mg of flea feces. The P values determined by ANOVA were 0.09 and 0.13, respectively. Then, the mean C_T values of 13.23 for batches of 20 fleas (Table 1) and of 18.48 for 20 mg of flea feces (Table 2) were used as corrections for the C_T values for *B. henselae* for each trial.

Persistence of *B. henselae* within fleas. The two replicates of control fleas lived for 10 and 14 days, respectively, on the artificial membrane feeding system. Both colonies were qPCR negative for *B. henselae* throughout the study. The infected fleas from trials 1 and 2 lived for 13 days, whereas the infected fleas from trial 3 lived for 12 days.

From day 1 to day 13 after infection, a total of 760 fleas were sampled and their DNA was extracted to estimate the number of bacteria according to the equation of the standard linear regression curve. From days 1 to 6, the fluctuation in the quantity of bacteria followed a similar pattern in all three trials of fleas sampled: a peak concentration was recorded on either day 1, 2, or 3 and a rather steady smaller amount was found until day 6 (Fig. 1A). Afterwards, the concentration of *B. henselae* in flea pools decreased, remaining rather steady at less than 10^2 bacteria between days 4 and 6 for trials 1 and 2 and days 3 and 6 for trial 3. A final increase in the *B. henselae* load was then seen on days 8 (trials 1 and 2), 10 (trial 2), 11 (trial 3), and 12 (trial 1). No *B. henselae* DNA was detected on days 9 and 13 for trial 1, on days 7, 9, 11, and 12 for trial 2, and on day 7 for trial 3 (Fig. 1A).

Persistence of *B. henselae* within flea feces. The feces of control fleas were sampled daily and analyzed, and *B. henselae* DNA was not detected throughout the study. Sampling could not be performed on day 3 for trial 2, on day 6 for trial 3, and on day 12 for trials 1 and 2 (Fig. 1B) because the amount of excreted feces was too small.

For trial 1, the bacterial load in the excreted feces remained above 1×10^3 bacteria from day 1 until day 6, with an average of 9×10^4 bacteria being excreted within the first 2 days. Then, the amount of bacteria decreased until day 11. No bacteria were detected on day 12 (Fig. 1B). For trial 2, the amount of bacteria in feces gradually increased until day 2, reaching a bacterial load of 6×10^4 bacteria and decreasing dramatically on day 3, when DNA was not detected. An increase was then recorded between days 4 and 7. No quantification could be obtained on days 8 and 9 or on days 11 and 12 due to the absence of *B. henselae* DNA detection. Bacteria were, however, still excreted in feces on day 10, with the lowest value of approximately 20 bacteria being obtained for this replicate (Fig. 1B). For trial 3, feces were infected with *B. henselae* on days 1 and 2, with an average load of 6.7×10^4 bacteria. The bacterial load remained above 1×10^3 bacteria until day 5. *B. henselae* kept being rather constantly excreted from day 7 until the last sampling on day 12, with a bacterial load of 35 (Fig. 1B).

Downloaded from http://aem.asm.org/ on February 5, 2014 by McGregor FR

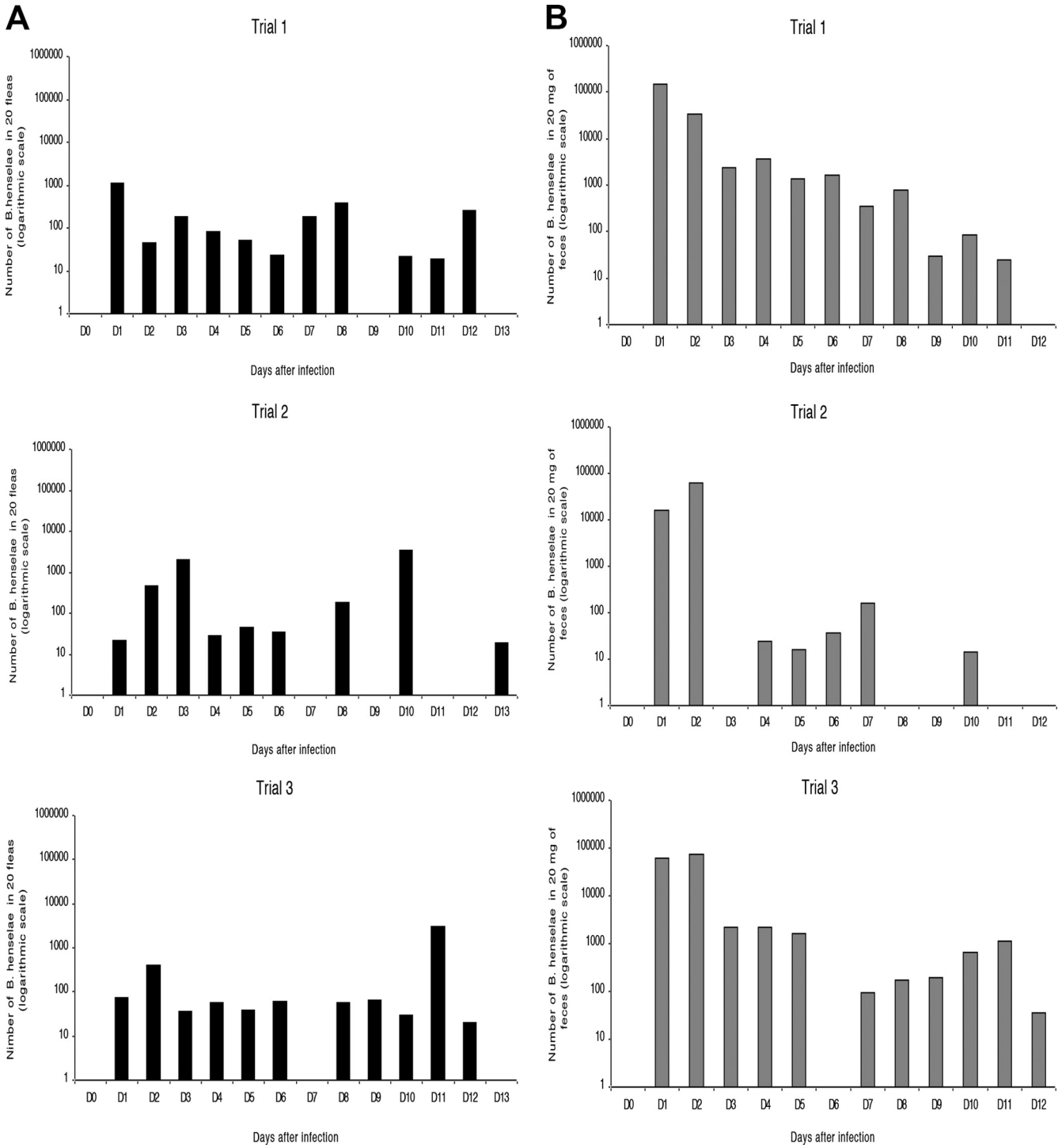


FIG 1 Dynamics of *B. henselae* in fleas (A) and excreted feces (B). Fleas were fed blood infected with *B. henselae* from day 0 to day 2 and with uninfected blood from day 2 onwards.

DISCUSSION

This study investigated, using a quantitative molecular approach, the daily kinetics of *B. henselae* within the cat flea and cat flea feces after exposure to infected blood for 48 h. The qPCR employed for both *C. felis and B. henselae* primers and probes showed good reproducibility, specificity, and sensitivity, consistent with the results of similar studies carried out previously (29). In addition, this approach can also be used to detect the presence of *Bartonella* spp. directly from patient tissues (30–32). The artificial membrane feeding system allowing experimental infection has also been used to investigate several vector-pathogen interactions, like those involving *Xenopsylla cheopis* and *Yersinia pestis*, *Pediculus humanus*

Downloaded from http://aem.asm.org/ on February 5, 2014 by McGregor FR

and *B. quintana*, and *Ixodes ricinus* and *B. henselae* (5, 33, 34). In the case of *B. henselae*, it is known that its acquisition by *C. felis* can already occur from 3 h after the start of a contaminated blood meal (19). In this study, a time lapse of 48 h from the initiation of feeding on contaminated blood was used in order to allow the largest but undetermined number of fleas to engorge on infected blood. In both the infected and the control groups of fleas, an important but not quantified mortality was observed daily throughout the study among nonengorged specimens. This can be attributable to several causes, including the natural death of fleas, the reluctance of some fleas to feed on an artificial membrane system, and their daily handling for sampling purposes. Nonetheless, the maximum life span recorded for infected fleas (i.e., 12 to 13 days) was not shortened in comparison with that of control fleas (i.e., 10 to 14 days). This is in accordance with the findings of a previous study, where *Xenopsylla ramesis* fleas infected with *Bartonella* spp. did not show a shorter life span than uninfected fleas (35).

Although no clear replication pattern was reported throughout the three trials in the current investigation, *B. henselae* DNA was not cleared from the fleas after contamination but instead was maintained in the fleas until 10 to 13 days. All trials differed in the mean initial *B. henselae* load, with trial 1 showing the highest bacterial load and trial 2 showing the lowest. On days 7, 9, 11, and 12 for trial 2 and on day 7 for trial 3, however, no DNA could be detected in fleas, suggesting that the amount of bacteria was below the detection threshold of the optimized qPCR. For trial 2, the absence of *B. henselae* in all fleas on day 9 was anticipated and accompanied by the absence of bacteria in their feces on days 8 and 9. Similarly, in a previous study, no *B. quintana* DNA was detected in louse feces on either day 5, 7, 9, or 11 after infection (34).

For all three trials, a general increase in the amount of bacteria in the fleas was observed after day 7. These findings suggest the possible replication of *B. henselae* in the cat flea at this time of its life span. This is in accordance with the findings of previous studies showing the persistence and qualitative increase in bacteria in flea guts 9 days after an infected blood meal (19) and the replication of *B. henselae* within adult fleas at 6 to 8 days after feeding (20). The first decrease in bacterial DNA in the fleas was observed 2 days after the infected blood meal and may have been due to fleas clearing themselves of an excess of bacteria, as was suggested for *C. felis* and *X. cheopis* after a highly septicemic blood meal with *Rickettsia felis* (36) and *Y. pestis*, respectively (37, 38). Then, the persistence of *Bartonella* DNA until the end of the study could be explained by several assumptions requiring further investigation: the formation of aggregates in the flea gut; attachment to an extracellular matrix, as shown for *Y. pestis* and *B. schoenbuchensis*, respectively (33, 39); or sequestration in other flea tissues. According to the first hypothesis, bacteria would then be continuously released from the gut biofilm and excreted in feces. In our study, the excretion of the bacteria was indeed continuous, although the bacterial load decreased gradually in the second part of the flea life span, starting on day 7. However, the reduction in the amount of bacteria in the feces was not correlated with the decrease in the amount of bacteria in all fleas at the end of the study, which, conversely, increased on days 12 (trial 1), 10 (trial 2), and 11 (trial 3). This could suggest the second hypothesis of migration of *B. henselae* from the digestive tract to the body cavity and/or other organs (for example, reproductive tissues, hemolymph, Malpighian tubules) in the second part of the flea life span. Similarly, *R. felis* has recently been shown to replicate in the digestive tract of *C. felis* in the first stage of infection, and then to migrate to the hemolymph, disseminating to the excretory system (Malpighian tubules, hindgut, and rectal ampulla) and reproductive tissues (36). At present, the survival of *B. henselae* in excreted feces is estimated to last for at least 3 days in the environment (20) and could be possible because of the aggregation of the bacteria in a biofilm on the surface of the feces, as suggested for *B. quintana* on louse feces (34). Nevertheless, the dispersion of *B. henselae* within the cat flea and *B. henselae* excretion have not yet been fully investigated. This is of epidemiological importance, as flea feces are indeed the principal infectious material for the transmission of *B. henselae* (24) and can be cultured to produce viable colonies (19, 20). The viability of *B. henselae* in flea feces should be addressed by mRNA amplification, as DNA-based qPCR alone does not allow differentiation between live and dead bacteria. Such an approach may help assess the actual infectivity of feces harvested from the fur of flea-infested cats as a key indicator of the risk for intraspecies and zoonotic transmission of *B. henselae*.

To conclude, the persistence of *B. henselae* DNA occurred in both the arthropod vector and its feces for the whole life span of the fleas on the artificial system. This is epidemiologically relevant, as the persistence of *B. henselae* in both fleas and feces enhances contamination risks, especially in the presence of a high density of reservoir hosts.

Further studies are required to determine whether the replication of *B. henselae* could occur also in extragut tissues. In these regards, microdissection of fleas could possibly help address this issue with the aim of identifying the organs (e.g., flea gut, digestive epithelial cells, as well as other tissues) in which *B. henselae* replication and dissemination take place in its most competent arthropod host and distinguishing viable from nonviable bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Francis Biville (Institut Pasteur, Paris, France) for his thoughtful comments on this work; Vincenzo Lorusso (University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom) for his valuable suggestions on the manuscript and his contribution to the English of the text; Vincent Bourret (ENVT, Toulouse, France) for his help with data analysis; MaFeng Liu, Yann Ferrandez, and Martine Monteil (ANSES, Maison-Alfort, France) for their technical assistance; Solange Vermot, Martine Roques, and Sonia Gounaud (ENVT, Toulouse, France) for their help with dog restraint and flea colony maintenance; and Christelle Grisez, Francoise Prévot, and Quentin Pagé (ENVT, Toulouse, France) for their technical assistance with qPCR.

REFERENCES

1. **Chomel BB, Kasten RW.** 2010. Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. J. Appl. Microbiol. **109:**743–750.
2. **Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE.** 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J. Clin. Microbiol. **34:**1952–1956.
3. **Tsai YL, Chang CC, Chuang ST, Chomel BB.** 2011. *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **34:**299–314.
4. **Podsiadly E, Chmielewski T, Sochon E, Tylewska-Wierzbanowska S.** 2007. *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs. Vector Borne Zoonotic Dis. **7:**189–192.
5. **Cotté V, Bonnet S, Le Rhun D, Le Naour E, Chauvin A, Boulouis HJ, Lecuelle B, Lilin T, Vayssier-Taussat M.** 2008. Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. Emerg. Infect. Dis. **14:**1074–1080.
6. **Dietrich F, Schmidgen T, Maggi RG, Richter D, Matuschka FR,**

Downloaded from http://aem.asm.org/ on February 5, 2014 by McGregor FR

Vonthein R, Breitschwerdt EB, Kempf VA. 2010. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Appl. Environ. Microbiol. **76:**1395–1398.
7. **Chung CY, Kasten RW, Paff SM, Van Horn BA, Vayssier-Taussat M, Boulouis HJ, Chomel BB.** 2004. *Bartonella* spp. DNA associated with biting flies from California. Emerg. Infect. Dis. **10:**1311–1313.
8. **Chomel BB, Boulouis HJ, Maruyama S, Breitschwerdt EB.** 2006. *Bartonella* spp. in pets and effects on human health. Emerg. Infect. Dis. **12:**389–394.
9. **Breitschwerdt EB, Kordick DL.** 1995. Bartonellosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. **206:**1928–1931.
10. **Guptill L, Slater L, Wu CC, Lin TL, Glickman LT, Welch DF, Hogenesch H.** 1997. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. J. Infect. Dis. **176:**206–216.
11. **Kordick DL, Brown TT, Shin K, Breitschwerdt EB.** 1999. Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. J. Clin. Microbiol. **37:**1536–1547.
12. **Breitschwerdt EB, Kordick DL.** 2000. *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin. Microbiol. Rev. **13:**428–438.
13. **Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB.** 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. Vet. Res. **36:**383–410.
14. **Klotz SA, Ianas V, Elliott SP.** 2011. Cat-scratch disease. Am. Fam. Physician **83:**152–155.
15. **Breitschwerdt EB.** 2008. Feline bartonellosis and cat scratch disease. Vet. Immunol. Immunopathol. **123:**167–171.
16. **Guptill L.** 2010. Bartonellosis. Vet. Microbiol. **140:**347–359.
17. **Lappin MR, Griffin B, Brunt J, Riley A, Burney D, Hawley J, Brewer MM, Jensen WA.** 2006. Prevalence of *Bartonella* species, *Haemoplasma* species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. J. Feline Med. Surg. **8:**85–90.
18. **Jameson P, Greene C, Regnery R, Dryden M, Marks A, Brown J, Cooper J, Glaus B, Greene R.** 1995. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. J. Infect. Dis. **172:**1145–1149.
19. **Higgins JA, Radulovic S, Jaworski DC, Azad AF.** 1996. Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). J. Med. Entomol. **33:**490–495.
20. **Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp J, Jr, Foil LD.** 2002. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). J. Med. Entomol. **39:**915–919.
21. **Bouhsira E, Ferrandez Y, Liu M, Franc M, Boulouis H-J, Biville F.** 2013. *Ctenocephalides felis* an *in vitro* potential vector for five *Bartonella* species. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **36:**105–111.
22. **Abbot RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, Pedersen NC.** 1997. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. **20:**41–51.
23. **Foil L, Andress E, Freeland RL, Roy AF, Rutledge R, Triche PC, O'Reilly KL.** 1998. Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. J. Med. Entomol. **35:**625–628.
24. **Telford SR, Wormser GP.** 2010. *Bartonella* spp. transmission by ticks not established. Emerg. Infect. Dis. **16:**379–384.
25. **Mosbacher M, Elliott SP, Shehab Z, Pinnas JL, Klotz JH, Klotz SA.** 2010. Cat scratch disease and arthropod vectors: more to it than a scratch? J. Am. Board Fam. Med. **23:**685–686.
26. **Sölder B, Allerberger F, Covi B, Maurer K, Scheminzky C, Kreczy A, Schön G, Dierich MP.** 1995. Cat scratch disease caused by *Bartonella henselae*. Immun. Infekt. **23:**228–231.
27. **Molia S, Chomel BB, Kasten RW, Leutenegger CM, Steele BR, Marker L, Martenson JS, Keet DF, Bengis RG, Peterson RP, Munson L, O'Brien SJ.** 2004. Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). Vet. Microbiol. **100:**31–41.
28. **Zemanick ET, Wagner BD, Sagel SD, Stevens MJ, Accurso FJ, Harris JK.** 2010. Reliability of quantitative real-time PCR for bacterial detection in cystic fibrosis airway specimens. PLoS One **5:**e15101. doi:10.1371/journal.pone.0015101.
29. **Robinson MT, Morgan ER, Woods D, Shaw SE.** 2010. Real-time and multiplex real-time polymerase chain reactions for the detection of *Bartonella henselae* within cat flea, *Ctenocephalides felis*, samples. Med. Vet. Entomol. **24:**449–455.
30. **Ciervo A, Mastroianni CM, Ajassa C, Pinto A, Ciceroni L.** 2005. Rapid identification of *Bartonella henselae* by real-time polymerase chain reaction in a patient with cat scratch disease. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. **53:**75–77.
31. **Bergmans AM, Rossen JW.** 2013. Detection of *Bartonella* spp. DNA in clinical specimens using an internally controlled real-time PCR assay. Methods Mol. Biol. **943:**217–228.
32. **Liberto MC, Matera G, Lamberti AG, Quirino A, Barreca GS, Marascio N, Baudi F, Caroleo B, Staltari O, Focà A.** 2013. Diagnosis and follow up of *Bartonella henselae* infection in the spleen of an immunocompetent patient by real-time quantitative polymerase chain reaction. J. Med. Microbiol. **62:**1081–1085.
33. **Jarrett CO, Deak E, Isherwood KE, Oyston PC, Fischer ER, Whitney AR, Kobayashi SD, DeLeo FR, Hinnebusch BJ.** 2004. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. J. Infect. Dis. **190:**783–792.
34. **Seki N, Kasai S, Saito N, Komagata O, Mihara M, Sasaki T, Tomita T, Sasaki T, Kobayashi M.** 2007. Quantitative analysis of proliferation and excretion of *Bartonella quintana* in body lice, *Pediculus humanus*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **77:**562–566.
35. **Morick D, Krasnov BR, Khokhlova IS, Gutierrez R, Fielden LJ, Gottlieb Y, Harrus S.** 2013. Effects of *Bartonella* spp. on flea feeding and reproductive performance. Appl. Environ. Microbiol. **79:**3438–3443.
36. **Thepparit C, Hirunkanokpun S, Popov VL, Foil LD, Macaluso KR.** 2013. Dissemination of bloodmeal acquired *Rickettsia felis* in cat fleas, *Ctenocephalides felis*. Parasit. Vectors **6:**149.
37. **Hinnebusch BJ, Perry RD, Schwan TG.** 1996. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. Science **273:**367–370.
38. **Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG, Forsberg A.** 2002. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. Science **296:**733–735.
39. **Dehio C, Sauder U, Hiestand R.** 2004. Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. J. Clin. Microbiol. **42:**5320–5323.

Downloaded from http://aem.asm.org/ on February 5, 2014 by McGregor FR

4. Localisation de *B. henselae* chez *C. felis*

La dispersion de *R. felis* dans l'organisme de *C. felis* a été bien étudiée. Cette rickettsie ne reste pas localisée au tube digestif, mais se dissémine à l'hémocœle, aux organes excréteurs et reproducteurs et aux glandes salivaires (Thepparit et al., 2013). À ce jour, *B. henselae* a été uniquement identifiée par IFI dans le tube digestif de *C. felis* (Higgins et al., 1998). L'ADN de plusieurs espèces de *Bartonella* spp. (dont *B. v. arupensis* et une espèce proche de *B. washoensis*) a, quant à lui, été retrouvé, en conditions naturelles, dans le tube digestif, les ovaires et l'hémolymphe de sept espèces de puces (*Pulex irritans*, *Cediopsylla inaequalis*, *Oropsylla hirsuta*, *Aetheca wagneri*, *Orchopeas leucopus*, *Ctenophthalmus congener truncus* et *Neopsylla sasai*) aux États-Unis et au Japon, suggérant à l'image de *R. felis*, une dissémination possible à des organes extra-digestifs (Kabeya et al., 2011 ; Brinkerhoff et al., 2010).

4.1. Détection de *B. henselae* dans *C. felis* par histologie : apport méthodologique

La méthode de choix permettant d'étudier la répartition tissulaire de *B. henselae* dans son vecteur est l'histologie requérant des coupes histologiques de puces et l'immunomarquage tissulaire d'antigènes bactériens (Thepparit, 2013).

Initialement, des puces gorgées ont été préparées suivant un protocole histologique classique (cycle d'imprégnation en paraffine dans les fixateurs suivants : formol, éthanol à 80°, éthanol 95°, éthanol absolu, toluène, paraffine, puis enrobage en paraffine et enfin coupes au microtome). Les premiers essais de coupes tissulaires par cette technique de routine se sont révélés inadaptés en raison de la dureté et de la friabilité de l'exosquelette des puces. Les coupes obtenues étaient en effet déchiquetées et ne permettaient pas d'identifier les organes. Nous avons alors remplacé les bains de toluène par deux bains de butanol (Butanol 1, Carlo-Erba-SDS) d'une durée respective de 2 h 30 et 3 h. Les détails de la technique histologique sont développés dans la partie Matériel et Méthode ci-après. La clarification et le ramollissement de la chitine se sont avérés suffisants pour l'obtention de coupes histologiques exploitables pour les étapes suivantes de coloration et d'immunomarquage. Le marquage histochimique a été effectué au moyen du seul anticorps polyclonal anti-*B. henselae* disponible. Il est non commercial et il est produit après inoculation à des souris au laboratoire de l'UMR BIPAR de l'ANSES, Maisons-Alfort. Il est couramment employé pour le diagnostic de *B. henselae* par immunofluorescence et dans des travaux de recherche. Les essais préalables ont permis de déterminer une dilution optimale en anticorps primaire de

1/100ème (la dilution au 1/50ème donnant les mêmes résultats, mais consommant plus d'anticorps).

Les lames blanches obtenues après coupe au microtome ont subi un démasquage antigénique. Ce prétraitement permet de s'affranchir des liaisons entre protéines dues à la fixation, ce qui dénature les antigènes et ne les rend plus accessibles aux anticorps. Le démasquage s'est fait par passage des lames au bain-marie dans du tampon citrate à pH = 6 pendant 30 min. Ensuite, l'anticorps primaire dilué au 1/100ème est déposé sur les lames qui sont laissées à incuber à température ambiante pendant 50 min. Une solution commerciale d'anticorps anti-souris (Dako) est déposée sur les lames pendant 25 min, suivie d'une solution de streptavidine HRP (Dako) diluée au 1/500ème pendant 25 min, et enfin la dernière application est une couche de chromogène d'Amino-Ethyl-Carbasole (AEC, Dako) ou de Di-Amino-Benzidine (DAB, DAKO) pendant 20 min. Les lames sont rincées au PBS entre chaque solution.

Nous avons utilisé des cytospines de sang contaminé par *B. henselae* comme témoins positifs des marquages immunohistochimiques. Les marquages obtenus sur ces lames sont d'excellente qualité et permettent de visualiser les bactéries à la surface des hématies (Figure 10).

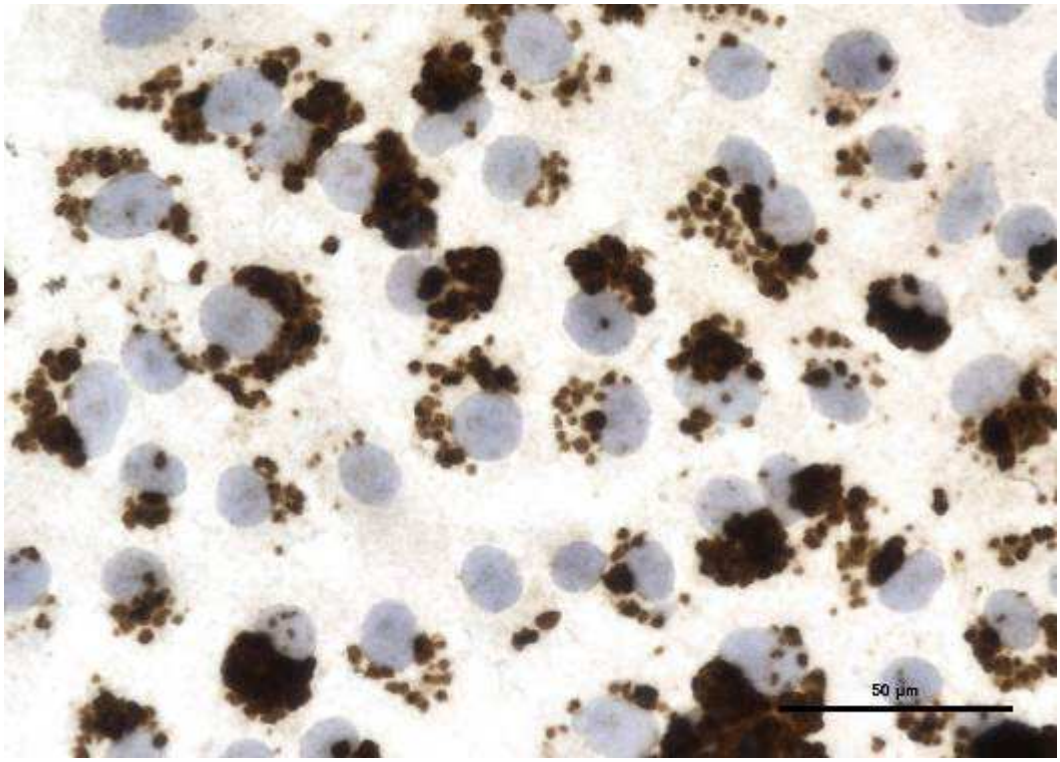


Figure 10. Cytopsin de sang contaminé par *B. henselae* (Grossissement d'origine x400). Le chromogène DAB colore en marron les bactéries présentes ici en périphérie des hématies.

Les témoins négatifs étaient représentés par des coupes tissulaires pour lesquelles l'incubation de la première couche est omise (diluant sans anticorps) et par des coupes de puces gorgées de sang non infecté. Aucun marquage spécifique n'a pu être obtenu à l'aide de l'anticorps utilisé sur les coupes en paraffine. Cette absence de marquage est probablement due à la fixation tissulaire, car les cytospines de sang contaminé non fixées ont montré une excellente réactivité. L'étape de fixation au formol est indispensable au maintien de la morphologie tissulaire, mais il est malheureusement fréquent qu'aucun signal spécifique en immunohistochimie sur coupes en paraffine ne soit obtenu à partir des anticorps utilisés pour des techniques d'Immunofluorescence, Western Blot ou Immunoprécipitation par exemple. Malgré les tentatives d'amélioration non rapportées ici, notre technique de marquage s'est avérée infructueuse. Nous avons alors eu recours à la microdissection laser des organes de la puce associée à la mise en évidence de l'ADN bactérien par PCR quantitative (PCRq) dans ces isolats.

4.2. Combinaison de la microdissection laser et de la PCR en temps réel

4.2.1. Intérêts

La microdissection laser permet d'isoler une population cellulaire ou des cellules seules à partir d'une coupe histologique. Cette technique est très utilisée en pathologie tumorale, car elle permet de distinguer les cellules cancéreuses des cellules normales (Legrès et al., 2010). Cette technique a également des applications en parasitologie, notamment dans l'étude des interactions hôtes-vecteurs. Par sa finesse, la microdissection permet d'isoler des parasites directement depuis leur localisation tissulaire, pour étudier l'expression des protéines et des ARNm *in situ*, en réponse à l'immunité de l'hôte. Par exemple, des schizontes de *Plasmodium yoelii* ont été isolés d'hépatocytes murins par microdissection, et l'ARN parasitaire a été par la suite amplifié et analysé (Sacci et al., 2002). Dans une autre étude, *P. falciparum* a été isolé de culture d'hépatocytes humains pour étudier l'expression des ARNm *in situ* (Semblat et al., 2002). La microdissection a été également utilisée pour prélever les épithéliums digestifs d'*Aedes aegypti* ou d'*Ancylostoma caninum*, en vue de la réalisation d'extractions d'ARN (Jones et al., 2004 ; Hong et al., 2011).

Dans notre étude, nous avons souhaité vérifier si après contamination de *C. felis, B. henselae* restait localisée au tube digestif, en adhérant par exemple aux épines du proventricule, comme *Y. pestis*, ou bien si une dissémination à d'autres organes avait lieu. Nous avons prélevé sur coupes histologiques l'épithélium de l'intestin moyen et du proventricule, le contenu digestif,

les ampoules rectales et les ovaires de *C. felis* préalablement infectées par *B. henselae*. Les prélèvements tissulaires ont ensuite été analysés en PCRq.

4.2.2. Matériel et Méthode

Puces : il s'agit de puces *C. felis* âgées de 10-12 jours et venant de l'élevage précédemment décrit.

Bactéries : nous avons utilisé la souche de référence *B. henselae* Houston 1. Les conditions de croissance sont décrites dans les Articles II et III. Après 5 jours de croissance sur gélose au sang, les bactéries ont été prélevées et mises en suspension dans du PBS stérile. La suspension bactérienne a été diluée de manière à obtenir une concentration d'environ 2 x 10^8 bactéries/ml.

Gorgement de *C. felis* : les puces ont été mises à gorger sur le dispositif expérimental présenté précédemment (voir Figure 9). Mille puces ont été placées dans le nourrisseur en contact avec du sang contaminé pendant 48 heures, puis avec du sang sain jusqu'à la fin de l'étude. Les puces ont été suivies pendant 12 jours. Toutes les 24 heures, 20 puces bien gorgées (observation à l'œil nu de la distension abdominale) ont été récoltées et placées dans des tubes Eppendorf ND de 1,5 ml contenant du formol tamponné et stockées à température ambiante en attendant la préparation histologique. Le temps de fixation dans le formol n'a jamais excédé 72 heures. En parallèle, 20 mg de déjections produites par la colonie entière ont été récoltées quotidiennement, placées dans de l'éthanol modifié (70 %) et stockées à -20 °C, en attendant d'être analysées en PCR quantitative.

Fixation et préparation histologique des puces : Les puces entières ont été fixées par immersion dans du formol à 10 % tamponné à la neutralité (Labonord) pendant 24 h afin d'éviter une surfixation. Elles ont ensuite été placées dans des cassettes d'inclusion (cassettes d'inclusion Macrostar, VWR), à raison de 8 à 10 puces par cassette. Chaque cassette a ensuite suivi le cycle d'imprégnation en paraffine dans l'automate Micron HMP 110, qui se réalise par des passages successifs dans les fixateurs suivants : formol, éthanol à 80°, éthanol 95°, éthanol absolu, butanol, paraffine. L'enrobage en paraffine s'est fait sur la station de montage Leica E6 1160 (Leica) : de la paraffine à 62°C est coulée sur les puces disposées au fond d'un moule à biopsie en étain. L'étape de refroidissement se fait à - 3 °C et permet la solidification de la paraffine et le démoulage des blocs. Les blocs de paraffine ont ensuite été coupés au microtome (Microtome HM 325, Microm) à une épaisseur de 4 µm pour les coupes destinées à l'histologie (reconnaissance d'organes) et à une épaisseur de 10 µm pour les coupes destinées à la microdissection. Chaque lame pouvant contenir entre 10-15 sections de puces, les coupes des 20 puces prélevées par jour ont été réparties sur trois lames en moyenne : une

pour l'histologie et deux à trois pour la microdissection. Les lames ont ensuite été séchées 45 min à 40°C, puis déparaffinées et réhydratées aux alcools. Les lames destinées à l'histologie ont été contre-colorées à l'hématoxyline de Harris et les lames destinées à la microdissection ont été contre-colorées à l'hémalun. Ces dernières ont été conservées à l'abri de l'air et de la lumière dans de l'éthanol absolu jusqu'à leur utilisation. L'identification des différents organes internes a été réalisée selon l'ouvrage de Rothschild et al. (1986).

Microdissection laser (voir Annexe) : les microdissections lasers ont été adaptées des méthodes décrites par Jones et al. (2004) et Gobert et al. (2009). Nous avons utilisé le système Arcturus XT LCM (Life Technologies) et son logiciel associé Arcturus XT software, pour la capture d'images. Le niveau d'énergie du faisceau IR a été utilisé à 60-70 % de sa puissance maximale. Les tissus ont été prélevés sur des capsules recouvertes d'une membrane adhésive (CapSure ® Macro LCM Caps, Life Technologies). Les capsules sont ensuite placées dans des tubes Eppendorf de 500 µl dont elles font office de bouchon. Chaque tube contient 180 µl d'un tampon de lyse (kit d'extraction Nucleospin tissue, Macherey-Nagel) permettant de solubiliser les prélèvements et d'initier la première étape de l'extraction d'ADN génomique. Les tubes ont été placés à -20 °C en attendant l'extraction d'ADN.

Nous avons prélevé de manière indépendante : le contenu du tube digestif, l'épithélium de l'intestin moyen, l'épithélium du proventricule, les ovaires, et les ampoules rectales. Pour chaque jour de gorgement, les prélèvements effectués sur les 20 puces ont été regroupés pour chacun des organes étudiés.

Extraction d'ADN : l'ADN a été extrait des fèces et des prélèvements tissulaires de puces à l'aide du kit d'extraction Nucleospin tissue (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fabricant. Les prélèvements ont été mis à incuber une nuit à 56 °C pour l'étape de lyse à la protéinase K. Le volume final de chaque élution est de 100 µl.

Amplification de l'ADN par PCR quantitative : la technique de PCR quantitative mise au point dans notre travail précédent (Article III) a montré une bonne spécificité, une bonne sensibilité et une bonne reproductibilité pour amplifier l'ADN de *B. henselae* dans les puces et leurs déjections. Cette technique a été appliquée ici aux fèces et aux prélèvements d'organes. Le gène codant pour l'ADN 18 S de *C. felis* a été amplifié dans chacun des prélèvements comme témoin positif de l'extraction. Enfin, la qualité de l'extraction d'ADN génomique a été prise en compte dans chacune des amplifications réalisées. Les valeurs quotidiennes du Cycle threshold (Ct) de *B. henselae* ont été corrigées en ajoutant à ces valeurs la différence quotidienne entre les valeurs de Ct journalières et la valeur de Ct moyenne du gène 18S de puces obtenues dans chacun des organes (Article III).

4.2.3. Résultats

Identification des compartiments tissulaires de *C. felis*

L'identification des organes internes est rapportée dans les figures 11 à 18. Il s'agit des différents compartiments digestifs (proventricule, intestin, ampoule rectale) avec visualisation du repas sanguin (Figures 11 à 13), des organes reproducteurs mâles et femelles (Figures 14 à 16), du système nerveux (Figure 17) et du système respiratoire (Figure 18).



Figure 11. ***Ctenocephalides felis*** **femelle gorgée (coloration à l'hémalun-éosine, grossissement** d'origine x40). Photographie originale.

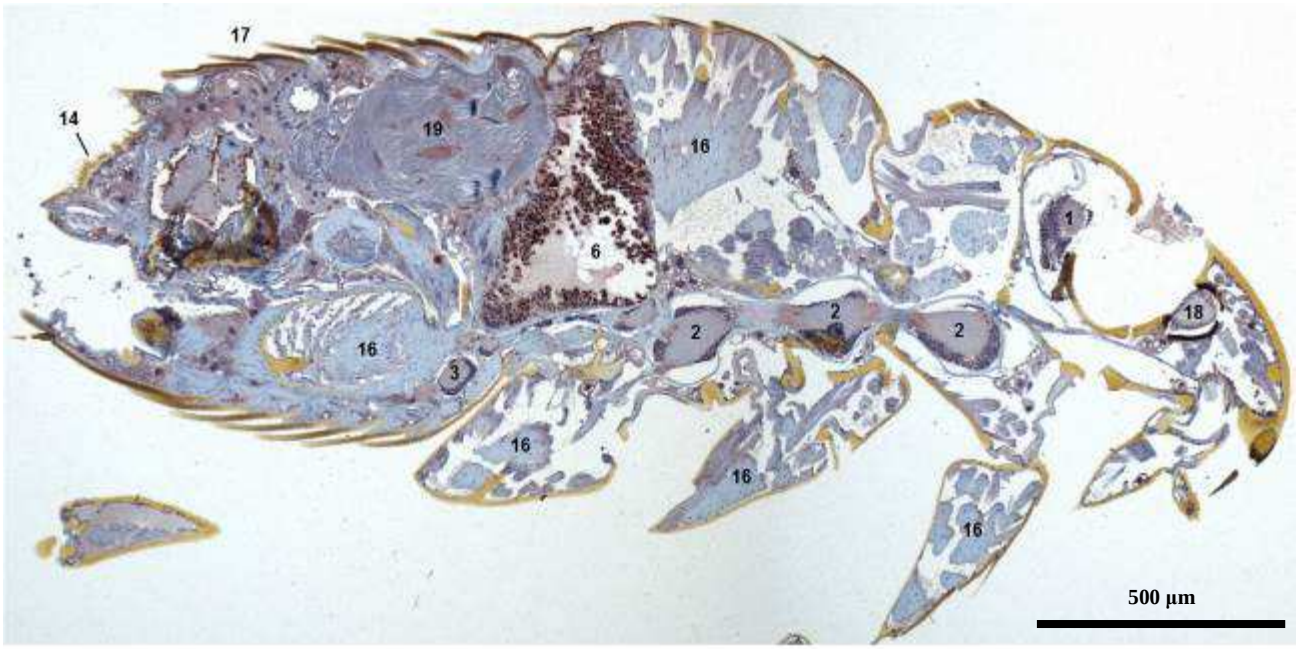


Figure 12. ***Ctenocephalides felis*** **mâle** (coloration à l'hémalun-éosine, grossissement d'origine x40). Photographie originale.

1= Cerveau, 2= Ganglions thoraciques, 3= Chaîne nerveuse ventrale, 4= Œsophage, 5= Proventricule, 6= Intestin moyen, 7= Intestin postérieur, 8= Glandes rectales, 9= Ampoule rectale remplie de sang digéré, 10= Ovarioles, 11= Oviducte, 12= Vagin, 13= Spermathèque, 13a= Bourse copulatrice, 13b= Glandes vaginales, 14= Sensilium, 15= Tissu adipeux, 16= Fibre musculaire, 17= Cuticule, 18= Oeil, 19= Testicule.

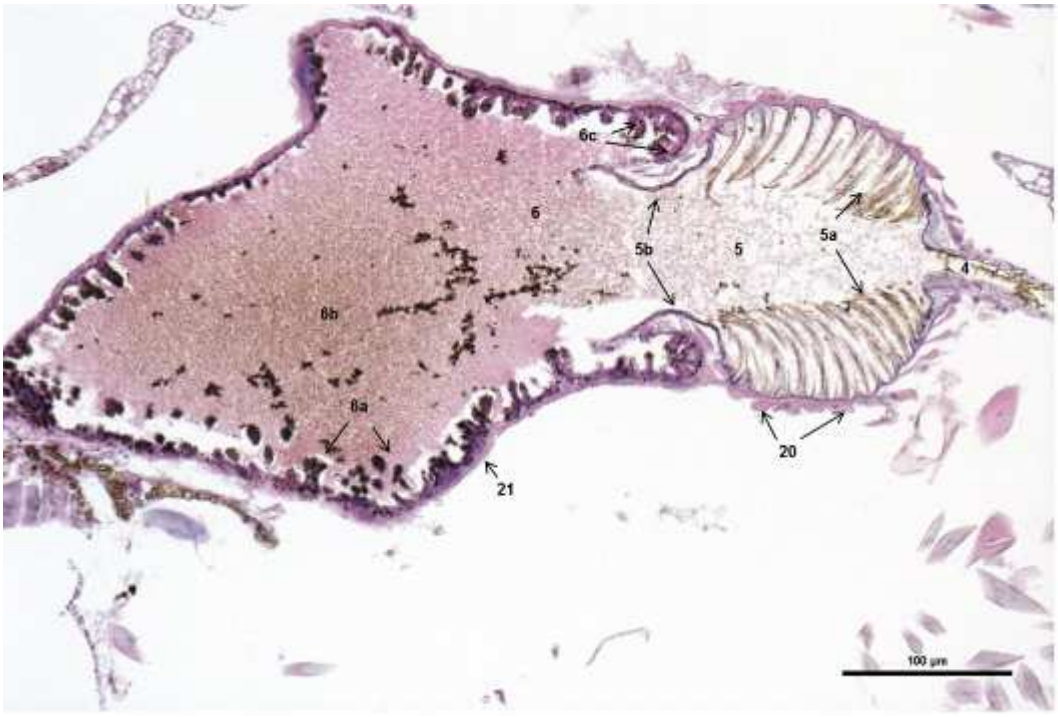


Figure 13. Proventricule et intestin moyen d'une puce *C. felis* gorgée (Coloration à l'hémalun-éosine, grossissement d'origine x200). Photographie originale.

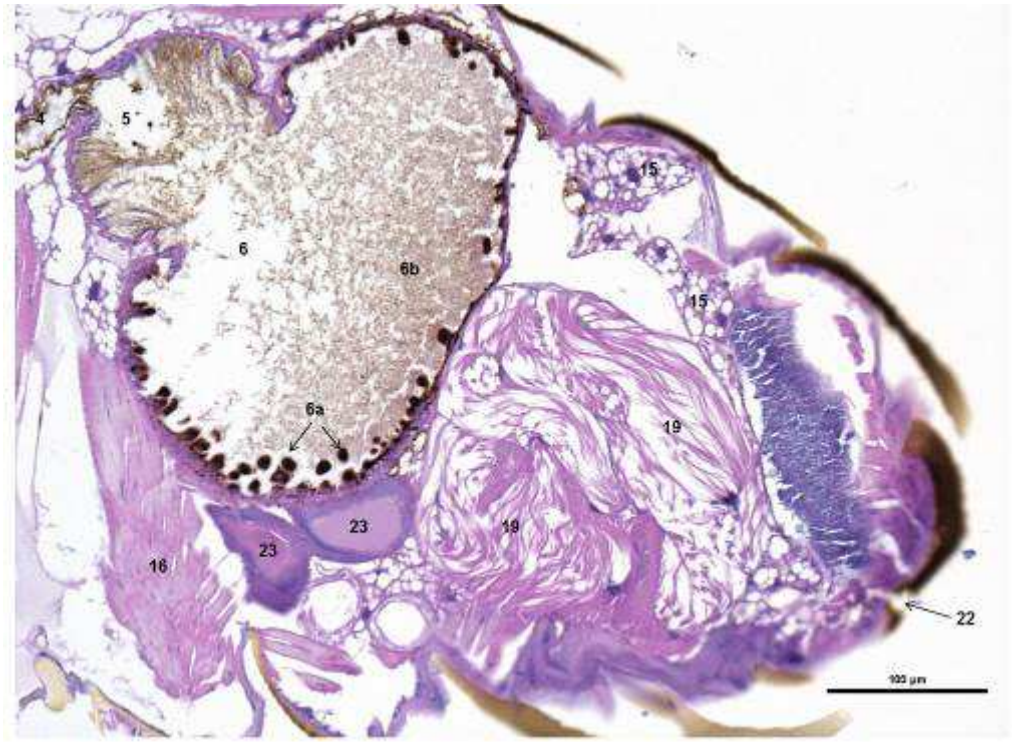


Figure 14. Abdomen d'une puce *C. felis* mâle gorgée (Coloration à l'hémalun-éosine, grossissement d'origine x100). Photographie originale.

4= Œsophage, 5= Proventricule, 5a= Epines du proventricule, 5b= Valves du proventricules, 6= Intestin moyen, 6a= Cellules épithéliales, 6b= Sang digéré, 6c= cellules spécialisées de l'intestin moyen, 15= Tissu adipeux, 16= Fibres musculaires, 20= Fibres musculaires circulaires, 21= Fibres musculaires longitudinales, 22= Anus, 23= Glandes salivaires.

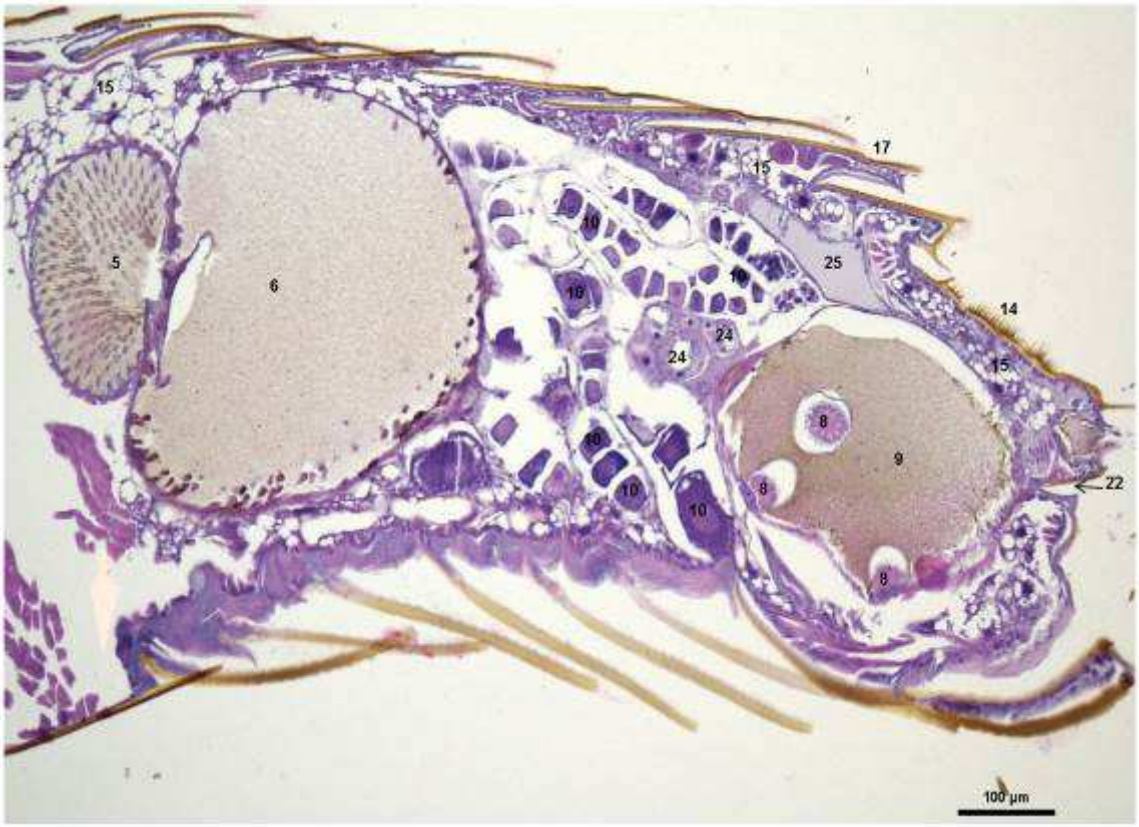


Figure 15. Abdomen d'une puce *C. felis* femelle gorgée (Coloration à l'hémalun-éosine, grossissement d'origine x100). Photographie originale.



Figure 16. Abdomen d'une puce *C. felis* femelle gravide (Coloration à l'hémalun-éosine, grossissement d'origine x100 pour l'abdomen et x1000 pour la glande salivaire). Photographie originale.

5= Proventricule, 6= Intestin moyen, 8= Glandes rectales, 9= Ampoule rectale remplie de sang digéré, 10= Ovarioles, 14= Sensilium, 15= Tissu adipeux, 17= Cuticule, 22= Anus, 23= Glandes salivaires, 23a= Lumière de la glande, 23b= Noyau de la cellule épithéliale, 23c= Cellule épithéliale, 24= Tubes de Malpighi, 25= Vaisseau dorsal (« Cœur »), 26= Ovaires, 27= Œufs.

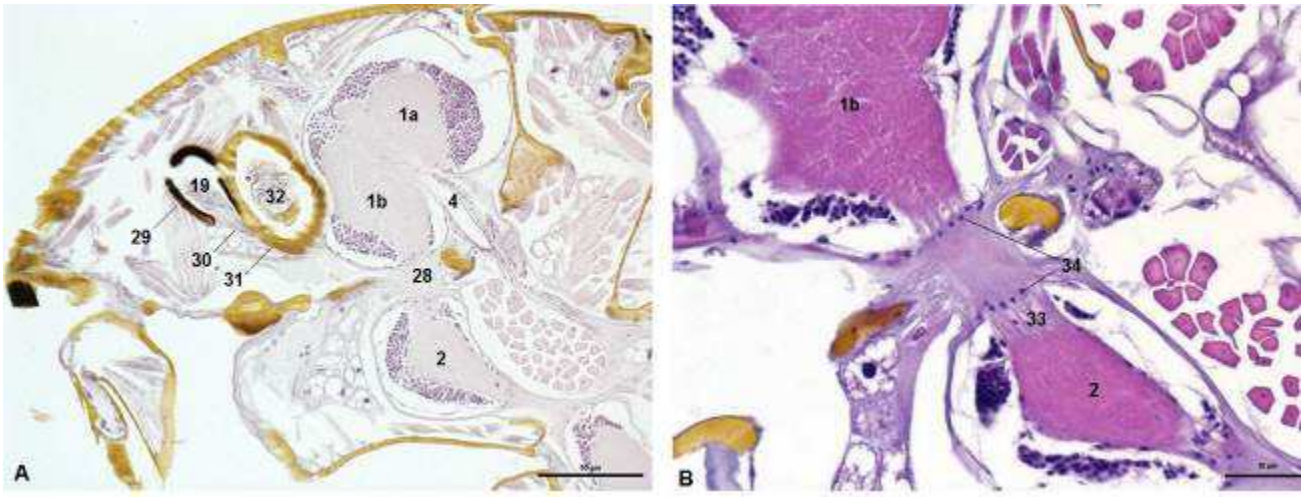


Figure 17. Système nerveux central de *C. felis* (Coloration à l'hémalun-éosine). (A) : Tête (Grossissement d'origine x200), (B) : Connections nerveuses entre le ganglion sous-oesophagien et le premier ganglion thoracique (Grossissement d'origine x400). Photographies originales.

1= Cerveau, 1a= Ganglion sus-oesophagien, 1b= Ganglion sous-oesophagien, 2= Ganglions thoraciques, 4= Œsophage, 28= Connections entre 2 ganglions, 29= Pigments de l'œil, 30= Départ du nerf optique, 31= Cuticule à la base des antennes, 32= Antennes, 33= Axones, 34= Noyaux des neurones.

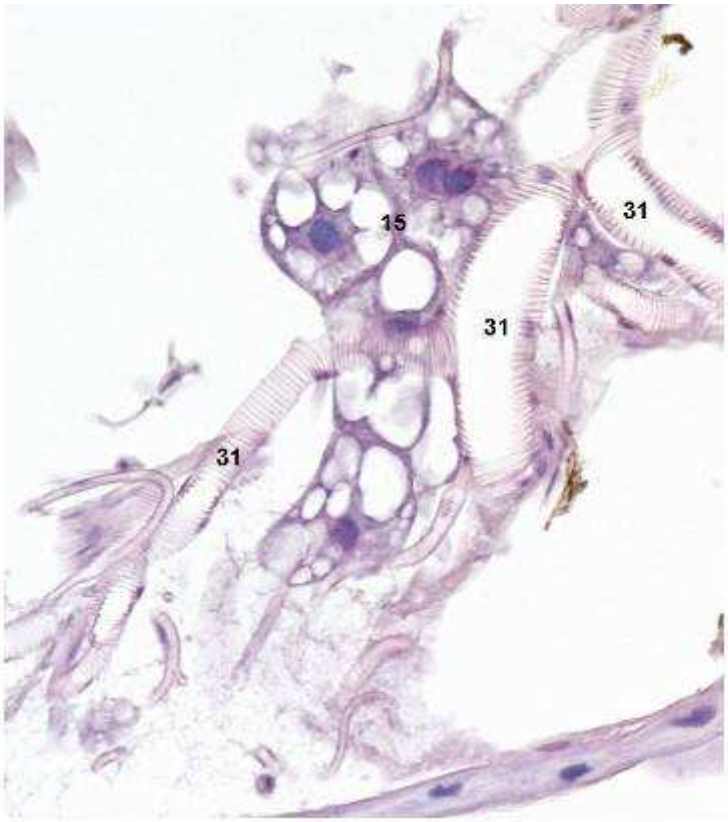


Figure 18. Système respiratoire de *C. felis* (Coloration à l'hémalun-éosine, grossissement d'origine x400). Photographie originale.

15= Tissu adipeux, 31= Trachéoles.

PCRq des déjections : Nous avons vu dans le travail précédent qu'après 48 heures de gorgement sur sang contaminé par *B. henselae*, l'ADN de cette bactérie était détectable dans les puces entières et dans leurs déjections pendant au moins 12 jours. Ces résultats sont importants pour contrôler l'infection effective des puces. Pour les 12 jours de suivi, les valeurs de Ct des déjections obtenues pour la PCR ciblant l'ADN 18 S de *C. felis* varient entre 15,48 et 19,58, avec une valeur moyenne de 18,15 ± 1,22. Après correction, les valeurs de Ct obtenues pour *B. henselae* ont varié de 27,05 à 38,56 ± 3.6 entre les jours 1 et 12.

PCRq des organes : les valeurs de Ct des différents organes de puces sont reportées dans le tableau 2 au cours du temps. Ces résultats montrent que l'extraction d'ADN a été bien réalisée dans tous nos prélèvements

Valeurs des Ct de la PCRq ciblant l'ADN de *C. felis*

	Minimum	**Maximum**	**Moyenne**	**Écart-type**
Contenu digestif	16,78	22,13	20,35	1,80
Épithélium de l'intestin moyen	19,91	25,06	22,94	1,49
Épithélium du proventricule	19,14	21,58	20,48	0,96
Ampoule rectale	20,37	25,37	22,41	1,70
Ovaires	21,72	25,2	23,74	1,62

Tableau 2. Valeurs minimales, maximales et moyennes (± écart-type) des Ct obtenus par amplification de l'ADN ribosomique 18S de *C. felis* issu des organes microdisséqués de 20 puces au cours des 12 jours de suivi.

Pendant les premières 48 heures de gorgement, les puces ont été mises en contact avec du sang contenant *B. henselae*. Le sang ingéré et trouvé dans le tube digestif des puces contient des bactéries durant cette période. L'amplification par PCRq des contenus digestifs obtenus lors de microdissection au cours de ces deux premiers jours devait mettre en évidence de l'ADN de *B. henselae*, et servir de témoin positif pour les jours suivants. La détection d'ADN de *B. henselae* a été négative pour tous les prélèvements issus des organes individualisés par microdissection et, de façon surprenante, le contenu du tube digestif est demeuré négatif y compris au cours de la phase initiale d'exposition.

4.2.4. Discussion

Face à cet échec, nous avons envisagé différentes pistes d'amélioration du protocole. Notre technique de qPCR ne nous a pas permis de détecter l'ADN de *B. henselae* à l'échelle des organes de la puce. Plusieurs facteurs peuvent influer la détection d'ADN ou d'ARN dans des tissus microdisséqués. Tout d'abord, le temps de conservation des lames avant microdissection doit être le plus court possible, afin de préserver au mieux la qualité des acides nucléiques. Pour des raisons pratiques, la microdissection n'a pu être réalisée le jour même de la préparation des lames, et les prélèvements ont été généralement regroupés afin d'être microdisséqués ensemble. Il nous a été impossible de traiter toutes les lames le même jour sachant que le temps de dissection moyen par organe sur les sections d'une même lame est de 45 minutes en moyenne. Ainsi le traitement des lames s'est déroulé sur plusieurs jours.
Ensuite, le type de fixation peut avoir une influence. En effet, le formaldéhyde forme des interactions entre les protéines et les acides nucléiques, pouvant ainsi les dégrader considérablement (Foss et al., 1994). Dans une étude, le liquide de Carnoy (acide acétique, chloroforme, éthanol) a été utilisé pour fixer des tubes digestifs d'insectes prélevés par microdissection. Les auteurs montrent que ce type de fixation sans formol permet d'obtenir des ARNm de meilleure qualité et moins dégradés qu'avec une fixation à base de formol (Hong et al., 2011). Une manière de s'affranchir de la fixation au formaldéhyde serait de travailler sur des tissus congelés et de réaliser des coupes au cryostat, comme souvent présenté dans les protocoles de microdissection laser (Espina et al., 2006). Ce type de fixation maintient la réactivité des anticorps, mais la morphologie tissulaire est souvent moins bien conservée qu'en paraffine. De plus, les coupes risquent d'être rendues très friables par la chitine congelée.
Une des principales limites de la microdissection est généralement la faible quantité de tissus prélevés (Espina et al., 2011). Dans notre travail, les sections de puces n'étaient généralement pas toutes exploitables et certaines étaient trop endommagées pour que tous les organes d'intérêt soient identifiables. Ainsi, les prélèvements d'organes se faisaient généralement sur moins de 20 puces. Il faudrait donc augmenter le nombre de puces prélevées par jour en doublant notamment le nombre de puces placées dans le nourrisseur, afin qu'au moins 20 sections soient exploitables lors de la microdissection. Par ailleurs, l'épaisseur de coupe optimale suggérée en microdissection laser est entre 2 et 15 µm. Nous avons réalisé des coupes de 10 µm d'épaisseur. Nous pourrions envisager des coupes de 15 µm, afin d'augmenter la quantité de matériel prélevé. Au-delà de 15 µm, la microdissection n'est pas

complète, laissant une partie des composants tissulaires adhérant à la lame. La quantité de matériel génétique disponible à l'extraction et l'amplification, dans ces conditions, a pu être inférieure à la limite de détection des sondes utilisées estimée à 20 bactéries (Bouhsira et al., 2013). Enfin, l'extraction d'ADN faite sur tissus fixés en paraffine est généralement beaucoup moins sensible que sur tissus frais. L'extraction pourrait être optimisée en utilisant un kit d'extraction d'ADN génomique spécifique pour les tissus fixés et préparés en paraffine (QiAamp DNA FFPE tissue kit, Qiagen). Ce kit permet de réaliser une extraction optimale de l'ADN et propose un protocole adapté incluant une étape de lyse à la protéinase K de plusieurs jours.

Notre système de nourrisseur à membrane nous a permis d'étudier le rôle vecteur potentiel de C. felis *pour quatre espèces de bartonelles et de préciser la persistance de* B. henselae *chez cette puce. En conditions expérimentales, l'ADN de* B. henselae, B. clarridgeiae, B. quintana, B. birtlesii *et* B. tribocorum *a été détecté chez* C. felis *et dans ses déjections pendant au moins trois jours suivant un repas contaminant. L'ADN des cinq espèces de bartonelles testées a été détecté dans le sang sain sur lequel les puces se sont nourries et ce pendant les trois jours de suivi, suggérant une possible transmission lors du repas. La recherche de l'ADN bactérien dans les œufs émis par les puces gorgées sur sang contaminé s'est avérée négative, suggérant que dans ces conditions, les bartonelles n'étaient pas transmises par voie trans-ovarienne chez* C. felis*. Le même dispositif expérimental nous a permis d'étudier la persistance de* B. henselae *chez* C. felis*. Pour cela, des puces* C. felis *nourries pendant 48 heures sur du sang contaminé par* B. henselae*, ont été analysées par PCR quantitative jusqu'à ce qu'aucune puce ne persiste dans le nourrisseur. L'ADN de* B. henselae *a été détecté dans l'organisme des puces et dans leurs déjections pendant toute leur durée de survie sur le nourrisseur.*

CHAPITRE IV

Moyens de lutte contre les puces et prévention de la transmission de *Bartonella* spp.

Synthèse bibliographique et Travaux personnels

Sans puces, il n'y a pas de transmission de *B. henselae* comme nous l'avons présenté dans le chapitre précédent. Le contrôle régulier de ces ectoparasites semble donc être, dans l'état des connaissances actuelles, la seule manière disponible de prévention des infections par cette bactérie. Ainsi, les principales classes d'antiparasitaires permettant une lutte efficace contre les puces sont développées dans la première partie de ce chapitre. Nos travaux personnels consacrés à l'évaluation en laboratoire de nouvelles molécules ou nouvelles formulations pour le contrôle des puces sont développés dans la deuxième partie. Dans la troisième partie, nous proposons un protocole expérimental simple permettant d'évaluer l'efficacité de produits insecticides dans la prévention de la transmission de *B. henselae*.

1. Principaux produits utilisables dans la lutte contre les puces

Les puces adultes trouvées sur un animal domestique représentent seulement 5 % de la population des puces d'un foyer. Les stades immatures (œufs, larves, cocons) présents dans l'habitat constituent la majorité de la population parasitaire et sont des sources de réinfestation pour les animaux. La lutte contre les puces doit donc associer des mesures chimiques contre les puces adultes à des mesures mécaniques, comme une aspiration régulière des maisons pour éliminer les œufs, les larves ou les pupes disséminés dans l'habitat. Les antiparasitaires destinés à la lutte contre les ectoparasites chez les carnivores domestiques ont évolué du fait de l'apparition de nouveaux principes actifs et de nouvelles formes galéniques. De nouvelles familles de neurotoxiques sont apparues et ont remplacé les organochlorés, les organophosphorés et les carbamates progressivement interdits en France. Les régulateurs de croissance des insectes (Insect Growth Regulator (IGR)) sont intéressants, associés ou non aux insecticides. Deux classes d'IGR existent : les analogues de l'hormone juvénile et les inhibiteurs de synthèse de la chitine. L'ensemble de ces insecticides est commercialisé sous différentes formes galéniques dont le but est d'en simplifier l'utilisation par le propriétaire et de favoriser leur compliance.

Les différents groupes chimiques disponibles sur le marché des médicaments vétérinaires sont présentés chronologiquement, du plus ancien au plus récent.

1.1. Les insecticides neurotoxiques

- Organochlorés

Les organochlorés sont des inhibiteurs du GABA (acide gamma aminobutyrique) et stimulent l'ouverture des canaux sodiques situés sur les neurones des ganglions cérébraux des insectes. Ils provoquent une hyperexcitabilité des neurones qui stimule l'activité musculaire de

l'insecte ou de l'acarien et provoque sa mort par convulsions. L'organochloré qui a été le plus utilisé chez les animaux et dans l'environnement est le lindane, découvert en 1912. En raison de sa toxicité chez les mammifères et les oiseaux et du risque d'accumulation dans l'environnement, l'utilisation du lindane est maintenant proscrite dans la plupart des pays (Beugnet et Franc, 2012).

- Organophosphorés

En inhibant les acétylcholinestérases, ils entraînent l'accumulation de l'acétylcholine au niveau des synapses neuromusculaires, provoquant une hyperactivité des arthropodes et une mort par paralysie tonique (O'Brien, 1964). Leur spectre d'activité est large, incluant les insectes et les acariens. Ils ont une rémanence de quelques jours. Leur activité de type parasympathomimétique les rend toxiques en cas de surdosage, notamment chez le chat. Des phénomènes de chimiorésistance ont été décrits vis-à-vis des mouches, des insectes rampants, mais aussi des tiques et des puces dans plusieurs pays du monde. Les molécules de ce groupe sont nombreuses et celles qui ont été le plus utilisées chez les carnivores domestiques sont : le coumaphos, le cythioate, le dimpylate (ou diazinon), le fenthion, le dichlorvos, le fénitrothion principalement sous forme de poudre, de collier, de spray et de spot-on (Beugnet et Franc, 2012). En France, les organophosphorés ont été progressivement retirés du marché, en raison des risques de toxicité potentielle en cas d'exposition chronique chez les utilisateurs, particulièrement chez l'enfant. Seul le dimpylate ou diazinon est toujours disponible avec une autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) soit sous forme de collier (chiens et chats) soit en lotion (chiens).

- Carbamates

Ils ont la même action anticholinestérasique que les organophosphorés, mais présentent moins de toxicité. Leur rémanence est de deux à quatre jours et ils ne s'accumulent pas dans les tissus animaux ni dans l'environnement. Les molécules qui ont été les plus utilisées pour lutter contre les puces étaient le bendiocarbe, le carbaryl et le propoxur, principalement sous forme de poudre ou de colliers. Ils n'ont plus d'A.M.M. en France.

- Pyréthroïdes : pyréthrines et pyréthrinoïdes

Les pyréthrines regroupent un ensemble d'esters insecticides extraits des fleurs du Pyrèthre, *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Einstein, 1994 ; Desfontis, 2010). Elles ont été progressivement remplacées par des dérivés synthétiques, ou pyréthrinoïdes. Les pyréthrinoïdes de seconde génération et de troisième génération, photostables, ont été largement utilisées dans la lutte contre les parasites externes des carnivores domestiques. Les molécules les plus employées chez les carnivores sont la perméthrine, la deltaméthrine et la

fluméthrine (Desfontis, 2010). Les pyréthrinoïdes agissent très rapidement par contact ou par ingestion. Elles maintiennent les canaux sodiques ouverts, conduisant à une dépolarisation membranaire (Dorman et Beasley, 1991). Leur effet peut se dérouler en 3 phases. Tout d'abord, l'action sur le ganglion cérébral est très rapide conduisant à une paralysie. C'est l'effet « knock-down » qui peut être réversible. Une seconde phase d'hyperexcitation due à la dépolarisation des nerfs périphériques entraîne des mouvements rapides et incohérents. La dernière phase est la paralysie puis la mort du parasite (Desfontis, 2010 ; Plumb, 2011). Les pyréthrinoïdes sont peu toxiques chez les mammifères, mais certaines molécules, comme la pyréthrine sont toxiques chez le chat (défaut de glucuronyltransférase hépatique indispensable à la métabolisation de ces molécules) chez qui l'utilisation est formellement interdite. Les pyréthrinoïdes sont très toxiques chez les poissons. Elles sont utilisées chez le chien sous forme de spray, de shampoings, de lotion, de collier ou de spot-on, souvent en association avec d'autres molécules insecticides. Elles peuvent être employées dans l'environnement, parfois en association avec des IGR. Ces molécules sont principalement utilisées dans le traitement et la prévention contre les puces et les tiques, mais également contre les phlébotomes, les moustiques (*Culex* spp, *Aedes* spp) et les mouches piqueuses des genres *Stomoxys* spp et *Haematobia* spp.

- Néonicotinoïdes : l'imidaclopride, le nitenpyram, et le dinotéfuran

Ce sont des agonistes des récepteurs nicotiniques post synaptiques de l'acétylcholine ; ils provoquent donc une paralysie spastique mortelle. Ils ciblent des récepteurs spécifiques aux insectes, étant ainsi très faiblement toxiques pour les mammifères.

L'imidaclopride est lipophile et après son application sous forme de *spot-on*, il diffuse dans la couche lipidique superficielle et se répartit sur l'ensemble du pelage en environ 24 heures. La rémanence de l'activité est d'un mois. L'imidaclopride a une action rapide sur les puces qui meurent dans les deux à huit heures après traitement (Cadiergues et al., 2001 ; Dryden et al., 2005 ; Franc et Yao, 2007). Afin d'élargir son spectre d'action, l'imidaclopride est commercialisé dans des formulations contenant de la moxidectine (Dryden et al., 2011), de la perméthrine (Epe et al., 2003 ; Hellmann et al., 2003) de la fluméthrine (Dantas-Torres et al., 2013 ; Lappin et al., 2013) ou du pyriproxifène (Ross et al., 2013).

Le nitenpyram est un insecticide systémique non rémanent à action rapide. Il est administré par voie orale sous forme de comprimé. Son absorption et son élimination sont rapides : il est absorbé en 30 minutes à deux heures, et est éliminé en environ deux jours par voie urinaire. Lors du repas sanguin, les puces ingèrent le nitempyram et meurent en 15 à 30 minutes. En six heures, l'efficacité adulticide est de 97 % (Dobson et al., 2000).

Le dinotéfuran a le même mode d'action que l'imidaclopride. Il est disponible sous forme de spot-on associé au pyriproxifène et à la perméthrine et présente ainsi un spectre d'action élargi aux tiques et aux stades immatures des puces (Coyne, 2009 ; Bouhsira et al., 2012).

- Phénylpyrazoles : fipronil et pyriprole

Le fipronil a été introduit en médecine vétérinaire dans les années 90. Il se fixe aux récepteurs GABA et glutamate, empêchant l'ouverture des canaux chlore conduisant à une hyperactivité neuronale (Narahashi et al., 2010). Le GABA et le glutamate sont des neurotransmetteurs qui inhibent l'activité musculaire des insectes et des acariens. L'utilisation de fipronil arrête donc l'inhibition de l'excitation cellulaire, et les arthropodes meurent par paralysie spastique. Les récepteurs cibles sont spécifiques des arthropodes d'où une marge de sécurité élevée chez les mammifères. Le fipronil est lipophile ce qui lui permet d'être stocké dans les lipides et les glandes sébacées desquelles il est libéré progressivement. La rémanence d'activité varie de 15 jours à deux mois (Beugnet et Franc, 2010). Les puces meurent en moyenne en 6 heures et généralement en moins de 24 heures (Franc et Beugnet, 2008). Son association au (S) - méthoprène élargit le spectre d'action de la combinaison aux stades immatures des puces (Franc et al., 2007).

Le pyriprole est lipophile et a le même mode d'action que le fipronil. Il est commercialisé sous forme de *spot-on* et une application mensuelle procure une bonne protection contre les réinfestations par les puces (Barnett et al., 2008 ; Schuele et al., 2008).

- Semicarbazone : métaflumizone

La métaflumizone est un insecticide de contact qui agit comme un agoniste des canaux sodiques. En se fixant au récepteur, l'entrée du sodium dans la cellule est bloquée ce qui inhibe l'activité neuronale. Les insectes sont paralysés et meurent. La métaflumizone est commercialisée sous forme de *spot-on* (Holtzmer et al., 2007) et son association à l'amitraz permet d'élargir son spectre d'action aux tiques (Hellmann et al., 2007).

- Oxadiazines : indoxacarbe

L'indoxacarbe est une molécule insecticide qui agit par ingestion. Pour être activé, l'indoxacarbe doit être métabolisé par l'action d'estérases et d'amidases présentes chez l'insecte (McCann et al., 2001 ; Wing et al., 2010). Le métabolite actif provoque un blocage des canaux sodiques conduisant à l'inhibition de l'activité neuronale puis à la mort par paralysie (Silver et al., 2010). L'indoxacarbe est disponible sous forme de spot-on et assure une bonne protection contre les puces pendant six semaines (Dryden et al., 2013). Son association à la perméthrine permet une protection contre les tiques. L'indoxacarbe réduit la viabilité des œufs issus de puces adultes en contact avec cette molécule (Dryden et al., 2013).

- Lactones macrocycliques du groupe des avermectines/milbemycines

Ces molécules ne sont pas des insecticides ou des acaricides au sens strict. Elles ont un large spectre d'action sur les nématodes des mammifères et sur certains parasites externes comme les poux piqueurs, les puces et les agents de gales. Elles se fixent aux récepteurs à glutamate près des canaux chlore, maintenant ces derniers ouverts. L'inhibition des neurones provoque une mort par paralysie. Après application sous forme de *spot-on*, les avermectines sont stockées dans les cellules graisseuses et l'élimination est progressive, essentiellement par voie fécale. Les formulations indiquées dans la lutte contre les puces sont à base de sélamectine (Cadiergues et al., 2001 ; Ritzhaupt et al., 2002 ; Franc et Yao, 2007) ou de moxidectine associée à l'imidacloprid (Arther et al., 2003). Des travaux récents ont montré l'efficacité de cette association dans la prévention de la transmission de *B. henselae* par *C. felis* (Lappin et al., 2013 ; Bradburry et Lappin, 2010).

- Lactones macrocycliques du groupe des spinosynes : spinosad et spinétoram

Les spinosynes sont les dernières molécules à être apparues sur le marché vétérinaire. Elles ont été isolées de la culture du champignon *Saccharopolyspora spinosa* (Mertz et Yao, 1990). Les principales molécules sont les spinosynes A et D. Elles se fixent à des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine différents de ceux ciblés par les autres molécules insecticides. Cela conduit à une stimulation post-synaptique des neurones entraînant des contractions et des tremblements musculaires, prostration, paralysie puis mort rapide des puces (Sparks et al., 2001). Les spinosynes peuvent avoir une action sur les insectes par contact ou par ingestion. Chez les mammifères, elles sont stockées dans le tissu adipeux. Le spinosad est un mélange des spinosynes A et D. Il est disponible sous forme de comprimé appétant pour chien et chat. Son action curative anti-puce est très rapide et commence dans les 30 minutes après ingestion et atteint sont activité maximale dans les quatre heures. Son effet préventif contre de nouvelles réinfestations est d'un mois, avec un effet maximal dans les 48 heures post-administration (Robertson-Plouch et al., 2008 ; Franc et Bouhsira, 2009 ; Blagburn et al., 2010 ; Wolken et al., 2012).

Le spinétoram est une autre molécule appartenant au groupe des spinosynes et résulte d'une modification de la spinosyne J. Il a une action systémique et de contact et agit rapidement : les premières puces sont tuées dans les 30 minutes après le traitement. Cette molécule est commercialisée aux États-Unis sous forme d'un *spot-on* pour chats et assure une protection contre les puces d'un mois.

1.2. Les régulateurs de croissance des insectes

Ce ne sont pas des insecticides : ils inhibent la reproduction et le développement normal des insectes. Les deux groupes les plus importants utilisés en médecine vétérinaire sont les analogues de l'hormone juvénile, qui interfèrent avec des hormones de croissance, et les inhibiteurs de la synthès de la chitine, qui inhibent la chitine synthétase intervenant dans la synthèse de la chitine. Ils présentent une très faible toxicité pour les mammifères.

1.2.1. Les analogues de l'hormone juvénile (ou juvénoïdes)

Ils agissent par contact direct avec la cuticule des œufs nouvellement pondus, empêchant leur évolution en larves. Ils peuvent agir également sur les larves de troisième stade en fin d'évolution en bloquant leur transformation en pupes (Palma et al., 1993 ; Miller et al., 1999 ; Beugnet et Franc, 2012). Les juvénoïdes utilisés en médecine vétérinaire pour lutter contre les puces sont le méthoprène, le (S) méthoprène (isomère actif), le pyriproxifène et le fénoxycarbe (Marchiondo et al., 1990 ; Jacbos et al., 1996 ; Stanneck et al., 2002). Ces molécules peuvent être utilisées en application dans l'environnement sous forme de spray ou de diffuseur, ou directement sur l'animal. Le fénoxycarbe est principalement utilisé dans l'environnement. Le méthoprène et le pyriproxifène sont utilisés en association avec un insecticide/acaricide comme le fipronil, la perméthrine, le dinotéfuran ou l'imidaclopride et sont appliqués aux animaux généralement sous forme de *spot-on* (Young et al., 2004 ; Franc et al., 2007).

1.3.1. Les inhibiteurs de synthèse de la chitine

La synthèse de la chitine intervient tout le long de la vie des insectes : lors de la formation de la larve au moment de chaque mue, et lors du passage de la pupe à l'adulte. En bloquant l'action de la chitine synthétase, ces molécules empêchent la formation de la cuticule. Selon l'âge du stade sur lequel ces molécules sont appliquées, elles empêchent l'éclosion des œufs, la mue larvaire, ou provoquent l'arrêt de l'alimentation de la larve qui succombe dans les 24 à 48 heures (Franc, 1994 ; Elek, 1998). Les molécules les plus utilisées en médecine vétérinaire sont le flufénoxuron dans l'environnement, et le lufénuron administré à l'animal par voie orale ou par injection sous-cutanée. Le lufénuron est stocké dans les tissus adipeux ou se fixe aux protéines plasmatiques. Cette molécule assure un bon contrôle des populations de puces chez le chien et le chat (Blagburn et al., 1995 ; Franc et Cadiergues, 1996 ; Franc et Cadiergues, 1997 ; Jacobs et al., 2001). Une injection unique chez le chat contrôle les réinfestations pendant 26 semaines (Franc et Cadiergues, 1997).

2. Évaluation de l'efficacité de produits destinés à la lutte contre les puces des carnivores

L'efficacité d'un produit contre les puces doit être évaluée par des études cliniques réalisées en laboratoires et sur le terrain. Le déroulement de tests insecticides est standardisé et déterminé par l'Agence du Médicament pour l'Europe (European Medicines Agency in Europe (EMEA) (Marchiondo et al., 2007) et par la Pesticide Agency ou Food and Drug Administration (FDA) pour les États-Unis. Ces travaux permettent de déterminer le spectre d'action, la rapidité d'action contre une infestation existante (effet curatif) ou contre de nouvelles infestations (effet préventif) ainsi que la durée d'action. Ils peuvent également évaluer l'efficacité d'un produit sur les stades immatures (évolution des œufs en larves et des larves en pupes) et sur la prolificité des femelles (ponte). Ces études sont obligatoires pour l'enregistrement de nouvelles formulations.

2.1. Détermination de l'efficacité d'insecticides dans le contrôle des puces des carnivores domestiques

L'évaluation de l'efficacité d'un produit destiné à la lutte contre les puces se déroule en plusieurs étapes. Le laboratoire doit fournir l'espèce de puces (*C. felis* ou *C. canis*), ainsi que le stade (puces adultes, stades immatures) ciblé par le produit. Le choix de l'espèce animale à traiter (chien ou chat) doit être justifié. Les animaux doivent être acclimatés à l'hébergement en laboratoire au moins 15 jours avant le début de l'étude. Ils doivent être placés dans des cages individuelles, afin d'éviter toute contamination croisée entre animaux traités et animaux témoins. L'EMEA préconise l'utilisation d'au moins six animaux par groupe, justifiée notamment par les exigences des analyses statistiques. La présence d'un groupe témoin est toujours nécessaire pour s'assurer que la diminution du nombre de puces observée sur les animaux traités est bien due à l'activité du produit testé.

Chaque animal est infesté une fois par semaine tout au long de l'essai avec 50 à 100 puces non gorgées et d'âge similaire. Le nombre de puces retrouvées sur chaque animal est estimé par peignage réalisé par du personnel compétent, et suivre une procédure détaillée propre au laboratoire. Au moins 50 % des puces doivent être retrouvées sur les animaux témoins à chaque point de peignage.

L'efficacité du produit est évaluée à intervalles réguliers tout au long de la période d'activité revendiquée par le produit. L'efficacité ou l'activité adulticide est toujours déterminée par rapport au groupe témoin. Elle est calculée de la manière suivante :

$$\text{Efficacité}\,(\%) = 100 \times \frac{(\text{Mc} - \text{Mt})}{\text{Mc}}$$

Avec : Mc= moyenne (arithmétique ou géométrique) des puces vivantes retrouvées sur les animaux témoins

Mt= moyenne (arithmétique ou géométrique) des puces vivantes retrouvées sur les animaux traités

L'efficacité contre les puces doit être d'au moins 95 % à chaque point de comptage tout au long de la période d'efficacité revendiquée par le produit.

Une étude déterminant l'activité adulticide d'un produit se déroule suivant les étapes rapportées dans le tableau 3.

Avant J-2	Tous les animaux de l'étude sont infestés avec le même nombre de puces et sont peignés 24 heures ou 48 heures après. Cette infestation préliminaire permet d'éliminer les animaux les moins réceptifs aux puces (moins de 50 % des puces retrouvées lors du peignage). Les résultats de ces comptages sont utilisés pour répartir les animaux en plusieurs groupes (témoin, traité) de sensibilité aux puces équivalente. Pour cela, les animaux sont rangés par nombres de puces décroissants, et sont ensuite attribués de façon aléatoire à un groupe de traitement.
J-2 à J-1	Une infestation est réalisée 24-48 heures avant le traitement dans les études ayant pour but de déterminer **l'effet curatif** d'un produit sur une infestation existante.
J0	Application du produit.
Évaluation de la rapidité d'action	Les puces vivantes sont collectées par peignage des animaux à des temps déterminés (à 1 h, 6 h et 12 h par exemple) dans les 48 premières heures après l'application du produit et comptées.
Évaluation de l'effet préventif	Les animaux sont infestés 24 à 48 heures après le traitement, puis à intervalles réguliers (à J7, J14, J21, J28 par exemple), et sont peignés 24 à 48 heures après chaque infestation pour collecter les puces vivantes qui sont comptées.

Tableau 3. Chronologie des activités effectuées lors de l'évaluation en laboratoire de l'efficacité insecticide adulticide d'une formulation anti-puce à visée curative et/ou préventive.

Peu d'études se sont intéressées à la sensibilité aux insecticides de *C. canis*. Hors, cette espèce est pourtant prédominante dans certains pays d'Europe (Koutinas et al., 1995 ; Alcaino et al., 2002 ; Gonzalez et al., 2004 ; Farkas et al., 2009). Des études épidémiologiques ont par ailleurs mis en évidence l'ADN de *B. henselae* chez *C. canis* (Ishida et al., 2001 ; Blanco et al., 2006 ; Varagnol et al., 2008 ; Marquez et al., 2009 ; Kumsa et al., 2014), suggérant un potentiel rôle vecteur de cette puce. *Bartonella henselae* est par ailleurs responsable d'endocardites chez le chien (Breitschwerdt et al., 1995a). Dans ce contexte, il nous a donc semblé intéressant de tester l'efficacité de différentes formulations antiparasitaires contre *C. canis*, les résultats d'efficacité obtenus pour *C. felis* ne peuvent être étendus à *C. canis*.

2.1.1. Étude de l'efficacité de deux *spot-on* dans la lutte contre *C. canis* chez le chien.

Nous présentons ici deux études cliniques réalisées au sein de notre laboratoire et qui ont déterminé l'efficacité de deux nouvelles formulations associant des insecticides et un IGR contre *C. canis.*

Dans une première étude (Article IV), nous avons évalué l'effet adulticide d'une association de fipronil, d'amitraz et de (S) méthoprène dans le contrôle de *C. canis* chez le chien. Pour cela, deux groupes de neuf chiens chacun, ont été formés (un groupe témoin et un groupe traité). Le traitement a été administré à J0 à raison de 6,7 mg/kg de fipronil, de 8 mg/kg d'amitraz et de 6 mg/kg de (S) méthoprène. Les chiens ont été infestés avec 100 *C. canis* à J-1 pour déterminer l'effet curatif de la formulation puis à J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49 et J56 de manière à étudier la protection contre de nouvelles réinfestations. Les animaux ont été peignés 24 heures après le traitement et après chaque infestation. Le traitement a eu une efficacité de 99 % à 24 heures et de plus de 96 % pendant sept semaines. Ces résultats sont proches de ceux obtenus avec du fipronil associé à du (S) méthoprène contre *C. felis* (Franc et Bouhsira, 2009).

Dans l'article suivant (Article V), nous avons étudié l'effet adulticide d'une association de perméthrine, de pyriproxifène et de dinotéfuran sur *C. canis*. Douze chiens ont été inclus dans l'étude et les six chiens traités ont reçu à J0 à une administration de 68,3 à 129,6 mg/kg de perméthrine, de 9,4 à 17,8 mg/kg de dinotéfuran et de 0,83 à 1,58 mg/kg de pyriproxifène. Les chiens ont été infestés avec 100 *C. canis* à J1, J7, J14, J21 et J28 et ont été peignés 48 heures après. Dans ce même protocole, nous avons déterminé l'efficacité de cette formulation contre *Phlebotomus perniciosus*. Les chiens ont été mis en contact avec 100 *P. perniciosus* femelles à jeun pendant 1 heure à J1, J7, J14, J21 et J28 avant chaque infestation par *C. canis*.

Ce protocole nous a permis d'étudier simultanément l'efficacité de cette association de perméthrine, de dinotéfuran et de pyriproxyfène contre deux espèces parasitaires réduisant ainsi le nombre d'études nécessaires et le nombre de chiens utilisés. L'effet adulticide de la formulation contre *C. canis* a été de plus de 99 % tout au long de l'étude. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus contre *C. felis* avec la même formulation (Bouhsira et al., 2012).
Ces travaux font l'objet des Articles IV et V et ont été publiés respectivement dans ***Veterinary Parasitology*** en 2011 et ***Parasitology Research*** en 2013.

Veterinary Parasitology 179 (2011) 351–353

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Efficacy of fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination spot-on for dogs against adult dog fleas (*Ctenocephalides canis*, Curtis, 1826)

Emilie Bouhsira[a], Stephen S. Yoon[b], Martine Roques[a], Coralie Manavella[c], Solange Vermot[a], Luiz G. Cramer[b], Catherine Ollagnier[c], Michel Franc[a,*]

[a] *Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France*
[b] *Merial Limited, Duluth, GA, USA*
[c] *Merial S.A.S., Saint Vulbas, France*

ARTICLE INFO

Keywords:
CERTIFECT™
Ctenocephalides canis
Dog
Fipronil
Amitraz
(S)-methoprene

ABSTRACT

A novel spot-on formulation combining fipronil, amitraz and (S)-methoprene (CERTIFECT™, Merial Limited, GA, USA) was evaluated in adult Beagle dogs in a study to determine its adulticidal efficacy against the dog flea (*Ctenocephalides canis*, Curtis, 1826). Sixteen dogs were randomly allocated to treatment groups: 8 dogs served as untreated controls, and 8 dogs were treated once. Treatment consisted of applying a new combination formulation to deliver at least 6.7 mg fipronil/kg body weight (bw), 8.0 mg amitraz/kg bw, and 6.0 mg (S)-methoprene/kg bw. The combination was designed to enhance the efficacy against ticks of the original fipronil/(S)-methoprene combination. Each dog was infested with 100 adult unfed dog fleas within 24 h prior to treatment and then at weekly intervals for 8 weeks after treatment. At 24 h after treatment or after each subsequent infestation, each dog was combed thoroughly to remove live fleas to be counted. A single treatment with CERTIFECT provided excellent knock-down of fleas within 24 h after treatment and controlled re-infestations for up to 7 weeks (efficacy $\geq$96.5%, $p < 0.05$).

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The cat flea, *Ctenocephalides felis felis*, is considered to be the predominant flea species found on dogs and cats worldwide (Rust and Dryden, 1997) while the dog flea, *Ctenocephalides canis*, generally is regarded as less important. However, many surveys conducted worldwide show that the spectrum of flea species found on dogs varies largely in the different geographical areas. The prevalence of *C. canis* appears to be greater than that of *C. felis felis* or at least equivalent in many regions: Ireland (Baker and Hatch, 1972), Greece (Koutinas et al., 1995), Albania (Xhaxhiu et al., 2009), Hungary (Farkas et al., 2009), Korea (Chee et al., 2008), New Zealand (Guzman, 1984), Argentina (Gonzales et al., 2004), and Chile (Alcaino et al., 2002). In areas where *C. felis felis* appears to be predominant, *C. canis* still represents a considerable proportion of the flea population: 11.2% in France (Franc et al., 1998), 10% in Spain (Gracia et al., 2007), 12.5% in Germany (Beck et al., 2006), and 21% in the USA (Durden et al., 2005). Moreover, the dog flea is also found on wild canids in many areas (Durden and Traub, 2002). In many epidemiological studies the majority of *C. canis* fleas were found on dogs living outdoors in rural areas (Franc et al., 1998; Alcaino et al., 2002; Gracia et al., 2007). The present work was conducted in order to determine the efficacy of a fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination formulation (CERTIFECT™, Merial Limited, GA, USA) against the dog flea, *C. canis*, after a single topical application on dogs.

* Corresponding author. Tel.: +33 5 61 193 873; fax: +33 5 61 193 971.
E-mail address: m.franc@envt.fr (M. Franc).

0304-4017/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.048

Table 1
Geometric mean flea counts, percent efficacy and P-value relative to non-treated controls for dogs treated with the tested spot on.

Study Day[a]	Untreated control Geometric mean[b] (Arithmetic mean)	Fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination Geometric mean (Arithmetic mean)	Efficacy[c] =Percent reduction of flea counts in treated group (%)	*P*-value[d]
1	73.9 (74.3)	0.1 (0.1)	99.9	<0.05
8	75.6 (75.8)	0 (0)	100	<0.05
15	71.2 (71.9)	0 (0)	100	<0.05
22	71.9 (72.8)	0 (0)	100	<0.05
29	73.1 (73.6)	0.1 (0.3)	99.8	<0.05
36	76.1 (76.4)	0.3 (1.1)	99.6	<0.05
43	73.8 (74.5)	0.5 (4.0)	99.3	<0.05
50	71.4 (72.1)	2.5 (8.5)	96.5	<0.05
57	72.8 (73.6)	19.7 (23.8)	73.0	<0.05

[a] The Day-1 flea infestation was followed by a single treatment application on Day 0 and flea counts at 24 (±3) h (Day 1) after treatment. Subsequent flea counts were completed at 24 (±3) h after flea infestations.
[b] Based on transformation to ln(count + 1). There were 8 animals per treatment group.
[c] Based on geometric means.
[d] Probability value from Friedman's test.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Eight male/male castrated and 8 female healthy Beagle dogs (>3 years old, weighing 8.3–13.8 kg) from the Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) were studied. Dogs had not been exposed to ectoparasiticides within 3 months prior to treatment and were in good health throughout the study. All dogs were shampooed on Day-14 with a non-insecticidal shampoo.

Dogs were housed individually in cages (approximately 1.8 m × 1 m) indoors with controlled environmental conditions. Dogs were fed a commercial dry dog food ration calculated to maintain the animal in a healthy physical state. Water was available *ad libitum* through automatic lickers. No concurrent medication was given during the study. Dogs were managed similarly and with due regard for their well being. Animals were handled in compliance with the relevant Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) approvals, and requirements.

2.2. Experimental design and methods

The dogs were acclimatized to study conditions for 15 days prior to treatment and were observed for general health conditions throughout the study. On Day-7, each of 20 dogs was infested with 100 *C. canis* from a strain established and maintained as a closed colony at ENVT since 2008. On Day-6, flea comb counts were conducted to assess the ability of dogs to maintain infestations. Each dog was combed for 10 min by two technicians using a fine flea comb (12 teeth/cm). Each animal's entire coat was combed thoroughly, and combing was stopped only after no flea was found during the last minute of combing. If fleas were found, combing continued until no flea was found during one minute time frame. The 16 dogs with the highest pre-treatment flea counts and good health status were selected for the study.

On Day-4, eight replicates of two dogs each were formed based on descending pre-treatment flea counts within sex. Within replicates, dogs were randomly allocated to one of two treatment groups.

Dogs (4M and 4F) in Group 1 remained untreated and served as controls. Dogs (4M and 4F) in Group 2 received the fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination, administered to the skin in two spots in front of the scapulae and between the base of the skull and the scapulae, once on Day 0, at a dose volume of 1.07 mL for dogs ranging from 2 to 10 kg and 2.14 mL for dogs ranging from 10 to 20 kg. The composition of the combination is designed to deliver at least 6.7 mg fipronil/kg bodyweight (bw), 8.0 mg amitraz/kg bw and 6.0 mg (S)-methoprene/kg bw.

On Days-1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56, each dog was infested with 100 ± 2 adult unfed *C. canis*. Live fleas were removed and counted 24 ± 3 h after treatment or infestation. Personnel conducting comb counts and caring for the animals were blinded to treatment group allocations. To prevent cross-contamination between treatment groups, separate flea combs and lab coats were used for each treatment group and were labelled as such. Gloves were changed systematically between each dog.

2.3. Data analysis

Counts of live adult fleas were transformed to the ln(count + 1) for calculation of geometric means by treatment group at each time point. Arithmetic means also were calculated. Percent efficacy from the control group mean was calculated for the treated group at every post-treatment time point using the formula:

$$\%\text{Efficacy} = \frac{\text{Geometric mean control} - \text{Geometric mean treated}}{\text{Geometric mean control}} \times \times 100$$

The treated group was compared to the control group using Friedman's test. All tests were two-sided at the significance level $\alpha = 0.05$. Analyses were performed using

procedures of SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) version 9.1.

3. Results

All dogs included in the study demonstrated adequate pre-treatment parasite holding ability. Day-6 flea counts ranged from 66 to 93. All untreated animals maintained adequate flea infestations throughout the study. Post-treatment geometric mean flea counts for untreated control dogs ranged from 71.2 to 76.1 (Table 1). Flea counts for the treated dogs were significantly lower than those for untreated control dogs at all post-treatment evaluations ($p < 0.05$, Table 1). The treatment effectively controlled the existing flea infestation, providing 99.9% efficacy within 24 h after treatment. The treatment provided ≥99.3% efficacy up to 6 weeks after treatment (Day 43) and then 96.5% efficacy, 7 weeks post-treatment.

4. Discussion

Treatment of dogs with the proposed dose rate of the fipronil, amitraz and (S)-methoprene/ combination provided effective control (≥96.5%) of the dog flea for at least 50 days (7 weeks) after treatment. These results are similar to those obtained 10 years ago on *C. canis* with fipronil alone, where 100% efficacy was observed for 37 days after treatment (Cadiergues et al., 2001). Interestingly, spinosad administered *per os* (48.5 mg/kg) also demonstrated to have efficacy over 99.7% during 21 days (Franc and Bouhsira, 2009). Data published by McTier et al. (2000) proved selamectin to be efficacious against *C. canis* and *C. felis felis*, however evaluations were performed 72 h after each infestation (and not 24 h).

The efficacy of the formulation was consistent with that seen for *C. felis felis* strains using fipronil alone (FRONTLINE Top Spot®) and the fipronil/(S)-methoprene combination (FRONTLINE Plus®/Combo®) (Young et al., 2004). In the latter study efficacy on Day 35 was over 99.6% for the two formulations and was 78.9% and 63.9% on Day 49, with the fipronil and the fipronil/(S)-methoprene combination, respectively.

Conflict of interest

The work reported herein was funded in part by a grant from Merial Limited, GA, USA.

Four authors (SSY, CM, LGC and CO) are current employees of Merial, and assisted with study design, data analysis and review of the manuscript, however there were no conflicting interests that may have biased the work reported in this paper.

Acknowledgement

We thank Sonia Gounaud of the parasitological department of the ENVT for her assistance during the in-life phase.

References

Alcaino, H.A., Gorman, T.R., Alcaino, R., 2002. Flea species from dogs in three cities of Chile. Vet. Parasitol. 105, 261–265.
Baker, K.P., Hatch, C., 1972. The species of fleas found on Dublin dogs. Vet. Rec. 91, 151–152.
Beck, W., Boch, K., Mackensen, H., Wiegand, B., Pfister, K., 2006. Qualitative and quantitative observations on the flea population dynamics of dogs and cats in several areas of Germany. Vet. Parasitol. 137, 130–136.
Cadiergues, M.C., Caubet, C., Franc, M., 2001. Comparison of the activity of selamectin, imidacloprid and fipronil for the treatment of dogs infested experimentally with *Ctenocephalides canis* and *Ctenocephalides felis felis*. Vet. Rec. 149, 704–706.
Chee, J.H., Kwon, J.K., Cho, K.O., Lee, Y.J., Abdel-Aty, A.M., Shin, S.S., 2008. A survey of ectoparasite infestations in stray dogs of Gwang-ju City, Republic of Korea. Korean J. Parasitol. 46, 23–27.
Durden, L.A., Traub, R., 2002. Fleas (Siphonaptera). In: Mullen, G., Durden, L. (Eds.), Medical and Veterinary Entomology. Academic Press/Elsevier Science, San Diego, pp. 103–125.
Durden, L.A., Judy, T.N., Martin, J.E., Spedding, L.S., 2005. Fleas parasiting domestic dogs in Georgia, USA: species composition and seasonal abundance. Vet. Parasitol. 130, 157–162.
Farkas, R., Gyurkovszky, M., Solymosi, N., Beugnet, F., 2009. Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness. Med. Vet. Entomol. 23, 187–194.
Franc, M., Bouhsira, E., 2009. Evaluation of speed and duration of efficacy of spinosad tablets for treatment and control of *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) infestations in dogs. Parasite 16, 125–128.
Franc, M., Choquart, P., Cadiergues, M.C., 1998. Répartition des espèces de puces rencontrées chez le chien en France. Rev. Med. Vet. 149, 135–140.
Gonzales, A., Castro, D.C., Gonzales, S., 2004. Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina. Vet. Parasitol. 120, 123–129.
Gracia, M.J., Calvete, C., Estrada, R., Castillo, J.A., Peribanez, M.A., Lucientes, J., 2007. Fleas parasiting domestic dogs in Spain. Vet. Parasitol. 151, 312–319.
Guzman, R.F., 1984. A survey of cats and dogs for fleas; with particular reference to their role as intermediate hosts of *Dipylidium caninum*. N. Z. Vet. J. 32, 71–73.
Koutinas, A.F., Papazahariadou, M.G., Rallis, T.S., Tzivara, N.H., Himonas, C.A., 1995. Flea species from dogs and cats in northern Greece: environmental and clinical implications. Vet. Parasitol. 58, 109–115.
McTier, T.L., Jones, R.L., Holbert, M.S., Murphy, M.G., Watson, P., Sun, F., Smith, D.G., Rowan, T.G., Jernigan, A.D., 2000. Efficacy of selamectin against adult flea infestations (*Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis*) on dogs and cats. Vet. Parasitol. 91, 187–199.
Rust, M.K., Dryden, M.W., 1997. The biology, ecology, and management of the cat flea. Annu. Rev. Entomol. 42, 451–473.
Young, D.R., Jeannin, P.C., Boeckh, A., 2004. Efficacy of fipronil/(s)-methoprene combination spot-on for dogs against shed eggs, emerging and existing adult cat fleas (*Ctenocephalides felis*, Bouche). Vet. Parasitol. 125, 397–407.
Xhaxhiu, D., Kusi, I., Rapti, D., Visser, M., Knaus, M., Lindner, T., Rehbein, S., 2009. Ectoparasites of dogs and cats in Albania. Parasitol. Res. 105, 1577–1587.

Parasitol Res (2013) 112:3799–3805
DOI 10.1007/s00436-013-3568-z

ORIGINAL PAPER

Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on on dogs against *Phlebotomus perniciosus* and *Ctenocephalides canis*

E. Liénard · E. Bouhsira · P. Jacquiet · S. Warin · V. Kaltsatos · M. Franc

Received: 4 July 2013 / Accepted: 31 July 2013 / Published online: 31 August 2013
© The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract This study was conducted to evaluate the efficacy of a new topical ectoparasiticidal spot-on containing 4.95 % dinotefuran (*w*/*w*), 36.08 % permethrin (*w*/*w*) and 0.44 % pyriproxyfen (*w*/*w*) (Vectra 3D™, Ceva, Libourne, France) against Portuguese strain of *Phlebotomus perniciosus* and a French strain of *Ctenocephalides canis* in dogs. Twelve beagle dogs were exposed for 1 h to 100 *P. perniciosus* on day 6 for allocation in two groups. One group was treated on day 0, and the other group was the control group. The dogs were exposed for 1 h to 100 *P. perniciosus* on days 1, 7, 14, 21 and 28. After each sandfly challenge, the same dogs were infested with 100 *C. canis*. Counts of living fleas were determined 48 h after infestation on days 4, 3, 9, 16, 23 and 30. For sandflies, the anti-feeding effect was 96.9, 99.7, 98.7, 83.5 and 87.0 % on days 1, 7, 14, 21 and 28, respectively. The mortality effect was 97.8, 99.8, 73.7, 27.5 and 39.6 % on days 1, 7, 14, 21 and 28, respectively. At each challenge point, the mortality and anti-feeding effects on sandflies were significantly different between the control and treatment groups ($p < 0.05$). The adulticidal effect on *C. canis* remained above 99 % throughout the study period. The results indicate that a combination with dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen may be used as an effective part of an overall flea and sandfly control strategy in dogs for monthly use.

E. Liénard · E. Bouhsira · P. Jacquiet · M. Franc (✉)
Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, INP-ENVT, National Veterinary School of Toulouse, 31076 Toulouse, France
e-mail: m.franc@envt.fr

S. Warin · V. Kaltsatos
CEVA Santé Animale, 10 Avenue de la Ballastière, 33500 Libourne, France

Introduction

The phlebotomine sandfly *Phlebotomus perniciosus* is one of the main vectors of *Leishmania infantum*, the agent of human and canine leishmaniasis in the Mediterranean Basin and the south of France. Prevention of leishmaniasis in dogs can be achieved using an integrative approach. It could include an effective canine vaccine against *L. infantum* (Dantas-Torres 2006; Moreno et al. 2012) associated with a topical registered veterinary product (including synthetic pyrethroids, permethrin or deltamethrin) with a highly repellent effect against sandflies (Miró et al. 2008; Solano-Gallego et al. 2009, 2011; Maroli et al. 2010; Gramiccia 2011; Beugnet and Franc 2012). Preventing sandfly bites protects dogs from leishmaniasis and reduces the risk of human infection (Killick-Kendrick 1999; Quinnel and Courtenay 2009; Mazloumi Gavgani et al. 2002). Several products have demonstrated their sandfly anti-feeding effect: a deltamethrin-impregnated collar (Killick-Kendrick et al. 1997; Franc and Bouhsira 2009a; Reithinger et al. 2004 and Reithinger et al. 2001), a permethrin–imidacloprid spot-on (Mencke et al. 2003; Otranto et al. 2007; Miró et al. 2007) and a permethrin–pyriproxyfen spray (Molina et al. 2006). A formulation combining dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen (Vectra 3D™) was registered in the USA in 2007 and is indicated for the prevention and the treatment of fleas, ticks and mosquitoes in dogs (Franc et al. 2012). This study was conducted to assess the efficacy of the spot-on formulation on another target: *P. perniciosus*. The activity on a European strain of *Ctenocephalides canis* was simultaneously tested. *C. canis* has a worldwide distribution. Its prevalence in dogs carrying fleas was higher than the prevalence of *Ctenocephalides felis* in some countries in Europe, such as Albania or Greece (Xhaxhiu et al. 2009; Dobler and Pfeffer 2011). Besides its direct

pathogenic role, this flea has been proven to be a vector of various pathogens such as *Rickettsia felis*, *Dipylidium caninum* and *Acanthocheilonema reconditum* (Pantchev et al. 2011; Traversa 2013). To the authors' knowledge, only a few studies have been addressed to test the efficacy of various insecticides against this flea species (McTier et al. 2000; Cadiergues et al. 2001; Franc and Bouhsira 2009b; Bouhsira et al. 2011). Evaluation of insecticide susceptibilities between two close *Aedes* species, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, showed a higher tolerance of *A. albopictus* than *A. aegypti* to six larvicides tested (Gómez et al. 2011). By extension, the direct result implementation of the insecticide tests performed for *C. felis* to *C. canis* is not a tolerable position and requires strict assessment, especially for registration purposes.

Materials and methods

The study was conducted in the Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) and was a single-centre, randomized, blinded, controlled efficacy study on two groups of six dogs each. Dogs were handled in accordance with the Animal Welfare and Good Clinical Practice, and the study protocol was approved by the ethics Committee of Midi-Pyrenees. All personnel involved with the collection of efficacy data were blinded to the treatment.

Animals

Twelve beagle dogs (seven females and five males with an age range of 5 to 10 years and weighing between 9 and 13.11 kg) were enrolled in the study. They had not been exposed to ectoparasiticides for 3 months prior to treatment and remained in good health throughout the study. They were housed in individual indoor cages in a controlled environment and had a 4-h daily access to a 2×4 m concrete run without contact with another dog. Each dog was identified with the number of a subcutaneously implanted microchip. They were fed a commercial dry dog food, ration calculated so as to maintain the animal in a healthy physical state. Water was available ad libitum through automatic lickers. Dogs were maintained and handled with due regard for their welfare and were acclimatized to the caged environment for 13 days prior to treatment. They were observed daily for their general health conditions throughout the trial. No concurrent medication was needed to be given during the study.

Six days prior to treatment, each dog was challenged with 100 unfed adult female *P. perniciosus*. The number of engorged female sandflies was used for ranking and group allocation. Dogs were ranked in descending order of their individual pre-treatment sandfly engorgement status. They were then introduced into blocks of two animals; each, and within each block, dogs were randomly allocated in two groups: treatment or control group.

Treatment

The six dogs from the control group remained untreated and the six dogs from the treatment group received on day 0 a dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on of 1.6 ml (for dogs weighing between 4.1 and 10.0 kg) or 3.6 ml (for dogs weighing between 10.1 and 25.0 kg). For all treated animals, the formulation was applied accordingly to manufacturer's instructions by parting the hair and applying it directly to the skin: for dogs weighing less than 10.0 kg, the 1.6-ml pipette was used from which one half of the dose was applied between the shoulder blades and the other at the base of the tail. For dogs weighing more than 10.1 kg, a 3.6-ml pipette was applied to three areas: between the shoulder blades, in the middle of the dorsal midline and at the base of the tail. Treatment dosages ranged from 68.27–129.65 mg/kg for permethrin, 9.36–17.78 mg/kg for dinotefuran and 0.83–1.58 mg/kg for pyriproxyfen.

Flea and sandfly maintenance and supply

The *P. perniciosus* exposure was induced using laboratory reared adult females only. The sandfly strain was obtained from Lisboa, Portugal and was maintained at ENVT under laboratory conditions since 2003.

The *C. canis* infestation was induced using laboratory reared adult fleas (males and females). This strain was obtained from a wild strain (Montesquieu-Volvestre, Ariège, France) and maintained at ENVT under laboratory conditions since 2008.

Experimental design

The 12 dogs were infested with 100 (±2) *P. perniciosus* for a total of six times. The day before exposure, sandflies were aspirated from their breeding cage with a vacuum pump and then placed in challenge nets (100±2 female sandflies per net) with cotton soaked with water and sugar. The challenge assessment cages (60×40×50 cm) were constructed from fine mesh netting mounted on a wooden frame and placed in environmentally controlled rooms. Sandflies were fasted 2 h before exposure to dogs by removing the cottons from cages. Before exposure, dogs were sedated by intramuscular injection of medetomidine (Dexdomitor®, Pfizer Santé animale, Paris, France), ketamine (Clorketam®, Laboratoire Vetoquinol S.A., Lure, France) and diazepam (Valium®, Roche injectable, Neuilly [s]/ Seine, France) at a dose rate of 4 μg/kg, 9 mg/kg and 0.5 mg/kg, respectively and then placed in individual infestation proof nets containing sandflies. The dosage of the anaesthetic was approximately calculated to immobilize dogs for

1 h. The exposition duration was 60±5 min. During infestations, treated and control dogs were placed into separated infestation rooms where temperature and relative humidity were maintained between 25 and 26 °C and between 58 and 72 %, respectively. Cages and nets were thoroughly cleaned after each sandfly challenge.

After sandfly exposure, dogs were carefully taken out of the net and examined for any dead sandflies (which were counted). Dogs were then replaced in their cage. All living sandflies were aspirated from each challenge net using a vacuum pump, counted and recorded as engorged or unengorged. All dead sandflies were collected, counted and recorded as dead non-engorged or dead engorged. On days 6, 1, 7, 14, 21 and 28, living sandflies recovered from individual animals at the end of the exposure were placed in separate nets and kept in the infestation rooms at room temperature for 1 day. Each individual net was labelled with an animal number and study code. At 1 day post-exposure, dead sandflies of each net were counted and removed. Then, all remaining sandflies were discarded.

Once dogs had regained full consciousness after anaesthesia (i.e. 3 h±30 min after the end of exposure to sandflies), they were infested with 100±2 *C. canis*. Forty-eight hours after infestation, fleas were counted by carefully combing the entire coat of each dog. Each dog was simultaneously combed by two technicians for at least 10 min, using a fine-toothed comb. If no flea was collected during the last minute, the combing was stopped. If not, the dog was combed until no flea was collected during a period of 1 min. Collected fleas were counted, recorded and discarded.

Dogs were infested on days 6, 1, 7, 14, 21 and 28 and combed on days 4, 3, 9, 16, 23 and 30.

Data analysis

Sandfly anti-feeding effect For each time point after exposure, the anti-feeding rate was evaluated for each group as described below and compared to the control group:

$$\textit{Anti-feeding rate} = \frac{\textit{Total number of unengorged sand flies}}{\textit{Total number of recovered sand flies}}$$

Then, the anti-feeding effect (expressed in percentage) was determined:

$$\textit{Anti-feeding effect} = 100 \times \frac{\textit{Anti-feeding rate in treated dogs–anti-feeding rate in untreated dogs}}{1–\textit{anti-feeding rate in untreated dogs}}$$

Sandfly mortality effect For each time point after exposure, the mortality rate was evaluated for each group as described below and compared to the control group:

$$\textit{Mortality rate} = \frac{\textit{Total number of dead sand flies}}{\textit{Total number of recovered sand flies}}$$

Then, the mortality effect (expressed in percentage) was determined:

$$\textit{Mortality effect} = 100 \times \frac{\textit{mortality rate in treated dogs} - \textit{mortality rate in untreated dogs}}{1 - \textit{mortality rate in untreated dogs}}$$

Anti-flea efficacy The data collected were the number of fleas found alive on the dogs after combing. Effect was assessed on a group basis (the total number of fleas in each group of six dogs). Efficacy of the treatment was calculated as follows:

$$\textit{Efficacy} = 100 \times \frac{\textit{Meancount in control dogs–Meancount in treated dogs}}{\textit{Mean count in control dogs}}$$

The mean count is calculated using the arithmetic mean respecting the EMEA recommendation. The treated group was compared to the control group. Efficacy evaluations are in accordance with those published in July 12, 2012 in the EMEA/CVMP/EWP/82829/2009-Rev. 2 document of the European Medicines Agency (2012).

Statistical analysis

The non-parametric test of Kruskall Wallis was used to test both sandfly and flea data. Differences were considered significant at a p value lower than 0.05. Analyses were performed with Systat 9 software.

Results

No adverse events related to treatment were observed.

Sandflies and anti-feeding effect

The percentages of engorged females before treatment were 73.40 and 74.28 % for both the treated and the control groups, respectively. Dogs from both groups included in the study demonstrated an equal and high pre-treatment parasite holding ability (i.e. above 50 % of engorged females per dog, Fig. 1). All control dogs maintained an adequate number of engorged females throughout the study. After the treatment, only a few engorged females were found in the treated group during the first 2 weeks. For the six treated dogs, a total of 13, one and five engorged females were observed on days 1, 7 and 14, respectively. In the same conditions, the total number of engorged females was 428, 381 and 429 for the control dogs. The treatment had an anti-feeding effect between 96.89 and 99.70 % during the first 2 weeks and between 83.54 and 86.96 % until the end of the trial.

At each challenge point post-treatment (day 1, day 7, day 14, day 21 and day 28), the difference of engorgement status of *P. perniciosus* females between treated and controlled group was significant ($p < 0.05$).

Sandflies and mortality effect

Table 1 reports the mortality effect (or insecticidal effect) of the treatment 1 and 24 h after exposure to dogs. The mortality rate observed 24 h after exposure is close to the one obtained after 1 h exposure: the mortality effect of the formulation has not increased within the 24 h post-exposure and was already quite efficient after 1 h exposure. At each challenge point, there was a significant statistical difference ($p < 0.05$) in the number of dead *P. perniciosus* after 1 and 24 h of exposure between the treatment and control group.

Anti-flea efficacy

Mean counts (SD) of fleas combed 48 h after each infestation are represented in Fig. 2. On days 3, 9, 16 and 23, no fleas were collected in the treated group: the spot-on provided 100 % adulticidal efficacy. The mean counts obtained in the control group remained between 74.33 and 79.33 for the same period. On day 30, no fleas were observed on four of the six treated dogs and only one flea per dog was combed on the other two dogs: the spot-on provided an efficacy of 99.6 %. Before treatment, no significant statistical difference was observed in the number of combed between groups ($p > 0.5$). Then at each challenge point, the difference was significant ($p < 0.05$).

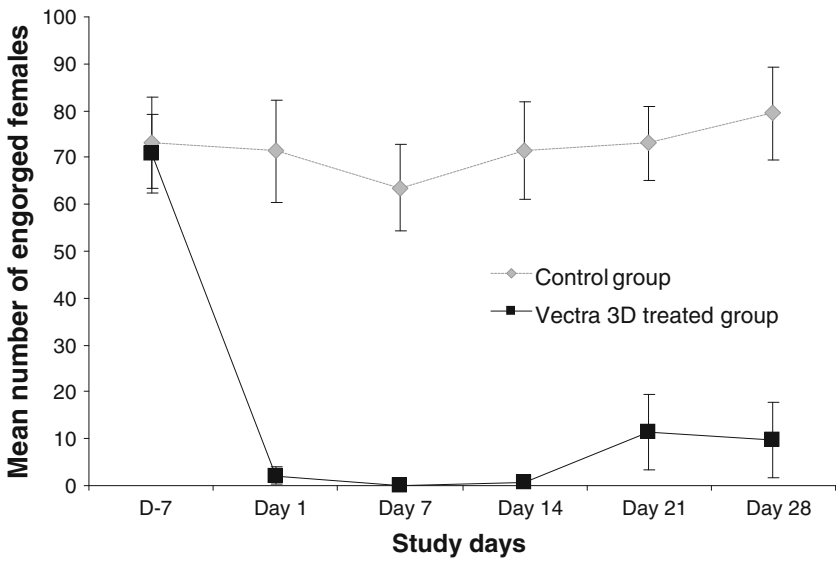


Fig. 1 Mean number of engorged *Phlebotomus perniciosus* females after 1 h exposure to control and treated dogs. Dogs were treated on day 0 with a dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on and then weekly challenged with 100 *P. perniciosus* females

Table 1 Mortality and anti-feeding effect of a dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination against *P. perniciosus*

		Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Mortality effect	1 h	97.6 %	99.8 %	72.9 %	24.1 %	38.0 %
	24 h	97.8 %	99.8 %	73.7 %	27.5 %	39.6 %
Anti-feeding effect	1 h	96.9 %	99.7 %	98.7 %	83.5 %	87.0 %

The spot-on was applied to dogs on day 0, and animals were weekly exposed to 100 *P. perniciosus* females

Discussion

The combination of several products (acaricides, insecticides and insect growth regulators) is available and safe for the integrated control of ectoparasites on domestic dogs (Horak et al. 2012). The development of insecticide resistance is a continuing threat. Simultaneous use of several insecticides exhibiting several mechanisms of action with different molecular targets could be a way to decrease the emerging risk of genetic resistance among pests of domestic animals. In the present study, the efficacy of a spot-on combining dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen was experimentally assessed on *P. perniciosus* and *C. canis*. Moreover, dinotefuran has been suggested to be used in areas of resistant mosquitoes against common insecticides (Corbel et al. 2004).

Pyriproxyfen has not a repellent or adulticidal activity. We assume that the repellent and insecticidal effects on adults observed here were due to the combination of permethrin and dinotefuran.

The repellent effect provided by the association of pyrethroids and neonicotinoids in the current trial could ensure a rapid and high efficient protection of dogs against *P. perniciosus* bites, which is interesting in the context of a short stay in an endemic area of canine leishmaniasis. No difference during the first week post-treatment of the anti-feeding effects was noticed between our results and the report of Molina et al. (2012) using a 65 % permethrin spot-on. In this previous study, the values of anti-feeding effect were 99.13 % (day 1) and 93.43 % (day 8). These results were close to the values found here: 96.9 % (day 1) and 99.7 % (day 7). However, the anti-feeding effect obtained with permethrin alone was not as persistent as the combination of dinotefuran and permethrin tested here. The decrease was more dramatically for permethrin alone ranging from 86.8 % at day 15 to 61.03 % at day 29; meanwhile, the repellency was up to 87 % at day 28 in the present study. Another test combining 10 % imidacloprid (*w*/*v*)/ and 50 % permethrin (*w*/*v*) spot-on presented anti-feeding effects close to those obtained with the currently tested formulation for the first 3 weeks post-treatment (Miró et al. 2007): 97.7 % (day1), 96.3 % (day 7), 96.5 % (day 14), 92.7 % (day 22) and 74 % (day 29). Considering all these results, an added value of dinotefuran was strongly suggested for the anti-feeding lasting effect against *P. perniciosus*.

The association of permethrin with dinotefuran exhibited a similar insecticidal effect (or mortality effect) against *P. perniciosus* compared to permethrin alone for the first 2 weeks (Molina et al. 2012) but was more persistent over time. Indeed, the 65 % permethrin solution provided mortality effects of 97.6 % (day 1) and 79.7 % (day 8). Interestingly, the new combination tested here ensured a better and longer insecticidal effect than permethrin in association with imidacloprid (Miró et al. 2007): 53.2 % (day 1), 49.4 % (day 7), 15.1 % (day 14), 13.2 % (day 22) and 2.9 % (day 29). The synergy of action can result to this specific combination as it was demonstrated for

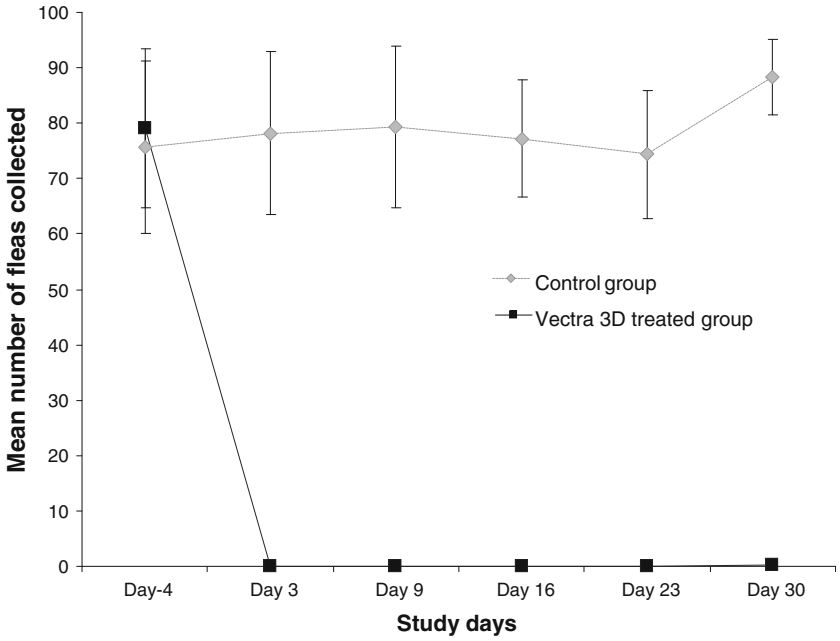


Fig. 2 Mean numbers of *Ctenocephalides canis* on treated and control dogs 48 h after each weekly infestation. Dogs were treated on day 0 with a dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on and then weekly infested with 100 *C. canis*. They were combed 48 h after infestation

imidacloprid and flumethrin against ticks and *C. felis* and required more investigations (Stanneck et al. 2012). The comparison of long- or medium-term repellent and insecticidal efficacy is often difficult for different topical applications such as collar, spot-on or spray (Horak et al. 2012). Nevertheless, our results suggest a high improved insecticidal activity using the combination of permethrin and pyriproxyfen with the addition of dinotefuran in comparison to the spray associating permethrin and pyriproxyfen at day 7 (29.6 %) to day 28 (0.8 %); meanwhile, values of repellent effect were similar throughout the survey period (Molina et al., 2006). The high mortality effect with high repellent activity was reported by Franc et al. (2012) against *Aedes aegypti* the day following the treatment without explanation. The lethality or repellency was probably not due to the volatility of permethrin and dinotefuran. Vapour pressures of both compounds are very low: 1.7×10^{-6} Pa at 25 °C for dinotefuran and 7×10^{-5} Pa at 20 °C for permethrin. New surveys with specific designs are necessary to elucidate this issue.

No divergence has been observed for the adulticidal efficacy of the tested formulation between *C. canis* (100 % efficacy until day 23 and 99.6 % on day 30) and a French strain of *C. felis* previously tested (100 % efficacy until day 16, 99.7 % on day 23 and 96.2 % on day 30, Bouhsira et al. 2012). These results suggest a similar susceptibility for both *Ctenocephalides* species to the tested association. The combination of dinotefuran and pyriproxyfen has been tested on cats against *C. felis* (Murphy et al. 2009). The adulticidal activity of dinotefuran has been found to be more immediate in the first 2 h after the application than imidacloprid. Eventually, Dryden et al. (2011) showed that this combination was efficient in in-home investigations in Florida (USA) for at least 1 month in the control of flea infestations and re-infestations.

To conclude, the tested combination of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen had an immediate repellent effect against *P. perniciosus* and an adulticidal effect on *C. canis* that lasted for 4 weeks. This combination can be recommended for use on dogs living or travelling in leishmaniosis endemic areas with an application repeated every 3 to 4 weeks.

Acknowledgments The authors wish to thank gratefully Martine Roques, Solange Vermot and Sonia Gounaud for their technical assistance.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

Beugnet F, Franc M (2012) Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. Trends Parasitol 28:267–279

Bouhsira E, Yoon SS, Roques M, Manavella C, Vermot S, Cramer LG, Ollagnier C, Franc M (2011) Efficacy of fipronil, amitraz and (S)-methoprene combination spot-on for dogs against adult dog fleas (*Ctenocephalides canis*, Curtis, 1826). Vet Parasitol 179:351–353

Bouhsira E, Liénard E, Jacquiet P, Warin S, Kaltsatos V, Baduel L, Franc M (2012) Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from cats to dogs. Vet Parasitol 190:541–546

Cadiergues MC, Caubet C, Franc M (2001) Comparison of the activity of selamectin, imidacloprid and fipronil for the treatment of dogs infested experimentally with *Ctenocephalides canis* and *Ctenocephalides felis felis*. Vet Rec 149:704–706

Corbel V, Duchon S, Zaim M, Hougard JM (2004) Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes. J Med Entomol 41:712–717

Dantas-Torres F (2006) Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. Vet Parasitol 141:1–8

Dobler G, Pfeffer M (2011) Fleas as parasites of the family Canidae. Parasit Vectors 4:139

Dryden MW, Payne PA, Vicki S, Riggs B, Davenport J, Kobuszewski D (2011) Efficacy of dinotefuran–pyriproxyfen, dinotefuran–pyriproxyfen–permethrin and fipronil–(S)-methoprene topical spot-on formulations to control flea populations in naturally infested pets and private residences in Tampa, FL. Vet Parasitol 182:281–286

European Medicines Agency (2012) Testing and evaluation of the efficacy of antiparasitic substances for the treatment and prevention of tick and flea infestations in dogs and cats. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Medicine_QA/2009/10/WC500004604.pdf. Accessed 28 May 2013

Franc M, Bouhsira E (2009a) Efficacy of a combination of a fipronil-(S)-methoprene spot-on formulation and a deltamethrin impregnated collar in controlling fleas and sandflies on dogs. Vet Ther 10:71–77

Franc M, Bouhsira E (2009b) Evaluation of speed and duration of efficacy of spinosad tablets for treatment and control of *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) infestations in dogs. Parasite 16:125–128

Franc M, Genchi C, Bouhsira E, Warin S, Kaltsatos V, Baduel L, Genchi M (2012) Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. Vet Parasitol 189:333–337

Gómez A, Seccacini E, Zerba E, Licastro S (2011) Comparison of the insecticide susceptibilities of laboratory strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Mem Inst Oswaldo Cruz 106:993–996

Gramiccia M (2011) Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. Vet Parasitol 181:23–30

Horak IG, Fourie JJ, Stanneck D (2012) Efficacy of slow-release collar formulations of imidacloprid/flumethrin and deltamethrin and of spot-on formulations of fipronil/(s)-methoprene, dinotefuran/pyriproxyfen/permethrin and (s)-methoprene/amitraz/fipronil against *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis felis* on dogs. Parasit Vectors 5:79. doi:10.1186/1756-3305-5-79

Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC (1997) Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. Med Vet Entomol 11:105–111

Killick-Kendrick R (1999) The biology and control of phlebotomine sandflies. Clin Dermatol 17:279–289

Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, Paltrinieri S, Roura X, Zini E, Zatelli A (2010) Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc 236:1200–1206

Mazloumi Gavgani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR (2002) Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic

visceral leishmaniasis in Iranian children: a matchedcluster randomised trial. Lancet 360:374–379

McTier TL, Jones RL, Holbert MS, Murphy MG, Watson P, Sun F, Smith DG, Rowan TG, Jernigan AD (2000) Efficacy of selamectin against adult flea infestations (*Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis*) on dogs and cats. Vet Parasitol 91:187–199

Mencke N, Volf P, Volfova V, Stanneck D (2003) Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sandflies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. Parasitol Res 90:S108–S111

Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R (2007) Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. Vet Parasitol 143:375–379

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G (2008) Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. Trends Parasitol 24:371–377

Molina R, Miró G, Gálvez R, Nieto J, Descalzo MA (2006) Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. Vet Rec 159:206–209

Molina R, Espinosa-Góngora C, Gálvez R, Montoya A, Descalzo MA, Jiménez MI, Dado D, Miró G (2012) Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. Vet Parasitol 187:529–533

Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S (2012) Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. PloS One 6:e1683. doi:10.1371/journal.pntd.0001683

Murphy M, Ball CA, Gross S (2009) Comparative in vivo adulticidal activity of a topical dinotefuran versus an imidacloprid-based formulation against cat fleas (*Ctenocephalides felis*) on cats. Vet Ther 10:9–16

Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D (2007) Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. Vet Parasitol 144:270–278

Pantchev N, Etzold M, Daugschies A, Dyachenko V (2011) Diagnosis of imported canine filarial infections in Germany 2008–2010. Parasitol Res 109:S61–S76. doi:10.1007/s00436-011-2403-7

Quinnel RJ, Courtenay O (2009) Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitol 136:1915–1934

Reithinger R, Teodora U, Davies CR (2001) Topical insecticide treatments to protect dogs from sandfly vectors of leishmaniasis. Emerg Infect Dis 7:872–876

Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR (2004) Are insecticide-impreganted dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? Int J Parasitol 34:55–62

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitol 165:1–18

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit Vectors 4:86. doi:10.1186/1756-3305-4-86

Stanneck D, Ebbinghaus-Kintscher U, Schoenhense E, Kruedewagen EM, Turberg A, Leisewitz A, Jiritschka W, Krieger KJ (2012) The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. Parasit Vectors 5:73. doi:10.1186/1756-3305-5-73

Traversa D (2013) Fleas infesting pets in the era of emerging extra-intestinal nematodes. Parasit Vectors 6:59. doi:10.1186/1756-3305-6-59

Xhaxhiu D, Kusi I, Rapti D, Visser M, Knaus M, Lindner T, Rehbein S (2009) Ectoparasites of dogs and cats in Albania. Parasitol Res 105:1577–1587. doi:10.1007/s00436-009-1591-x

2.1.2. Etude de l'efficacité d'une formulation orale dans la lutte contre *C. felis* chez le chien

L'Article VI synthétise les résultats de deux études menées en laboratoire et de deux études sur le terrain concernant l'efficacité du spinosad dans la lutte contre *C. felis* chez le chien. Nous avons réalisé une des deux études en conditions expérimentales contrôlées. Dix-sept chiens (9 témoins et 8 traités) ont été infestés artificiellement par 100 *C. felis* à J-1, J7, J14, J21 et J28 et ont reçu à J0 une dose de 48,2 à 53 mg/kg de spinosad. Les chiens ont été peignés 48 heures après chaque infestation. À ce dosage, nous avons obtenu une activité adulticide de 100 % pendant les trois premières semaines, puis supérieure à 96 % jusqu'à J30. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans l'autre étude en laboratoire réalisée en Allemagne, qui rapporte une efficacité supérieure à 96 % jusqu'à J30 au dosage de 45,9 à 54 mg/kg. Les investigations en conditions naturelles ont été réalisées chez des chiens de propriétaires particuliers venus en consultation chez leur vétérinaire praticien. Pour être inclus, les animaux devaient avoir au moins six puces dans leur pelage et ne pas avoir reçu de traitement antiparasitaire pendant au moins trois mois. La première étude a été réalisée dans des cliniques vétérinaires de cinq pays d'Europe (France, Royaume-Uni, Allemagne, Italie et Pays-Bas) et a duré un mois. Les chiens ont reçu une administration à J0 de spinosad entre 45 et 70 mg/kg et ont été peignés à J14 et J30. Le pourcentage de réduction de puces était supérieur à 97 % au cours du mois de suivi. La deuxième étude a été réalisée uniquement en France, et les animaux ont été suivis pendant trois mois. Ils ont été traités avec 45 à 70 mg/kg de spinosad à J0, J30 et J60 et ont été peignés à J14, J30, J60 et J90. Dans ces conditions, le pourcentage de réduction du nombre de puces a été supérieur à 97,8 % pendant les 90 jours de suivi. Les groupes traités ont été comparés dans les deux études avec un groupe traité à la sélamectine. Pour chaque point de peignage, l'activité adulticide du spinosad contre les puces a eu une efficacité significativement supérieure celle de la sélamectine.

Ces résultats sont rapportés dans l'**Article VI** publié dans ***Veterinary Record*** en 2012 et intitulé : "**Evaluation of spinosad for the oral treatment and control of flea infestations on dogs in Europe**".

Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on February 3, 2014 - Published by group.bmj.com

Papers

Evaluation of spinosad for the oral treatment and control of flea infestations on dogs in Europe

S. Wolken, M. Franc, E. Bouhsira, S. Wiseman, B. Hayes, B. Schnitzler, D. E. Jacobs

The novel ectoparasiticide spinosad is a naturally occurring mixture of spinosyns A and D formed during a fermentation process. The spinosyns are tetracyclic macrolides with a unique ring system. Their mode of action differs from that of other commercially available insecticides. Laboratory and field trials were conducted to evaluate the use of spinosad in a chewable tablet at a dose range of 45 to 70 mg/kg for the treatment and control of flea infestations on dogs in Europe. Laboratory studies with artificially infested dogs confirmed persistent activity against *Ctenocephalides felis* of higher than 99 per cent at three weeks post-treatment with values of 96.5 to 97.8 per cent at four weeks. Two multicentric field trials with naturally infected client-owned animals in five European countries used selamectin as comparator. Monthly doses were given during the summer when many homes were heavily infested. Households with spinosad-treated dogs showed cumulative benefits with flea burdens reduced by about 97 per cent at 14 and 30 days and by 99.6 per cent at 60 and 90 days. Corresponding figures for selamectin were significantly lower ($P<0.05$) at all time points: between 88.5 and 91 per cent at 14 and 30 days, then 97.8 and 98.2 per cent at 60 and 90 days. Thus, the performance of spinosad compared favourably with that of the established reference product.

DESPITE the introduction over the past 10 to 15 years of a number of highly effective long-acting topically applied pulicidal compounds such as imidacloprid, fipronil, selamectin, pyriprole and metaflumizone (Dryden 2009), fleas continue to be a frequent cause of discomfort and canine disease throughout much of Europe (Farkas and others 2009). The so-called 'cat flea', *Ctenocephalides felis*, feeds on humans as well as on a variety of domesticated and wild animals, and is the commonest species found on dogs. Fleas mostly cause minor irritation, unless present in large numbers, but some dogs may develop hypersensitivity reactions (flea-allergic dermatitis) of greater or lesser severity. Fleas may also transmit other potential pathogens such as the tapeworm, *Dipylidium*, and microorganisms including some *Bartonella* and *Rickettsia* species (Rolain and others 2003, Shaw and others 2004). Cat fleas have shown a propensity to develop resistance to earlier insecticidal classes, such as cyclodienes, carbamates, organophosphates and pyrethroids. Extending the longevity of currently effective therapies should be a major goal of the veterinary community (Rust 2005). Thus, there is a continuing need to develop improved flea-control methodologies and to expand the chemotherapeutic options available to the veterinarian for this purpose.

The latest addition to the range of commercially available long-acting pulicides is spinosad (Comfortis, Elanco) which is characterised by oral rather than topical administration and a rapid speed of kill (Blagburn and others 2010). Spinosad is a naturally occurring mixture of spinosyns A and D formed during a fermentation process employing the soil-dwelling actinomycete, *Saccharopolyspora spinosa*. Structurally, spinosyns are tetracyclic macrolides with a unique ring system. They exhibit a novel mode of action primarily involving nicotinic acetylcholine receptor binding sites (nAChRs) that are distinct from those targeted by other insecticides (Sparks and others 2001). The outcome is disruption of the flea's nervous system. A secondary effect on γ-aminobutyric acid (GABA) may potentiate this pulicidal activity. The low mammalian toxicity associated with spinosad is likely to be due to a lack of homology between insect and mammalian nicotinic and/or GABA receptors. Spinosad is presented for flea-control as a 'chewable' tablet (ie, a tablet that is efficacious whether swallowed whole or after being chewed or bitten). Preliminary dog studies indicated that effective flea-control over a four-week period could be obtained with dose rates of 30 mg spinosad/kg bodyweight or above (Snyder and others 2007). A minimum dose of 45 mg/kg was selected for European laboratory studies to ensure compliance with all local regulatory requirements (EMEA/CVMP 2007). As is the case with all medicines presented in tablet form, any combination of tablet sizes has to cover a range of bodyweights and tablet strengths are therefore designed to provide dosag-

Veterinary Record (2012) 170, 99 doi: 10.1136/vr.100211

S. Wolken, DrMedVet,
University of Veterinary Medicine Hannover, Institute for Parasitology, Buenteweg 17, 30559 Hannover, Germany
M. Franc, PhD, DVM, DipEVPC,
E. Bouhsira, DVM,
Université de Toulouse, INP, ENVT-Parasitologie-Dermatologie, Ecole Nationale Vétérinaire, 23 chemin des capelles, 31076 Toulouse cedex, France
S. Wiseman, PhD,
B. Hayes, BSc,
B. Schnitzler, DrMedVet,
Elanco Animal Health, Lilly House, Priestley Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 9NL, UK
D. E. Jacobs, BVMS, PhD, DipEVPC, FRCVS, FRCPath,
Department of Pathology and Infectious Diseases, Royal Veterinary College, University of London, Hawkshead Lane, North Mymms, Hatfield, Herts, AL9 7TA, UK

Correspondence to Dr Schnitzler,
e-mail: schnitzler_beate@lilly.com

Provenance: not commissioned; externally peer reviewed

Accepted October 5, 2011

Published Online First December 2, 2011

UNLOCKED

Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on February 3, 2014 - Published by group.bmj.com

es within strictly defined limits. This paper describes laboratory and field investigations evaluating a dose range of 45 to 70 mg spinosad/kg bodyweight for the oral treatment and control of flea infestations on dogs in Europe.

Materials and methods

Three laboratory and two multicentric field studies are reported. They complied with internationally accepted guidelines and standards for trial design and animal welfare (EMEA/CVMP 2000, 2007, Marchiondo and others 2007) as well as all relevant local regulations and ethical requirements.

Laboratory studies

Study design

Laboratory investigations included a preliminary dose-demonstration study using unformulated spinosad powder and two dose-confirmation studies with chewable tablets. All were designed as randomised complete block studies and partly blinded to minimise the risk of unintentional bias. The dose-confirmation studies were conducted independently at separate locations.

Animals and infestations

Individually housed laboratory beagles with bodyweights between 10 and 17 kg were used. As part of the allocation procedure, all dogs were infested with 100 newly emerged unfed fleas about one week before the scheduled treatment date to account for variation in individual susceptibility. Insecticidal activity was evaluated by a similar application of fleas on the days indicated for each study. Fleas were counted and removed 48 hours after each infestation. To do this, dogs were combed systematically with a fine-toothed comb until no more fleas were detectable. Personnel conducting flea-counts were unaware of which treatment had been given.

Treatment

An earlier observation (Snyder and others 2007) had suggested that feeding around the time of dosing improves spinosad bioavailability. On the day of treatment, therefore, all dogs were offered 25 per cent of their daily canned ration no more than 30 minutes before they were dosed. Control dogs received a placebo identical to the spinosad presentation but without an active ingredient. To ensure that the whole dose was swallowed, the capsule or tablet was placed over the back of the tongue with a small volume of water. The remainder of the daily meal was given after dosing.

Statistical analysis

Before each analysis of results, a logarithmic transformation (ln(count+1)) was applied to the live flea-counts for each animal at each scheduled time point. This transformation addressed the skewness of the data and also allowed for zero counts. Back-transformed geometric means were calculated as $e^{\bar{x}}$-1, where $\bar{x}$ was the arithmetic treatment mean of log-transformed counts at a given time point. Efficacy based on the reduction of flea-counts attributable to treatment was calculated using the following formula:

$$\text{Efficacy (per cent)} = \frac{C-T}{C} \times 100$$

Where, C is the geometric mean of the flea-counts of the control group and T is the corresponding geometric mean for the treated group.

Preliminary study

The preliminary dose-demonstration study (study 1) employed two groups of six dogs, each comprising four males and two females. The purpose was to confirm the residual insecticidal efficacy of spinosad at the proposed European minimum dose rate of 45 mg/kg. For this, each dog was treated on day 0 with an exact dose, based on its bodyweight of unformulated spinosad powder in a gelatine capsule. Control dogs received empty capsules. Fleas were applied on days 21 and 28.

Dose-confirmation studies

The first dose-confirmation trial was conducted in Germany (study 2) and included two groups of eight dogs with equal numbers of males and females in each. The second, in France (study 3), was similar but with an additional female in the control group bringing the total of untreated dogs to nine. Whole spinosad tablets (Comfortis, Elanco) or placebo tablets were given on day 0. Treated dogs weighing less than 12.5 kg received a tablet containing 560 mg spinosad, whereas those over this weight received 810 mg spinosad. Fleas were placed on the animals on the day before treatment (day −1) in the French study and on days 7, 14, 21 and 28 in both studies.

Field studies

Study design

Field investigations included a one-month trial (study 4) covering five European countries (UK, Netherlands, France, Germany and Italy) and a three-month trial (study 5) confined to France but spanning both Atlantic and Mediterranean climatic zones. Each was a blinded positive-control multicentre study using a randomised complete block design. Data collection was standardised using preprinted forms and questionnaires. The experimental unit was the household represented by one dog. Ethical considerations did not permit the use of negative (untreated) controls, and thus spinosad treatments were compared with an established reference product. Because no alternative long-acting oral pulicide was commercially available, selamectin (Stronghold, Pfizer) was selected for this purpose. Although chemically unrelated and topically applied, selamectin (like spinosad) is a long-acting pulicide with systemic activity (Sarasola and others 2002). As the two products are so different in formulation and presentation, their identity could not be masked, but trial blinding was achieved by ensuring that personnel conducting flea-counts were unaware of which treatment had been given. In accordance with current guidelines, the randomised allocation procedure allowed one positive control for every two spinosad test homes.

Animals

For enrolment, dogs at first inspection had to be naturally infested with at least 10 fleas but otherwise healthy, over six weeks old and with a minimum bodyweight of 1 kg. They were not accepted if intended for breeding within six months or if any flea treatment had been used within a specified time period (dependent on the nature of the product used), or if their disposition or hair-coat precluded accurate flea-counting. Cooperating dog owners were fully informed and provided a written consent.

Treatments

Spinosad-treated dogs received an appropriate combination of whole chewable tablets to provide a dose within the range of 30 to 90 mg/kg (although only animals receiving 45 to 70 mg/kg were used for efficacy evaluation, see statistical analysis section below). Their owners, after appropriate instruction, administered the treatments at home together with food. Selamectin was applied as per label instructions (ie, topically as a spot-on preparation to provide a minimum dose of 6 mg/kg). All dogs in multi-pet homes were treated with the same product. Cats in participating households received selamectin irrespective of the dog treatment (since no spinosad formulation suitable for cats was available and flea-control in the home depends on all pets being treated). The use of any other medicament, shampoo, food supplement, environmental treatment etc containing any ingredient efficacious against fleas was prohibited during the course of the trial.

After the initial flea-count and allocation, recruited dogs were dosed on day 0 in the one-month study (study 4) and at monthly intervals on days 0, 30 and 60 in the three-month study (study 5).

Flea-counts

A standardised flea-combing procedure taking at least 15 minutes was performed by trained practice staff using a separate flea-comb for each dog. Only live, viable fleas were recorded (ie, those demonstrating normal movement and behaviour, with an ability to maintain an upright posture and cling onto hair). In study 4, flea-counts were performed on days 14 and 30 (with a discretionary period of ±2 days to encourage owner compliance) and on days 14, 30, 60 and 90 (±three days) in study 5. Observations were completed before dosing on treatment

Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on February 3, 2014 - Published by group.bmj.com

days. In the case of multi-pet homes, flea-count data were collected from only one designated dog.

Statistical analysis

The prescribed spinosad dosage used in these trials was based on results from early studies (Snyder and others 2007) and as a consequence spanned a broader dose range (30 to 90 mg/kg) than that subsequently selected for European registration (45 to 70 mg/kg). To fulfil the objective of the current publication, therefore, data from spinosad-treated dogs receiving less than 45 mg/kg or more than 70 mg/kg were rejected from the analysis. This constrained the numbers of eligible spinosad-treated dogs to 93 (of 197) and 43 (of 130) in studies 4 and 5, respectively. These restrictions did not affect the statistical power or validity of the analysis. The full set of positive control (selamectin) dogs was kept for comparison.

In the absence of negative (untreated) controls, efficacy values were calculated by comparing post-treatment flea-counts with baseline data collected immediately before the first treatment. For reasons outlined above for the laboratory studies, geometric means were used for this purpose. Further analysis on the log-transformed (flea-count+1) data used a repeated measures mixed effects linear model for values on successive observation days. In addition to estimating reduction in flea populations on treated dogs, the proportion of dogs in each treatment group on which no fleas could be found (the 'zero-flea' percentage) was also recorded.

Results

Laboratory studies

In all cases, pretreatment observations confirmed that flea infestations could be established on all animals in sufficient numbers to allow valid statistical analysis. Feeding and treatment procedures were completed without problem and all animals received their full dose, which in the dose-confirmation trials ranged from 45.9 to 54.0 mg/kg. Efficacy values for each observation-point in the three studies are displayed in Table 1. Flea populations established on dogs in study 3 one day before treatment were completely eliminated. Residual efficacies in all three studies were greater than 99 per cent up to three weeks post-treatment, while day 30 values of 96.5, 96.5 and 97.8 per cent were recorded in studies 1, 2 and 3, respectively.

Field studies

The clinical phase of each field study was completed between May and November and encompassed a wide range of geographical, social and climatic regions. Data from 34 veterinary clinics qualified for inclusion in study 4, and from 21 clinics in study 5. The test population in study 4 comprised female and male dogs in almost equal proportions (54.5 v 45.5 per cent). They belonged to no fewer than 52 breeds. Longhaired varieties were, however, in a minority (9.6 per cent). Bodyweight ranged from 1.3 to 65 kg and age from seven weeks to 17 years. Homes with a single dog, with more than one dog (but no cat) or with at least one cat were almost equally represented (32.6, 37.9 and 29.5 per cent, respectively). Most (82.7 per cent) lived partly or fully outdoors. Study 5 was similarly diverse, although a larger proportion (69.3 per cent) was kept indoors.

Flea populations at the time of recruitment were often substantial and were comparable between treatment groups. The largest initial flea infestations recorded for spinosad- and selamectin-treated groups, respectively, were 560 and 229 in the first trial; they were 437 and 394, respectively, in the second trial (Table 2). Pretreatment geometric mean flea-counts for spinosad- and selamectin-treated groups, respectively, were 36.7 and 29.7 in study 4, and 40.7 and 33.5 in study 5.

At both 14 and 30 days post-treatment, flea burdens of spinosad-treated dogs were reduced by about 97 per cent compared with pretreatment values (Table 2), while corresponding figures for selamectin were significantly lower (90.7 and 88.5 per cent on day 14; 89.4 and 91.0 per cent on day 30 in studies 4 and 5, respectively). At the end of the second and third months, reductions of 99.6 per cent were recorded for the spinosad group, while selamectin values were again significantly lower at 97.8 and 98.2 per cent on days 60 and 90, respectively.

The proportion of spinosad-treated dogs on which no fleas could be found (Table 2) varied during the first month from a low of 39.5 per cent (study 5, day 14) to a high of 59.1 per cent (study 4, day 14). Corresponding figures for the selamectin animals were 28.6 per cent (study 5, day 14) to 34.1 per cent (study 4, day 30). Following the second monthly dose, the figures for spinosad and selamectin increased to 77.5 and 62.9 per cent, respectively. By day 90, they had become significantly different (P=0.042) at 85 and 67.1 per cent, respectively.

Discussion

Laboratory studies are usually designed to isolate and define single aspects of the biological activity of an experimental compound. They provide essential building blocks for knowledge and understanding but rarely do they fully reproduce or reflect the complexities of natural disease. In this respect, domestic flea infestations present a particularly challenging therapeutic problem (Rust and Dryden 1997). Only a small part of the total flea population resides on the host animal. In much greater abundance are off-host life cycle stages such as eggs, larvae, pupae and newly emerging adults found in locations such as carpets, furniture and bedding. Flea-control therefore depends on the overall impact of veterinary and other interventions on the dynamics of this ecological system. Modern veterinary pulicides can influence this process in a number of ways depending upon their particular biological characteristics, the nature and spectrum of which vary between products. Such attributes can include their short-term effect on adult fleas (knockdown), longer-term residual activity, speed of kill,

TABLE 1: Laboratory studies: percentage reduction in flea-counts comparing spinosad-treated dogs with placebo-treated controls 48 hours after each infestation

Study	Formulation	Actual dose given	% Reduction in flea-count measured on day				
		mg/kg	1	9	16	23	30
1	Powder	45	-	-	-	99.8	97.8
2	Tablet	45.9-54.0	-	99.9	100	99.4	96.5
3	Tablet	48.2-53.0	100	100	100	99.1	96.5

TABLE 2: Field trial data: percentage reduction in flea-counts of spinosad and selamectin-treated dogs (compared with pretreatment values on day 0) and the proportion of flea-free dogs at each observation day

	Treatment*	Total number of dogs	Number of fleas on day 0†	% Reduction in flea-counts on day				% Dogs with zero fleas on day			
				14	30	60	90	14	30	60	90
Study 4‡	Spinosad	93	36.7 (11-560)	97.5	97.2	-	-	59.1	54.5	-	-
	Selamectin	93	29.7 (10-229)	90.7	89.4	-	-	33.7	34.1	-	-
	P values§			0.001	0.003	-	-	0.001	0.006	-	-
Study 5#	Spinosad	43	40.7 (10-437)	97.3	97.4	99.6	99.6	39.5	50.0	77.5	85.0
	Selamectin	71	33.5 (10-394)	88.5	91.0	97.8	98.2	28.6	31.4	62.9	67.1
	P values§			<0.001	0.005	0.01	0.035	NS	NS	NS	0.042

* Spinosad 45 to 70 mg/kg; selamectin 6 to 11.8 mg/kg
† Geometric mean and range
‡ Treated day 0
# Treated days 0, 30, 60
§ Comparing spinosad and selamectin groups
NS Not significant (P>0.05)

Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on February 3, 2014 - Published by group.bmj.com

anti-feeding potential, repellency and larvicidal effects (Carlotti and Jacobs 2000). Furthermore, these properties can be modified by factors such as formulation, dose and method of application. Consequently, field studies play a particularly important role in evaluating prospective flea-control agents as they come closest to encompassing the full scope of these ecological and therapeutic complexities.

Effective flea-control is a three-stage process (Carlotti and Jacobs 2000). First, the removal of fleas from an already infested host provides relief from discomfort and aids the resolution of skin lesions due to self-trauma or allergy. Secondly, the animal must be protected from re-infestation since the household environment is likely to be contaminated and therefore a continuing source of hungry host-seeking fleas. Thirdly, the reservoir of off-host life cycle stages must be eliminated as this is the only way a long-term solution can be provided. Traditionally, this was achieved by the direct application of chemicals onto flea development 'hotspots' around the home (Rust and Dryden 1997). More recently, however, this approach has been largely superseded by long-acting animal treatments that halt the deposition of viable flea-eggs. With no new eggs entering the system, the domestic reservoir of developing fleas becomes progressively depleted and is eventually driven towards extinction (Dryden 2009).

Under most household conditions, fleas originating from eggs deposited before the start of a control programme will have completed their development and emerged from their cocoons within three to five weeks, but this process can in some cases be delayed by up to 174 days (Dryden and Rust 1994) and may influence the results of clinical trials. Nevertheless, in the current field investigation, a 99.6 per cent reduction in flea burdens on dogs was observed in spinosad households 60 days from the start of the monthly dosing programme and the 'zero-flea' data suggested that fleas had been eliminated from up to 85 per cent of these homes by day 90 (Table 2). This compared favourably with the selamectin controls in which a 97.8 per cent reduction in flea-count was recorded at day 60 and a 'zero-flea' value of 67 per cent at day 90.

These investigations were conducted over the summer season in a variety of climatic regions including warm, humid areas favouring flea reproduction. Thus, these results were obtained at a time when flea populations would normally be increasing in magnitude. Indeed, the day 14 zero-flea figures indicate the presence of heavy challenge in many of the households in the early part of the two studies (Table 2) with evidence of re-infestation taking place on 41 and 60 per cent of spinsosad dogs, respectively, and on 66 and 71 per cent of the selamectin groups. Nevertheless, the overall number of fleas on the animals at day 14 had been reduced by 97 per cent in the case of spinosad and by about 90 per cent for selamectin indicating a high level of protection in the face of continuing re-infestation. Similar results have been reported from a comparable trial encompassing 14 sites in the USA and two in Canada (Robertson-Plouch and others 2008).

The high-performance level of spinosad under challenging clinical situations in both European and North American field trials can be ascribed to the summation of its inherent pulicidal attributes, including 'knockdown', duration of activity, speed of kill and the resultant impact of these on flea-egg output. At dose rates of 30 mg/kg or more, the 'knockdown' effect of spinosad against a previously established flea population is virtually 100 per cent (Snyder and others 2007, Blagburn and others 2010). Thereafter, a high level of residual protection against re-infestation is maintained for a month (Snyder and others 2007). In this study, where dose rates in individual dogs ranged from 45 to 54 mg/kg, values higher than 99 per cent were recorded up to day 23 and of 96.5 per cent at day 30 (Table 1). The speed at which spinosad kills fleas was investigated by Blagburn and others (2010) using a dose rate of 30 to 60 mg/kg. Mortality was evident as early as 30 minutes after treatment with a significant reduction (64.2 per cent, $P<0.05$) at one hour. By two hours, efficacy had increased to 85.8 per cent and had reached 100 per cent by four hours. This is of significance in control programmes as newly acquired fleas must be killed before they start to lay eggs, if recontamination of the household environment is to be avoided. To measure the effect of spinosad-treatment on flea-egg production, Blagburn and others (2010) collected eggs dropping from treated dogs and untreated controls that had been infested with fleas at intervals over a one-month period. They estimated that treatment had reduced the number of eggs falling to the ground by at least 99.8 per cent. Extrapolating this result to a domestic setting, monthly spinosad treatments would therefore be expected to make a major contribution towards the long-term objective of eliminating the environmental reservoir of off-host life cycle stages. Complementary interventions such as household vacuum cleaning, particularly of potential hotspots, are of course invaluable adjuncts for accelerating progress towards this goal.

The fast onset of flea mortality following oral dosing observed by Blagburn and others (2010) can be explained by rapid absorption of spinosyns A and D from the canine gastrointestinal tract, with maximum plasma concentrations occurring about two to four hours after treatment (Anon 2007). The systemic activity of spinosad has other potentially beneficial consequences. For example, newly acquired fleas start to feed within minutes of jumping onto their host (Dryden and Gaafar 1991, Cadiergues and others 2000) and may thereby assimilate a lethal dose of a systemic pulicide more quickly than by absorption of a topical contact insecticide through the cuticle (McCoy and others 2008). Furthermore, as spinosad is not known to be present in sebum, shed hair or skin flakes (Blagburn and others 2010), direct transfer from treated animals onto animal handlers or into the household environment is unlikely.

In conclusion, the rapid absorption and fast speed of kill of spinosad ensure that infested dogs respond quickly to treatment and that fleas acquired subsequently are killed before they start to lay eggs, thereby breaking the flea life cycle in contaminated households. A monthly dosing programme using client-owned dogs, many of which would have been kept under conditions of heavy natural challenge, reduced parasite burdens on dogs by 97 per cent during the first month and drove the flea population close to extinction in the majority of homes within 60 days. In comparative field studies, efficacy values for spinosad were higher than those obtained for the reference product, selamectin. Thus, laboratory and field trials have confirmed that spinosad chewable tablets administered to dogs at a dose rate of 45 to 70 mg/kg are highly effective for the treatment and control of flea infestations.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to all personnel involved in the independent laboratory studies and to the dog owners and staff of veterinary clinics taking part in the field investigations. J. Stoker, A. K. Nissen and other members of the Elanco team are thanked for their participation, as is Dr Dan Snyder for his constant support and encouragement.

References

ANON (2007) Freedom of Information Summary. NADA. September 25 2007. pp 141-277

BLAGBURN, B. L., YOUNG, D. R., MORAN, C., MEYER, J. A., LEIGH-HEFFRON, A., PAARLBERG, T., ZIMMERMANN, A. G., MOWREY, D., WISEMAN, S. & SNYDER, D. E. (2010) Effects of orally administered spinosad (Comfortis) in dogs on adult and immature stages of the cat flea (Ctenocephalides felis). *Veterinary Parasitology* **168,** 312-317

CADIERGUES, M. C., HOURCQ, P., CANTALOUBE, B. & FRANC, M. (2000) First bloodmeal of Ctenocephalides felis felis (Siphonaptera: Pulicidae) on cats: time to initiation and duration of feeding. *Journal of Medical Entomology* **37,** 634-636

CARLOTTI, D. N. & JACOBS, D. E. (2000) Review: therapy, control and prevention of flea allergy dermatitis in dogs and cats. *Veterinary Dermatology* **11,** 83-98

DRYDEN, M. W. & GAAFAR, S. M. (1991) Blood consumption by the cat flea, Ctenocephalides felis (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Medical Entomology* **28,** 394-400

DRYDEN, M. W. (2009) Flea and tick control in the 21st century: challenges and opportunities. *Veterinary Dermatology* **20,** 435-440

DRYDEN, M. W. & RUST, M. K. (1994) The cat flea: biology, ecology and control. *Veterinary Parasitology* **52,** 1-19

EMEA/CVMP (2000) VICH GL9: guideline on good clinical practices *EMEA/CVMP/VICH/595/98* July 2000

EMEA/CVMP (2007) Testing and evaluation of the efficacy of antiparasitic substances for the treatment and prevention of tick and flea infestations in dogs and cats. *EMEA/CVMP/005/00 Rev 2* November 2007

FARKAS, R., GYURKOVSZKY, M., SOLYMOSI, N. & BEUGNET, F. (2009) Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness. *Medical and Veterinary Entomology* **23,** 187-194

MARCHIONDO, A. A., HOLDSWORTH, P. A., GREEN, P., BLAGBURN, B. L. & JACOBS, D. E. (2007) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestation on dogs and cats. *Veterinary Parasitology* **145,** 332-344

MCCOY, C., BROCE, A. B. & DRYDEN, M. W. (2008) Flea blood feeding patterns in cats treated with oral nitenpyram and the topical insecticides imidacloprid, fipronil and selamectin. *Veterinary Parasitology* **156,** 293-301

Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on February 3, 2014 - Published by group.bmj.com

ROLAIN, J. M., FRANC, M., DAVOUST, B. & RAOULT, D. (2003) Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. *Emerging Infectious Diseases* **9,** 338-342

ROBERTSON-PLOUCH, C., BAKER, K. A., HOZAK, R. R., ZIMMERMANN, A. G., PARKS, S. C., HERR, C., HART, L. M., JAY, J., HUTCHENS, D. E. & SNYDER, D. E. (2008) Clinical field study of the safety and efficacy of spinosad chewable tablets for controlling fleas on dogs. *Veterinary Therapeutics* **9,** 26-36

RUST, M. K. (2005) Advances in the control of Ctenocephalides felis (cat flea) on cats and dogs. *Trends in Parasitology* **21,** 232-236

RUST, M. K. & DRYDEN, M. W. (1997) The biology, ecology, and management of the cat flea. *Annual Review of Entomology* **42,** 451-473

SARASOLA, P., JERNIGAN, A. D., WALKER, D. K., CASTLEDINE, J., SMITH, D. G. & ROWAN, T. G. (2002) Pharmacokinetics of selamectin following intravenous, oral and topical administration in cats and dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **25,** 265-272

SHAW, S. E., KENNY, M. J., TASKER, S. & BIRTLES, R. J. (2004) Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom. *Veterinary Microbiology* **102,** 183-188

SNYDER, D. E., MEYER, J., ZIMMERMANN, A. G., QIAO, M., GISSENDANNER, S. J., CRUTHERS, L. R., SLONE, R. L. & YOUNG, D. R. (2007) Preliminary studies on the effectiveness of the novel pulicide, spinosad, for the treatment and control of fleas on dogs. *Veterinary Parasitology* **150,** 345-351

SPARKS, T. C., CROUSE, G. D. & DURST, G. (2001) Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids. *Pesticide Management Science* **57,** 896-905

2.2. Détermination de l'efficacité d'un IGR dans le contrôle de l'évolution des œufs de puces chez le chien

Nous avons étudié l'efficacité d'un produit associant deux insecticides (perméthrine et dinotéfuran) et un IGR (pyriproxifène) sur les puces, leur prolificité, et le devenir des œufs pondus. Généralement les premiers œufs de puces sont pondus dans les 24 à 48 heures après l'initiation du repas sanguin, ce qui rend l'étude d'un IGR difficile, car les puces sont tuées avant de pouvoir pondre. Ainsi, nous avons mis en place un protocole original dans lequel des chiens ont été infestés par des puces gravides. Pour cela, les puces utilisées se sont gorgées pendant 72 heures sur des chats avant d'être transférées pour l'infestation des chiens. Les chiens ont été hébergés dans des boxes individuels et disposaient de caillebotis pour se coucher. Des plateaux en inox ont été placés sous chaque caillebotis pour récolter les œufs tombant du pelage. Les animaux ont été infestés une fois par semaine pendant dix semaines avec 100 puces gravides. Après chaque infestation, les œufs ont été récoltés à 24 heures et les chiens ont été peignés à 48 heures. Les 100 premiers œufs comptés ont été placés sur un milieu nutritif et à l'étuve pendant 4 semaines pour l'étude de l'émergence en adultes. Les autres œufs collectés ont été mis à évoluer pendant sept jours dans les mêmes conditions pour étudier leur évolution en larves. L'application du pyriproxifène combiné à la perméthrine et au dinotéfuran a eu un effet inhibiteur sur la ponte de plus de 92 % pendant un mois, de plus de 99 % sur l'évolution en larves ou en adultes pendant dix semaines. L'effet adulticide a persisté au-delà de 99 % pendant neuf semaines. Ce protocole original pourrait être adapté à l'étude de nombreux IGR.

Ce travail fait l'objet de l'**Article VII** publié dans ***Veterinary Parasitology*** en 2012 et intitulé : **"Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from cats to dogs".**

Veterinary Parasitology 190 (2012) 541–546

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from cats to dogs

E. Bouhsira [a], E. Lienard [a], P. Jacquiet [a], S. Warin [b], V. Kaltsatos [b], L. Baduel [b], M. Franc [a,*]

[a] *Université de Toulouse, INP, ENVT, F-3107 Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 chemin des capelles, 31079 Toulouse, France*
[b] *Ceva, Santé Animale Libourne, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 December 2011
Received in revised form 2 July 2012
Accepted 10 July 2012

Keywords:
Ectoparasites
Ctenocephalides felis felis
Flea control
Permethrin
Dinotefuran
Pyriproxyfen
Ovicidal efficacy
Adult flea emergence inhibition
Clinical trial

ABSTRACT

A novel spot-on formulation combining permethrin, pyriproxifen and dinotefuran (Vectra 3D™ spot-on solution for dogs) was evaluated in adult Beagle dogs in a study to determine adulticidal efficacy, egg laying inhibition and viability of *Ctenocephalides felis felis* eggs (development and emergence of fleas from the collected eggs). Prior to treatment sixteen dogs were checked for their ability to keep fleas 24 hours after infestation and were allocated to treatment groups: 8 dogs served as untreated controls, and 8 dogs were treated once with the tested formulation. The spot on was administered respecting the laboratory recommendations at a dosage of 65–126 mg/kg of permethrin; 8.9–17.4 mg/kg of dinotefuran and 0.8–1.5 mg/kg of pyriproxyfen. Each dog was infested with 100 adult cat fleas ready to lay eggs after 72 hours spent feeding on cats. Dogs were infested 24 hours after treatment and then weekly during 63 days. Eggs were collected and counted 24 hours after each infestation and dogs were combed 48 hours after each infestation. Fleas were counted and removed. Collected eggs were placed in incubator to study their development in larvae and into newly emerged adults. A single treatment provided 99.7% adulticidal efficacy on fleas within 48 hours after treatment and controlled re-infestations for up to 30 days (efficacy >96.20%, $p < 0.05$). The egg laying inhibition was over 92.3% for up to 29 days ($p < 0.05$). The adult emergence inhibition remained 100% during 8 weeks after treatment and was 99.8% nine weeks after treatment ($p < 0.001$).

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The cat flea *Ctenocephalides felis felis*, is the predominant flea species found on dogs and cats worldwide (Franc et al., 1998; Alcaino et al., 2002; Gracia et al., 2007). Fleas can cause severe disturbances for pets such as itching which, when severe, can lead to skin lesions, hair losses and for susceptible animals flea allergy dermatitis. Fleas can also be vectors of several pathogens for cats such as *Mycoplasma spp.*, *Bartonella henselae*, *Rickettsia felis* (Rolain et al., 2003; Barrs et al., 2010; Hornok et al., 2010; Tsai et al., 2011) and also the tapeworm *Dipylidium caninum* present in both cats and dogs (Guzman, 1984).

Integrated approaches provide the best direct control of flea infestations on domestic animals as both adult fleas on pets and immature stages in the environment are targeted (Jacobs et al., 2001; Rust, 2005; Beck et al., 2006). Most topically applied flea control products that offer integrated control combine an adulticide with an insect growth regulator (IGR) (Young et al., 2004). IGRs affect development

* Corresponding author. Tel.: +33 561193873; fax: +33 561193971.
E-mail address: m.franc@envt.fr (M. Franc).

0304-4017/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.014

of eggs while they are still inside the adult fleas or by direct contact of eggs with hairs of treated pets. Once fallen off the treated animal into its environment, eggs will not hatch or larvae will die (Olsen, 1985; Beck and Pfister, 2004). These combinations rarely allow to assess the efficacy of IGRs alone because the adulticide eliminates fleas before any eggs are produced throughout the first weeks post treatment. Although relocation of mature fleas from one host to another is possible (Franc and Cadiergues, 1997), this transfer is rare in natural settings. To evaluate the ovicidal activity of an adulticide–IGR combination, the study design proposed by Franc et al. (2007) was adapted to obtain ready-to-lay eggs fleas from cats and transferred to dogs.

The formulation evaluated was a combination of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen (Vectra 3D™). Dinotefuran is a third-generation rapid-acting nitroguanidine neonicotinoid insecticide exerting its action on acetylcholine receptor presents in the insect nerve synapse. Neonicotinoids are selective for insect acetylcholine receptors and have little affinity for mammalian ones. Wakita et al. (2005) showed that dinotefuran had low affinity against binding sites of other neonicotinoids suggesting a different site of action for dinotefuran. Permethrin, the first photostable synthetic pyrethroid, acts on the nervous system of insects. It interferes with sodium channels to disrupt the function of neurons, and causes paralysis and death (Tomlin, 2006). Pyriproxyfen mimics specifically the insect juvenile hormone. It prevents flea eggs from hatching/molting when applied on a newly laid egg and prevents hatching of larvae of the 3rd stage into pupae (Meola et al., 1996; Miller et al., 1999).

This study design assessed the role of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen treatment on flea eggs development into larvae and newly emerged adults. The adulticidal effect was simultaneously evaluated.

2. Materials and methods

The trial was performed according to Good Clinical Practice (EEC III/3767/92 European Guideline (amended by the Directive 2004/28/CE)), VICH GL9 guideline relative to Good Clinical Practices. Animals were handled in compliance with the relevant Institutional Animal Care and with the Regional Ethic Committee for animal experimentation.

2.1. Animals

Sixteen healthy Beagle dogs (>5 years old) and 24 short-haired cats (>5 years old) were included in this trial. Cats were selected to be used only as flea-donors providing engorged and gravid fleas which had the opportunity to feed on them for 72 hours.

Animals used in this study had not been exposed to ectoparasiticides within at least 3 months prior to treatment and were in good health throughout the study.

Cats were housed in an indoor cattery where air was exchanged 14 times per hour and the lighting was 12 hours day/12 hours night. They received water and a dry cat food ad libitum.

Dogs were housed individually in kennels with natural environmental lighting. They all had at their disposal an individual flea egg collecting pan used for sleeping. Dogs were fed a commercial dry dog food ration calculated to maintain the animal in a healthy physical state. Water was available ad libitum through automatic lickers present in each kennel. No concurrent medication was given during the study. All animals were identified with the last four numbers of their digital microchip.

2.2. Experimental design and methods

The 24 cats and the 16 dogs were acclimated to study conditions for 15 days prior to treatment and were observed daily for general health conditions. On day-7, each of the 16 dogs was infested with 100 *C. f. felis* harvested from cats that had fed on them for the previous 72 hours. On day-6 eggs were collected from each dog individual pan and were counted. On the same day, flea comb counts were conducted to confirm that all dogs had the same sensitivity to fleas before treatment. Each dog was combed for at least 10 minutes by two technicians using a fine-toothed flea comb (12 teeth/cm). Each animal's entire coat was combed thoroughly, and combing was stopped only after no flea was found during the last minute of combing. If fleas were found, combing continued until no flea was found during 1 minute time frame. On day-5, eight replicates of two dogs each were formed based on descending pre-treatment flea counts. Within replicates, dogs were randomly allocated to control or treated group. For allocation dogs were combed 24 hours after infestation.

2.2.1. Source of fleas

The *C. felis* strain used in this study was the laboratory strain that has been maintained at the Parasitology Department of Toulouse Veterinary School. This colony originated from a wild strain harvested from a cat in the Toulouse area and has been maintained on cats under laboratory conditions since 1990. The strain has not been pressured with any insecticides since then.

2.2.2. Experimental procedure

24 cats were infested with approximately 150–200 unfed fleas (50% male and 50% female fleas aged between 5 and 10 days) and 72 hours after infestation fleas were carefully combed off the donor cats, assessed for mobility and viability and then pooled together. Healthy-appearing fleas with normal mobility were collected from the pool by aspiration and aliquoted in lots of 100 fleas (approximately 50% male and 50% female). Then each aliquot of 100 fleas was transferred to dogs on days −7, 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 and 63. D0 was treatment day.

Dogs (8 females) in the control group remained untreated. Dogs in the treated group (1 castrated male and 7 females) received the permethrin, pyriproxyfen and dinotefuran combination (Vectra 3D™ spot-on solution for dogs, CEVA Animal Health, Rutherford, NJ). The pipettes contained: permethrin 36.08% (w/w) or 396.5 mg/ml (w/v), dinotefuran 4.95% (w/w) or 54.39 mg/ml (w/v), pyriproxyfen 0.44% (w/w) or 4.83 mg/ml (w/v) (final formulation density = 1.1). Two pipette presentations were used: 1.6 ml

and 3.6 ml. To follow laboratory recommendations, the 1.6 ml spot-on was applied directly to the skin in one point between the shoulder blades to dogs weighing between 4.1 to 10.0 kg and the 3.6 ml spot-on was applied directly to the skin in three points on the dorsal midline to dogs weighing between 10.1 and 25.0 kg. Treated dogs weighed between 7.58 and 11.29 kg. They were treated at a dosage of 65–126 mg/kg of permethrin; 8.9–17.4 mg/kg of dinotefuran and 0.8–1.5 mg/kg of pyriproxyfen.

Live fleas were removed and counted on days 3, 9, 16, 23, 30, 37, 44, 51, 58 and 65 (48 ± 3 hours after each infestation). Personnel conducting comb counts and caring for the animals were blinded to treatment group allocations. To prevent cross-contamination between treatment groups, separate flea combs and lab coats were used for each treatment group and were labelled as such. Gloves were changed systematically between each dog.

To study the post-treatment ovicidal effect of the tested combination flea eggs layed within 24 hours after fleas were placed on dogs were collected from each individual collected pan on days: 2, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57 and 64 and counted the same day. As eggs were collected 24 hours after each infestation time point, hatching into larvae did not have time to occur. After eggs counts were recorded, the first 100 flea eggs collected from each dog were placed in individual vials containing nutritive medium and placed to incubate for 4 weeks at 27 °C and 75–80% of humidity to assess adult emergence. The remaining eggs (when the collected number was above 100) were placed in a second vial containing nutritive medium and left to incubate in the same conditions as above for 7 days. Each vial was identified with the date, the study number and the dog ID. After 7 days incubation new hatched larvae were counted.

2.3. Data analysis

2.3.1. Adulticidal efficacy

Counts of live adult fleas after each combing was used to calculate the arithmetic mean of both treated and control groups. Percent reduction from the control mean was calculated for the treated group at every post-treatment time point using the formula:

$$\%\ \text{Efficacy} = \frac{\text{arithmetic mean control} - \text{arithmetic mean treated}}{\text{arithmetic mean control}} \times 100$$

2.3.2. Egg laying inhibition

At each egg collection time, counts of flea egg collected were used for the calculation of arithmetic means of egg layed for both treatment groups. Percent reduction from the control mean was calculated using the formula:

$$\%\text{Egg laying inhibition} = \frac{\text{arithmetic mean control} - \text{arithmetic mean treated}}{\text{arithmetic mean control}} \times 100$$

2.3.3. Egg hatching inhibition

The mean number of larvae obtained after 7 days of incubation of eggs (possible when the number of collected eggs was above 100) was calculated for the both groups and used for the calculation of the eggs hatching inhibition as given by the formula:

$$\%\text{Eggs hatching inhibition} = \frac{\text{arithmetic mean control} - \text{arithmetic mean treated}}{\text{arithmetic mean control}} \times 100$$

2.3.4. Adults emergence inhibition

The mean number of adults obtained after 4 weeks of incubation of eggs was calculated for the both groups and used for the calculation of the adult emergence inhibition as given by the formula:

$$\%\text{Adult emergence inhibition} = \frac{\text{arithmetic mean control} - \text{arithmetic mean treated}}{\text{arithmetic mean control}} \times 100$$

For each calculation, the treated group was compared to the control group using non parametric test of Kruskal–Wallis. All testings were two-sided at the significance level $\alpha = 0.05$. Analyses were performed using Systat 9 software.

3. Results

No adverse effects were observed in any dogs or cats during the trial and Vectra 3D™ spot-on solution was well tolerated by the 8 treated dogs. Four variables were assessed during the study: adulticidal efficacy; production of flea eggs, eggs hatching ability into larvae and development and emergence of fleas from the collected eggs.

Adulticidal activity (Table 1, Fig. 1): All dogs included in the study demonstrated adequate pre-treatment sensitivity to fleas with flea counts ranging from 71 to 92. All untreated animals maintained good flea retention capacity throughout the study. Post-treatment arithmetic mean flea counts for untreated control dogs ranged from 65.8 to 83.3 flea counts for the treated dogs were significantly

Table 1
Flea counts 48 hours after infestation.

Study day	Control group	Treated group	Efficacy (%)
Day −6	81.3 (6.1)	81.3 (6.5)	–
Day 3	77.5 (11.9)	0.3 (0.5)	99.7
Day 9	75.0 (14.4)	0 (0)	100
Day 16	72.3 (12.9)	0 (0)	100
Day 23	74.5 (15.8)	0.3 (0.7)	99.7
Day 30	65.8 (8.0)	2.5 (3.5)	96.2
Day 37	79.1 (9.1)	5.4 (8.9)	93.2
Day 44	83.3 (8.9)	10.1 (17.1)	87.8
Day 51	68.8 (11.9)	23.5 (25.2)	65.8
Day 58	75.8 (9.0)	31.1 (27.8)	58.9
Day 65	80.4 (8.6)	36.5 (27.0)	54.6

Arithmetic mean (SD).
Day 0 = treatment day.

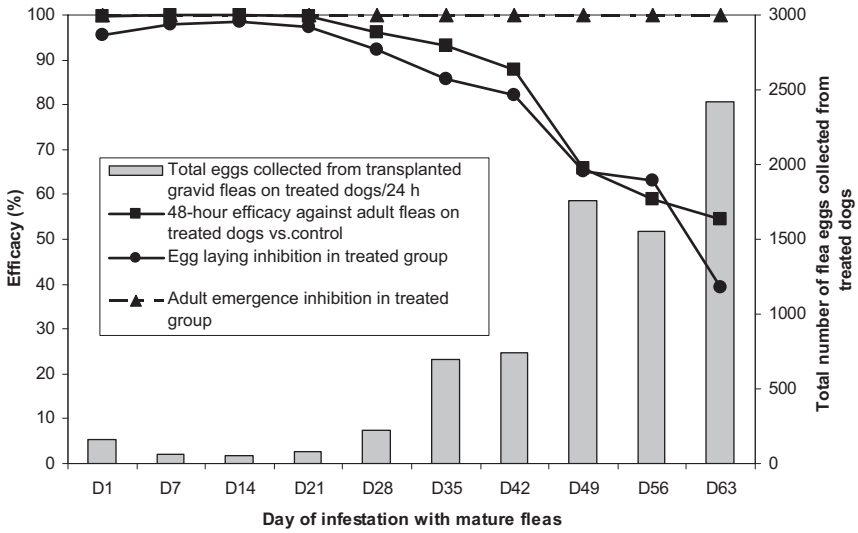


Fig. 1. Vectra 3D™ IGR activity, 48-hour adulticidal efficacy, and total eggs produced following each infestation. Treated dogs received a single dose of the combination product on day 0.

lower than those for untreated control dogs at all post-treatment evaluations ($p < 0.05$) (mean number of collected fleas between 0 and 0.3 until day 23; 2.5 on day 30 and then mean flea number increased steadily until the end of the trial). Vectra 3D™ spot-on solution for dogs controlled the existing flea infestation providing 99.68% efficacy within 48 hours after application. The treatment prevented dogs from new flea infestations respectively with 100% efficacy on day 9 and day 16, 99.7% on day 23 and 96.2% on day 30. Then the efficacy decreased steadily.

Egg laying inhibition (Table 2, Fig. 1): Before treatment the mean number of collected eggs per dog was 518.4 for the control group and 504.8 for the treated group (Table 2). The mean number of collected eggs remained statistically different ($p < 0.05$) between both groups until 57 days post-treatment. The combination provided an egg laying inhibition with an efficacy over 92.3% during 4 weeks, over 80% weeks 5 and 6, and over 60% weeks 7 and 8 post-treatment.

Egg hatching inhibition: The study of eggs hatching could only start on day 36. Indeed before that point the number of eggs collected per dog was 100 or below 100 and used for the adult emergence inhibition test. In the control group the mean percentage of hatching was between 59.6% and 23.8%. In the treated group the larvae hatching was between 0 and 0.54%. So the inhibition of hatching provided by spot-on solution was between 99.1% and 100% (data not shown).

Adult emergence inhibition (Table 2, Fig. 1): The inhibition of adult emergence was 100% during 8 weeks after the treatment. On day 67 the inhibition was 99.8%.

4. Discussion

The originality of this work was based on the use of ready-to-lay-eggs fleas previously fed for 72 hours on cats. This study was adapted from the study design of Franc et al. (2007) that allowed for egg producing female fleas to be placed onto treated dogs to assess the efficacy of Vectra 3D™ spot-on solution for dogs on egg viability (hatching into larvae, emergence into new viable adult). The model was successful in that 359–630 eggs were collected from

Table 2
Flea egg counts 24 hours after each flea infestation and percentage of adult emergence after 4 weeks incubation.

Study day	Control		Treated	
	Egg countsArith. mean (SD)	Adult emergence (%)	Egg countsArith. mean (SD)	Adult emergence (%)
Day −6	518.4 (200.2)	27.9	504.8 (151.7)	26.6
Day 2	451.5 (116.2)	51.6	19.9 (22.9)	0
Day 8	408.3 (240.9)	36.6	8.0 (7.7)	0
Day 15	463.1 (162.5)	34.9	6.8 (6.0)	0
Day 22	359.3 (151.2)	24.8	9.6 (11.7)	0
Day 29	368.9 (116.7)	44.9	28.4 (31.9)	0
Day 36	606.4 (190.9)	46.9	87.1 (118.2)	0
Day 43	519.9 (161.4)	58.5	92.4 (111.9)	0
Day 50	630.8 (141.3)	43.9	219.6 (225.1)	0
Day 57	524.5 (225.4)	38.4	194.1 (140.7)	0
Day 64	499.6 (154.2)	56.3	302.9 (231.7)	0.1

Day 0 = treatment day.
Arith. mean = arithmetic mean.

each control dog in the weekly 24 hour collection periods (after an infestation with 100 fleas). In this trial an important decrease of egg production was observed in treated dogs even if fleas were already producing eggs before being transplanted to dogs (Fig. 1). This can be explained by the rapid mortality of fleas due to a direct action of dinotefuran associated with permethrin. This is the first study on egg viability with this formulation. The mean number of newly emerged adult fleas after 28 days incubation of 100 collected eggs was between 24.8 and 58.5 in the control group (Table 2). The inhibition of hatching provided by Vectra 3D™ spot-on solution for dogs was between 99.1% and 100% during the 8 weeks post treatment. These results are similar with those obtained by Young et al. (2004) with a combination of fipronil and another insect juvenile hormone, the (S)-methoprene. They obtained an egg hatching reduction of 89.1% and an inhibition of new adult emergence of 93.1% 64 days post-treatment.

The adulticidal efficacy of Vectra 3D™ evaluated 48 hours after each infestation ranged from 96.2 to 100% within the 30 first days post-treatment then the efficacy decreased progressively: 93.2% (day 37), 87.8% (day 44), 65.8% (day 51), 58.9% (day 58) and 54.6% (day 65). It appears there was animal to animal variations after the claimed efficacy period of the Vectra 3D™. Until day 30 post-treatment the variation around mean of alive fleas combed on dogs was under 3.5, in adequation with results observed in other efficacy trials. From day 30 until the end of the study S.D. increase because the adulticidal efficacy of Vectra 3D decreases and fleas are more and more found alive on treated dogs. The variation of efficacy between treated dogs can be explained by the ability of hairs retention of the product which is correlated to a variable sebum production from one animal to an other. The variation around mean of collected eggs can be correlated to the behaviour of dogs in their kennel and the time each dog spends on its collecting pan per 24 hours, as it was used for sleeping. The amount of eggs collected was more important for dogs spending more time sleeping on their pan. For one single dog the resting behaviour was variable from one week to the other.

Dinotefuran was discovered in 1993 (Wakita et al., 2005) but there are few trials studying its efficacy toward adult fleas. The first published study evaluating the 24 hour-efficacy on adult fleas of action of dinotefuran (Vectra for cats and kittens) was performed on cats by Murphy et al. (2009). The adulticidal efficacy was between 98.5 and 100% until day 30. Dryden et al. (2011) evaluated on dogs the efficacy of Vectra 3D™ 6 hours after flea infestations. The efficacy ranged between 92.3% and 100% during the 28 days of that study. The results of these previously published studies are similar with those obtained in this study.

The association of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen effectively broke the life cycle of fleas, including larvae and adults.

5. Conclusion

This clinical trial was the first reported trial using gravid and ready to lay egg producing fleas obtained from cats and transferred to dogs. This original study design permitted the evaluation of the ovicidal efficacy of the tested combination.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

We thank Sonia Gounaud, Martine Roques and Solange Vermot for their assistance during the in-life phase. This study was funded by a grant from Ceva, Santé Animale.

References

Alcaino, H.A., Gorman, T.R., Alcaino, R., 2002. Flea species from dogs in three cities of Chile. Vet. Parasitol. 105, 261–265.

Barrs, V.R., Beatty, J.A., Wilson, B.J., Evans, N., Gowan, R., Baral, R.M., Lingard, A.E., Perkovic, G., Hawley, J.R., Lappin, M.R., 2010. Prevalence of *Bartonella* species *Rickettsia felis*, *Haemoplasmas* and the *Ehrlichia* group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. Aust. Vet. J. 88, 160–165.

Beck, W., Pfister, K., 2004. Recent investigations on the population dynamics of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and the concept of an integrated control. Prak. Tier. 85, 555–563.

Beck, W., Boch, K., Mackensen, H., Wiegand, B., Pfister, K., 2006. Qualitative and quantitative observations on the flea population dynamics of dogs and cats in several areas of Germany. Vet. Parasitol. 137, 130–136.

Dryden, M.W., Payne, P.A., Vicki, S., Kobuszewski, D., 2011. Efficacy of topically applied dinotefuran formulations and orally administered spinosad tablets against the KS1 flea strain infesting dogs. Int. J. Appl. Res. Vet. Med. 9, 124–129.

Franc, M., Cadiergues, M.C., 1997. Mode of contamination of dogs by adult fleas (*Ctenocephalides felis*) in different controlled environments. Rev. Med. Vet. 148, 23–26.

Franc, M., Choquart, P., Cadiergues, M.C., 1998. Répartition des espèces de puces rencontrées chez le chien en France. Rev. Med. Vet. 149, 135–140.

Franc, M., Beugnet, F., Vermot, S., 2007. Efficacy of fipronil-(S)-methoprene on fleas flea egg collection, and flea egg development following transplantation of gravid fleas onto treated cats. Vet. Ther. 8, 285–292.

Gracia, M.J., Calvete, C., Estrada, R., Castillo, J.A., Peribanez, M.A., Lucientes, J., 2007. Fleas parasitizing domestic dogs in Spain. Vet. Parasitol. 151, 312–319.

Guzman, R.F., 1984. A survey of cats and dogs for fleas; with particular reference to their role as intermediate hosts of *Dipylidium caninum*. N. Z. Vet. J. 32, 71–73.

Hornok, S., Meli, M.L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2010. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. Vet. Microbiol. 140, 98–104.

Jacobs, D.E., Hutchinson, M.J., Ryan, W.G., 2001. Control of flea populations in a simulated home environment model using lufenuron imidacloprid or fipronil. Med. Vet. Entomol. 15, 73–77.

Meola, R., Pullen, S., Meola, S., 1996. Toxicity and histopathology of the growth regulator pyriproxyfen to adults and eggs of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). J. Med. Entomol. 33, 670–679.

Miller, R.J., Broce, A.B., Dryden, M.W., Throne, J.E., 1999. Emergence, survival, and fecundity of adult cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) exposed as pupae to juvenile hormone mimics. J. Med. Entomol. 36, 776–779.

Murphy, M., Ball, C.A., Gross, S., 2009. Comparative in vivo adulticidal activity of a topical dinotefuran versus imidacloprid-based formulation against cat fleas (*Ctenocephalides felis*) on cats. Vet. Ther. 10, 9–16.

Olsen, A., 1985. Ovicidal effect on the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) of treating fur of cats and dogs with methoprene. Int. Pest. Control 2, 10–16.

Rolain, J.M., Franc, M., Davoust, B., Raoult, D., 2003. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia*

felis, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France. Emerg. Infect. Dis. 9, 338–342.
Rust, M.K., 2005. Advances in the Control of *Ctenocephalides felis* (cat flea) on Cats and Dogs.
Tomlin, C.D.S., 2006. The Pesticide Manual: A World Compendium, 14th ed. British Crop Protection Council, Alton, England, 1349 pp.
Tsai, Y.L., Chang, C.C., Chuang, S.T., Chomel, B.B., 2011. Bartonella species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host? Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 34, 299–314.
Young, D.R., Jeannin, P.C., Boeckh, A., 2004. Efficacy of fipronil/(s) – methoprene combination spot-on for dogs against shed eggs, emerging and existing adult cat fleas (*Ctenocephalides felis* Bouche). Vet. Parasitol. 125, 397–407.
Wakita, T., Yasui, N., Yamada, E., Kishi, D., 2005. Development of a novel insecticide, dinotefuran. J. Pestic. Sci. 30, 122–123.

3. Prévention de la transmission de *Bartonella* spp. par un traitement insecticide : proposition d'un protocole.

Aucun vaccin n'est à ce jour disponible contre *B. henselae*. Les études de transmission ont montré le rôle central des puces chez le chat (Chomel et al., 1996). Ainsi un contrôle antiparasitaire régulier permet de réduire le nombre de puces capables de transmettre les bactéries entre chats, et par conséquent de réduire le nombre de réservoirs félins à partir desquels se fait la contamination humaine. À ce jour, seulement deux études (Bradburry et al., 2010 ; Lappin et al., 2013) rapportent l'efficacité de formulations dans la prévention de la transmission de *B. henselae*.

L'application mensuelle d'un *spot-on* d'imidaclopride et de moxidectine a assuré une protection des chats traités contre la transmission de *B. henselae* par *C. felis* pendant les 84 jours de l'étude (Bradburry et al., 2010). Un collier combinant l'imidaclopride et la fluméthrine a protégé les chats pendant les 8 mois de la durée de l'étude (Lappin et al., 2013). Dans ces deux travaux, les auteurs ont utilisé des chats contaminés par *B. henselae* comme source de bactéries. Ces animaux ont été infestés régulièrement par des puces *C. felis*. Deux autres groupes de chats ont été utilisés (un groupe témoin et un groupe traité) dans un dispositif expérimental empêchant des contacts directs (léchage, griffure) entre groupe, mais permettant les transferts de puces. Ce dispositif permet donc d'étudier la contamination entre chats par *C. felis*. Le taux de contamination des chats témoins a varié entre 57 % (Lappin et al., 2013) et 100 % (Bradburry et Lappin, 2010).

Nous avons reproduit ce dispositif expérimental pour contaminer des chats exempts d'organisme pathogène spécifique (Specific Pathogen Free ou SPF) à partir de chats bactériémiques. Pour cela, 12 chats SPF âgés de 6 à 18 mois et pesant entre 2 et 3,5 kg ont été inclus dans notre étude. Les chats ont ensuite été divisés en deux groupes de six, et placés dans les sections 1 et 2 d'une chatterie (Figure 19). Les deux sections étaient adjacentes et séparées par un grillage à fin maillage, de manière à empêcher les chats de chaque section de se griffer ou de se mordre. Environ 25 % de la surface au sol entre les sections était recouverte de moquette afin de procurer des zones de refuge pour les œufs et larves de *C. felis*. Les animaux étaient négatifs vis-à-vis de *B. henselae* par PCR, culture et sérologie avant le début de l'étude. Les techniques sont détaillées dans la partie matériel et méthode de l'Article VIII.

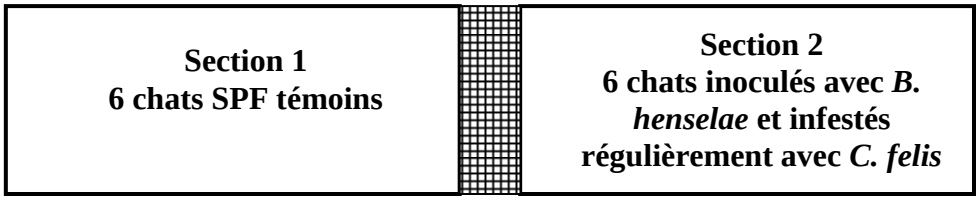


Figure 19. Hébergement des deux groupes de chats inclus dans l'étude.
Les deux sections sont séparées par un grillage empêchant les chats d'avoir des contacts entre eux. Les chats de la section 2 ont été inoculés par une suspension de *B. henselae* (10^6 par chat) et ont été infestés régulièrement par 100 *C. felis*.

Les chats de la section 2 ont été inoculés à J0 par voie intradermique par une suspension de *B. henselae* de génotype II à raison de 10^6 Unités Formant Colonie (Colony-Forming Units ou CFU) par chat. Des prises de sang ont été réalisées une fois par semaine pendant 13 semaines. Les prélèvements sanguins ont été réalisés à la veine antébrachiale et le sang a été divisé en 3 tubes : un tube sec contenant 1 ml de sang destiné la sérologie, et 2 tubes EDTA contenant 1 ml de sang chacun pour la PCR et la culture. Les chats de la section 2 ont été infestés par 100 *C. felis* à J22, J29, J36, J43, J50, J57, J64, J71, J78 et J85. Les chats des deux groupes ont par la suite été peignés à J28, J35, J42, J56, J63, J70, J77, J84 et J91. Après chaque peignage, les puces ont été replacées sur le pelage de chaque chat sauf à J91 où les puces ont été éliminées.

RÉSULTATS

Les résultats de sérologie, des PCR et des cultures sont représentés dans la figure 20. La bactériémie est détectable chez les six chats de la section 2 douze jours après inoculation et persiste pendant 8 semaines. À J78 seulement deux chats ont des cultures positives. Un seul chat reste bactériémique jusqu'à la fin du suivi. Les six chats deviennent séropositifs entre 12 jours et 29 jours après inoculation et le restent jusqu'à la fin du suivi. Aucun chat de la section 1 n'est devenu bactériémique ou séropositif.

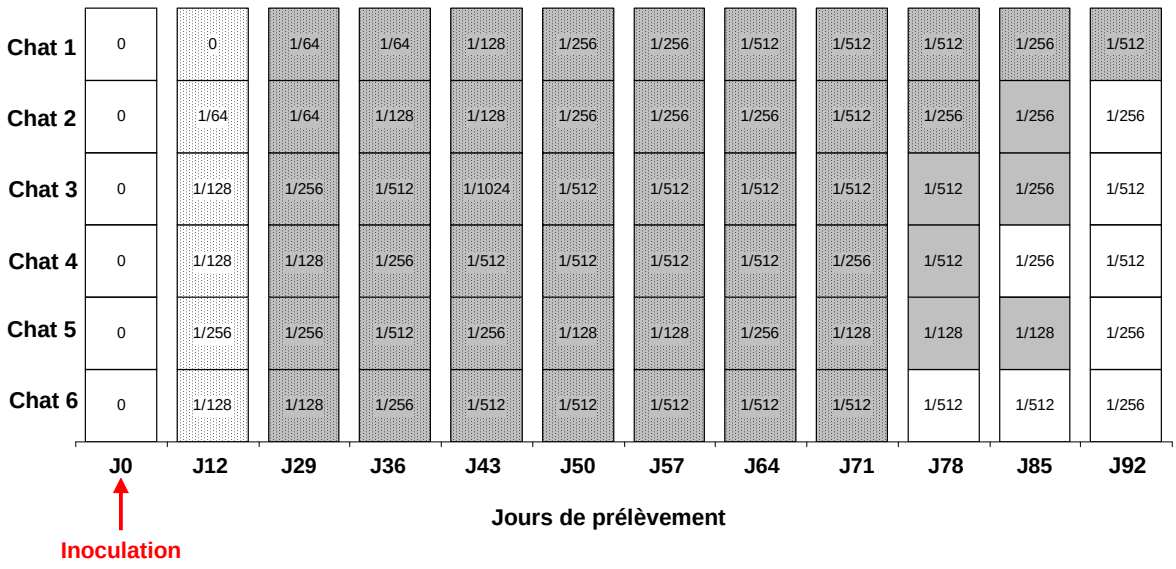


Figure 20. Résultats de PCR, de culture et de sérologie des 6 chats SPF de la section 2 inoculés par voie intradermique par une suspension de *B. henselae* à J0 (106 CFU/chat).

Les aires grisées représentent les résultats positifs en PCR. Les aires avec les points représentent les résultats positifs en culture. Les dilutions limites positives des sérums (mise en évidence des IgG) sont indiquées dans chaque carré.

Le nombre moyen de puces retrouvées par chats infestés de la section 2 a été de 62,1 ± 21,4. Pour l'ensemble des sessions, le nombre moyen de puces retrouvé par chat issu de la section 1 a été de 7,1 ± 3,8. Le transfert des puces des chats de la section 2 vers les chats de la section 1 a donc été effectif et des puces ont été retrouvées vivantes pour tous les différents jours de peignage dans les deux sections (Figure 21).

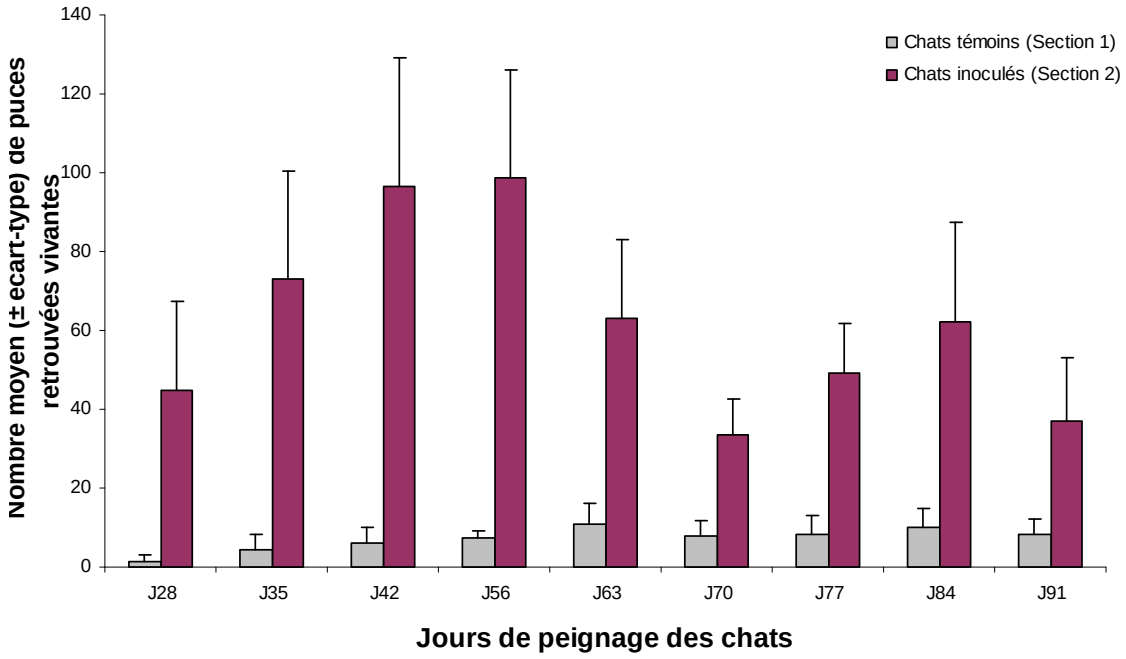


Figure 21. Nombre moyen de puces retrouvées sur les chats des sections 1 et 2 tout au long de l'étude.

À J0, les chats de la section 2 ont été inoculés avec une suspension de *B. henselae* (10^6 CFU/chat) par voie intradermique. Les chats inoculés ont été infestés par 100 *C. felis* aux jours : J22, J29, J36, J43, J50, J57, J64, J71, J78 et J85. Les chats des deux groupes ont été peignés à J28, J35, J42, J56, J63, J70, J77, J84 et J91.

Dans cette étude, le dispositif expérimental utilisé a permis un transfert de puces de chats bactériémiques à *B. henselae* à des chats SPF. Cependant aucun chat receveur n'est devenu bactériémique ou séropositif. Le protocole de contamination de chats par transferts naturels de puces n'est donc pas toujours reproductible.

Nous avons donc mis en place un protocole de contamination plus direct qui est fait l'objet de l'Article VIII en cours de soumission pour publication à ***Parasitology Research*** et intitulé : **"Protocol assessing the efficacy of ectoparasiticidal products in the prevention of flea-borne pathogens: *Bartonella henselae* - *Ctenocephalides. felis* - cat model".**

ARTICLE VIII (en préparation)

Protocol assessing the efficacy of ectoparasiticidal products in the prevention of flea-borne pathogens*: Bartonella henselae - Ctenocephalides felis - Cat* model

E. Bouhsira [1a], M. Franc [1a #], C. Gandoin [b], C. Bouillin [b], E. Liénard [a], HJ. Boulouis [b]

[a] Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires, INP-ENVT, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, F-31076 Toulouse, France

[b] Université Paris-Est, UMR BIPAR, INRA-Anses-UPEC-ENVA, F-94700 Maisons-Alfort, France

[#] corresponding author: m.franc@envt.fr

[1] these authors contributed equally to the work

Abstract

The blood-sucking arthropod *Ctenocephalides felis* is the main recognized vector of *Bartonella henselae*, the agent of cat-scratch disease. The transmission among cats and humans occur mainly through infected flea feces. Therefore the control of flea infestations seems to be the only efficient way to prevent *B. henselae* transmission. We propose a new simple protocol to infest cats with fleas contaminated with *B. henselae* on an artificial-flea feeder. Cats were infested on Days 0, 7, 14, 21 and 28 with contaminated fleas and became bacteremic within 14 to 41 days. In this protocol fleas are contaminated with certainty and cats are infested regularly with a controlled amount of fleas. It is adapted to assess the efficacy of compounds with long-lasting activity against arthropod-borne pathogens such as *B. henselae.* Two groups of cats would be needed composed of a control and treated group.

Introduction

Bartonella henselae is a Gram negative bacteria distributed worldwide and is recognized as an emerging zoonotic agent (Chomel and Kasten, 2010). It is mostly known as the causative agent of cat scratch disease (CSD) in humans (Chomel et al. 2004). The reservoir of this bacterium is the domestic cat. The cat flea, *Ctenocephalides felis*, is believed to function as

competent vector (Chomel et al. 1996). Infected cats are usually asymptomatic but may experience relapsing bacteremia, which can last for months to years (Breitschwerdt and Kordick 1995; Jacomo et al. 2002). Intradermal inoculation of *B. henselae* to kittens is followed by bacteremia, which usually appears within one to three weeks and may last for 60 days (Kordick et al. 1995; Abbott et al. 1997). In some cats, *B. henselae* seropositivity has been associated with lymphadenitis, gingivitis, stomatitis or urological diseases (Glaus et al. 1997; Breitschwerdt and Kordick, 2000). This bacterium has also been considered as a potential cause of anterior uveitis, myocarditis (Lappin and Black, 1999; Bradburry and Lappin, 2010) and endocarditis (Chomel et al. 2003).

In humans, CSD is characterised by a persistent regional lymphadenopathy which usually resolves within 2 to 4 months in immunocompetent patients (Boulouis et al. 2005). In immunocompromised individuals (such as those with AIDS or organ transplant recipients), the infection with *B. henselae* can lead to a wide range of life-threatening diseases, such as bacillary angiomatosis or bacillary peliosis (Boulouis et al. 2005; Breitschwert, 2008; Klotz et al. 2011).

The prevalence of bacteremia among cats varies from 4 to 70 % depending on the way of life of the cat (domestic or stray cat), its age, its geographical location, and the degree of flea infestation (Chomel et al. 1995; Maruyama et al. 2000; Rolain et al. 2004). More than 50% of cats are bacteremic to *B. henselae* in regions where *C. felis* is endemic (Heller et al. 1997). The most important point is that *B. henselae* infection among cats occurs only with fleas (Chomel et al. 1996). The infectious material seems to be the infected flea feces excreted on the fur of the flea-infested cat (Foil et al. 1998). *B. henselae* remains viable in the environment for at least 3 days (Finkelstein et al. 2002). DNA of this bacterium is still detected in the fleas and excreted feces 12 days after infection (Bouhsira et al. 2013a; Bouhsira et al. 2013b). While grooming, cats contaminate their mouth and claws with contaminated flea dejections which can also be inoculated to humans by scratching or biting (Zangwill et al. 1993; Eisen and Gage, 2012). Therefore, the best strategy for bartonellosis prevention seems to be the control of flea infestations.

Lately, the concept of antiparasitic treatment has evolved to the concept of prevention of pathogens transmission by the use of long-lasting formulations (Beugnet and Franc, 2012). Therefore, available formulations against ticks and fleas in cats and dogs need to be tested for their efficacy in preventing the transmission of arthropod-borne pathogens such as *B. henselae*. Two recent studies demonstrated the efficacy of imidacloprid/moxidectin and imidacloprid/flumethrin combinations in preventing *B. henselae* transmission among cats via

natural transfer of fleas (Bradburry and Lappin, 2010; Lappin et al. 2013). We introduce here a new and improved protocol using artificially contaminated fleas relevant to assess the efficacy of insecticidal compounds in protecting cats from *B. henselae*.

Materials and Methods

Ethics statement

Animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the relevant European standards of welfare for animals in research. Work performed on animals at the École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT), Toulouse, France, was reviewed and approved by the ethic committee of the Midi-Pyrénées region.

Animals

Six healthy Specific Pathogen Free (SPF) domestic cats from ENVT, weighing between 3.2 and 5.2 kg and aged 2 years were used in this study. Before their inclusion, all cats had been vaccinated against feline viral rhinotracheitis, feline calicivirus, feline distemper virus, and rabies virus, and were FeLV-antigen and FIV-antibody negative. The absence of *Bartonella* spp in cat blood was confirmed by PCR and bacterial cultures (see below), and their results for serum antibody against *Bartonella* spp were negative. They were free of fleas and did not receive any ectoparasitic treatments in the past 3 months.

Cats were housed in an indoor cattery with natural environmental lighting and were acclimated to the study conditions for 2 months prior to inclusion. The environment was enriched by shelves perches, toys and wooden claw-sharpening boards. Water and dry cat food appropriate for their age were provided *ad libitum.* The cattery and litter trays were cleaned daily. Animals were handled and monitored daily for any physiological abnormalities. Once a week, ocular and gingival mucosae were inspected for signs of anaemia.

Bacterial strains and growth conditions

Strains of *B. henselae* 16S rRNA genotypes I and II isolated from cats were used. The *B. henselae* strains were grown on brain heart infusion (BHI) agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) supplemented with 5% of fresh rabbit blood in humidified atmosphere at 35°C in 5% carbon dioxide atmosphere. For flea infection assays, bacteria were collected after 5 days growth on BHI agar plates and suspended in phosphate-buffered saline (PBS) buffer. The bacterial suspension was diluted with PBS to obtain approximately 2×10^8 bacteria per ml as adjusted by turbidimetry.

Fleas and artificial feeding

The *C. felis* strain employed was obtained from a laboratory-reared colony originating from a wild strain harvested from a cat and maintained on cats under laboratory conditions since 1990 at ENVT. Prior to use for this experiment, fleas were ascertained to be polymerase chain reaction (PCR) negative for *Bartonella* spp. infection (see below). Canine blood was used to feed the fleas and was obtained from three healthy 6-year-old beagle dogs (weight, 13 kg) from ENVT. The dogs had been vaccinated every year with the vaccine DHPPi/L, which protects dogs against canine distemper virus, canine Adenovirus type 2, canine Parvovirus, canine *parainfluenza* virus, and *Leptospira interrogans*. Blood smears and the microhematocrit of the three dogs were checked before their inclusion in the study, and none of the dogs showed any abnormalities. The absence of *Bartonella* spp in dog blood was also confirmed by PCR (see below). Blood obtained by venipuncture was placed in lithium heparin-coated Vacutainer tubes (Venosafe®, Laboratoires Terumo France, Guyancourt, France). Blood functional complement was deactivated by storing blood samples at room temperature for 1 h after the blood was drawn and before storage at 4°C. Blood samples were kept at 4°C for no longer than 24 h.

On days -1, 6, 15, 21 and 27, 500 unfed fleas were placed in a plexiglas box in contact with a glass feeder closed at the bottom with a thin Parafilm® membrane (Parafilm®3M, Pechiney Plastic Packaging, IL, USA). Fleas had never received any blood meal before the start of the study. To stimulate the flea to blood-feed, a constant temperature of 38.5°C, mimicking the host's body temperature, was maintained by a water-jacket circulation system through the glass feeder. They were fed on 5 ml of blood mixed with 500 µl of *B. henselae* in suspension in PBS at a concentration of approximately 2×10^8 bacteria per ml. After 24 hours of feeding, fleas were removed and identified as having fed successfully by observation of distension of the abdomen with the naked eye. The engorged fleas were then divided into 6 batches of 20 fleas each. A 7th batch of 20 fleas was reserved weekly for *B. henselae* PCR analysis so as to check the proper contamination of fleas with the bacterium. The six cats were infested weekly with 20 engorged fleas on days 0, 7, 16, 22 and 28. Fleas were not removed from cats until the end of the study.

Samples collection

Blood samples of cats were collected via ante-brachial venipuncture by use of a 22-gauge needle on study days: -3 (before inoculation) 6, 14, 21, 27, 34, 41, 55 and 69. Blood was distributed into two sterilized, DNA/RNA-free and EDTA-treated tubes (Venosafe® plastic tubes, Laboratoires Terumo France, Guyancourt, France) to avoid contaminations (1 mL

dedicated to PCR and 1 mL to bacterial culture) and in one untreated tube (1 mL blood for serum) (Venosafe® plastic tubes, Laboratoires Terumo France, Guyancourt, France). The EDTA blood samples were immediately frozen at – 20°C pending PCR assays and bacterial culture. The untreated tubes were kept at ambient temperature for 1 hour to help the blood clot before serum preparation. They were then centrifuged at 500 g at 4°C for 10 minutes and stored at – 20°C until determination of IgG titers against *Bartonella* spp.

Blood Culture

The EDTA tubes were thawed and spun at 1800g for 75 min at room temperature and the supernatant was discarded. The pellet was suspended in 250 µl of inoculation medium (Schneider's Drosophila medium 1x, L-glutamine, Gibco, France) and the volume recorded. Then, 250 µl of the suspension were inoculated onto BHI agar supplemented with 5% defibrinized fresh rabbit blood. The remaining suspension was inoculated onto a second plate. The plates were incubated for 1 month at 35.5°C with 5% CO_2 in a humid incubator and checked regularly for bacterial growth. Colonies were identified to *Bartonella* by their aspect, time of colony appearance and Gram staining. At least one colony per cat/day was sub-cultured, harvested and frozen at -70°C in 100% fetal calf serum. Identification of *B. henselae* was performed on subculture of one colony by PCR targeting the citrate synthase (*gltA)* gene (Norman et al. 1995).

PCR

Two-hundred microliters of EDTA blood were extracted by Nucleospin Blood Quickpure Macherey Nagel Kit (Mascherey-Nagel, Hoerdt, France). Then two PCR were carried out: a PCR targeting the citrate synthase (gltA) gene followed by a nested PCR targeting ITS gene (Rampersad et al., 2005).

For each sampling day, a pool of five fleas was extracted by Nucleospin Tissue Quickpure Macherey Nagel Kit (Mascherey-Nagel, Hoerdt, France) and a PCR targeting the *Bartonella* gltA gene was carried out.

Serology/IFA

One of the *B. henselae* strains used in this assay (strain A1568) was passed from agar grown cultures into Vero cells. Heavily infected cell cultures were spotted onto 12-well Teflon coated slides, incubated 18hours in CO_2 incubator, acetone fixed, and stored frozen. *B. henselae* antibodies were determined after traditional IFA practices. Fluorescein conjugated goat anti-cat IgG (Bethyl Lab, Montgomery, USA) was used at the dilution of 1/50 in phosphate-buffered saline solution (PBS). Serum samples were diluted in phosphate-buffered saline solution. Cat sera were screened at dilutions of 1: 64 (cut-off titre). All sera that

remained reactive at a titre of 1: 64 will be further tested with 2-fold dilutions out to a final dilution of 1: 1024.

Results (Fig. 1)

No side-effects were observed in any of the cats throughout the study. Pruritus or hair loss was not observed. No abnormal behaviour, anorexia, weakness or anaemia was detected and no clinical signs of bartonellosis were noticed after the start of the flea infestation.

***Bartonella* spp. PCR assay and culture:** A cat blood sample was treated as positive to *B. henselae* DNA while at least one PCR result among the two performed PCR assays (*gltA* gene and ITS gene) was positive. All positive results in PCR were also positive in cultures. Interval to a positive PCR assay or culture result ranged from 14 to 41 days of flea exposure with a median of 21 days. The first amplification of *B. henselae* DNA was obtained on the first 2 cats after 14 days of exposure to fleas. Bacteremia was confirmed with positive culture and lasted for at least 8 weeks. On day 21, cats 2, 3 and 4 had positive PCR and culture results. Their bacteremia lasted for at least 7 weeks. The fifth cat became positive on day 27 and the bacteremia lasted at least for 6 weeks. On day 41, the sixth cat was bacteremic, which lasted at least for 4 weeks. On the last day of the sampling, the 6 cats were still bacteremic. The median of bacteremia was 7 weeks.

All the pools of fleas tested were PCR positive for *gltA* gene except the pool of J0 before being placed in the feeder with the contaminated blood.

Serologic testing: the six cats developed detectable anti-*B. henselae* IgG titres, with interval to seroconversion ranging from 21 days to 55 days of fleas exposure. Titres ranged from 1:64 to 1:1024, and once positive titres were detected, all cats remained seropositive for the duration of the study.

DISCUSSION

In our protocol, cats were successfully contaminated with *B. henselae* after infestation with *C. felis* fed experimentally on infected blood. This simple design can be applied to assess efficacy of insecticidal compounds to prevent cats from *B. henselae* contamination.

Two recent studies investigated the efficacy of two formulations: a moxidectin/ imidacloprid spot-on and a flumethrin/ imidacloprid collar in preventing the transmission of *B. henselae* by cat fleas (Bradbury and Lappin, 2010; Lappin et al. 2013). In these protocols, fleas were placed regularly on *B. henselae* infected cats housed in neighbouring pens with treated and untreated cats. The pens were separated from each other by mesh, preventing cats from

licking or scratching, but allowing fleas to be transferred between animals. Carpets were placed between sections to promote the complete life cycle of *C. felis*. In the first study (Bradburry and Lappin, 2010), the cats from the middle section became bacteremic within 21 days after an intravenous inoculation of *B. henselae*. The control cats became bacteremic within 42 to 70 days after the first flea infestation and no infection was detected in the 6 treated cats.

The second study was long-term protocol and cats were followed for 252 days after the application of the collar in the treated group (Lappin et al, 2013). The inoculated cats became bacteremic within 39 days after intravenous injection of *B. henselae*, and were then infested with 100 *C. felis* on Day 0 and then monthly (Fig. 2 adapted from Lappin et al. 2013). The averages of fleas found on infected and control cats were very low: less than 2 in the control group and less than 8 in the infected group. The bacteremia and seroconversion were detected in only 4 out of 7 cats in the control group while the treated group remained negative.

In a preliminary study, we adapted these protocols to infect SPF cats via natural transfer of fleas from a group of cats inoculated with *B. henselae* (unpublished data). Twelve cats were housed in two adjacent sections separated with mesh. One group of cats was inoculated via intradermal route, with a suspension of *B. henselae* 16S rRNA genotype II, at a dosage of 10^6 colonies forming unit (CFU) per cat. The infected cats were infested with 100 *C. felis* once per week for 63 days. All cats were combed and blood sampled for PCR, culture and serology assays on a weekly basis. All the inoculated cats were bacteremic (all cultures positive) within 12 days. The 6 cats remained bacteremic for 49 days. Then 92 days after inoculation, only one cat was still bacteremic but with only 1 CFU/ml of blood (Fig. 3). Fleas were successfully transferred from one group to the other and the mean number of fleas counted by control cats was 7.6 (+/- 4.6). In these conditions none of the control cats became bacteremic or seroconverted during the 92 days of the study. As no SPF cats became positive by natural transfer of fleas, we set up a new design. Our new protocol is based on direct infestation of cats with experimentally contaminated fleas and presents several advantages. In such a system, the amount of fleas used for infestation is controlled and does not rely on the transfer of fleas from one group to the other. In this way, each cat from each group is challenged with the same amount of fleas at the same date. On the contrary, in the above-mentioned studies the transfer of fleas between groups was low. Moreover these fleas could have been transferred from the contaminated cats but also from adult newly emerged in the environment as the life-cycle of *C. felis* was promoted by the presence of carpets in the sections. In that case, these young fleas are probably not contaminated by *B. henselae* as the transmission of

this bacterium does not seem to occur trans-ovarially (Bouhsira et al. 2013a). The use of bacteremic cats can limit the start of a trial. Bacteremia has to be detected before the start of flea infestations. The occurrence of bacteremia in cats can indeed vary in function of the individual, the *Bartonella* strain and the route of inoculation (Kordick and Breitschwerdt, 1997). After an intradermal inoculation, cats became bacteremic within 12 days (unpublished data) whereas after an intravenous inoculation, cats became bacteremic within 21 to 39 days (Bradburry and Lappin, 2010; Lappin et al. 2013). The use of an artificial feeding system allowed the contamination of a large amount of fleas within 24 hours only, synchronising the start of trials. The viability of fleas is not shortened by the engorgement on *B. henselae* contaminated blood and the infectious status of the fleas can be regularly checked directly on pools of fleas (in our assay, all 4 pools are positive) by PCR or indirectly on the excreted feces by quantitative PCR (Bouhsira et al. 2013b). The inoculation dose and the *B. henselae* concentration of the contaminated meal could also be calculated and adapted so as to determine the limit dose at which fleas become infective to cats. This protocol allows natural contamination of the control cats by fleas, instead of intravenous injections which seems less efficient (Abbott et al. 1997). Once infested with fleas, cats can be contaminated directly via flea bites or indirectly via intradermal inoculation of contaminated flea feces when scratching themselves. In a long-term protocol, there is no certainty that fleas are placed on bacteremic cats throughout the study. For instance, in one study the inoculated cats were not bacteremic anymore by day 84 (Bradburry and Lappin, 2010) and in the other study, only one control cat was bacteremic by this time (Lappin et al. 2013). Then by Day 168, only 1 to 3 inoculated cats were bacteremic and they were all negative by day 252 (Fig. 2). Once all inoculated cats are bacteremic, fleas placed on them have to acquire the bacteria and to change hosts before being able to infect the control cats. The occurrence of bacteremia and seroconversion in the control group may then be delayed. Bradburry and Lappin (2010) obtained bacteremic control cats within 42 to 70 days with seroconversion occurring between 63 to 84 days. According to Lappin (2013), cats became bacteremic and seroconverted within 28 to 140 days and 56 to 154 days, respectively (Figures 2 and 3). As reported by Lappin (2013), not all cats in the control group became bacteremic. This failure can compromise the power of statistical tests carried out to assess the anti-flea efficacy of tested compounds, especially since few cats are used in the design of such surveys. On the contrary, our protocol overcomes this issue. After direct infestation with contaminated fleas, bacteremia occurred in 100% of the cats within 14 to 41 days, and they seroconverted within 21 to 55 days. These results are in accordance with

previous studies in which SPF kittens were infested with fleas harvested from contaminated cats (Chomel et al. 1996).

This straightforward protocol allows regular infestations of cats with a controlled amount of *B. henselae*-contaminated fleas. This is adapted to assess the efficacy of compounds with long-lasting activity against the transmission of the agent of the CSD. The use of artificial flea-feeder may also decrease the number of animals included in such trials as contaminated cats would not be used as source of bacteria. The demonstration of an ectoparasiticidal product efficacy would therefore need only two groups of cats composed of a control and treated group.

Acknowledgments

This study was funded in part by a grant from Zoetis Animal Health (Zaventem, Belgium). The authors are grateful to Martine Roques and Sonia Gounaud (ENVT, Toulouse, France), for their help with cats handling and restraining and for the flea colony maintenance.

REFERENCES

Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, Pedersen NC (1997) Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 20:41-51

Beugnet F, Franc M (2012) Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites. Trends Parasitol 28:267-279

Boulouis HJ, Chang CC, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB (2005) Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. Vet Res 36:383-410

Bouhsira E, Ferrandez Y, Liu M, Franc M, Boulouis HJ, Biville F (2013a) *Ctenocephalides felis* an in vitro potential vector for five *Bartonella* species. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 36:105-111

Bouhsira E, Franc M, Boulouis HJ, Jacquiet P, Raymond-Letron I, Liénard E (2013b) Assessment of persistence of *Bartonella henselae* in *Ctenocephalides felis*. Appl Environ Microbiol 79:7439-7444

Bradbury CA, Lappin MR (2010) Evaluation of topical application of 10% imidacloprid-1% moxidectin to prevent *Bartonella henselae* transmission from cat fleas. J Am Vet Med Assoc 236:869-873

Breitschwerdt EB, Kordick DL (1995) Bartonellosis. J Am Vet Med Assoc 206: 1928-1931

Breitschwerdt EB, Kordick DL (2000) *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin Microbiol Rev 13:428-438

Breitschwerdt EB (2008) Feline bartonellosis and cat scratch disease. Vet Immunol Immunopathol 123:167-171

Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler JE (1995) *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. J Clin Microbiol 33:2445-2450

Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE (1996) Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. J Clin Microbiol 34:1952-1956

Chomel BB, Wey AC, Kasten RW, Stacy BA, Labelle P (2003) Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. J Clin Microbiol. 41:5337-5339

Chomel BB, Boulouis HJ, Breitschwerdt EB (2004) Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections J Am Vet Med Assoc 224:1270-1279

Chomel BB, Kasten RW (2010) Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. J Appl Microbiol 109:743-750

Eisen RJ, Gage KL (2012) Transmission of flea-borne zoonotic agents. Annu Rev Entomol 57:61-82

Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp J Jr, Foil LD (2002) Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). J Med Entomol 39:915-919

Foil L, Andress E, Freeland RL, Roy AF, Rutledge R, Triche PC, O'Reilly KL (1998) Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. J Med Entomol 35:625-628

Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Greene C, Glaus B, Wolfensberger C, Lutz H (1997) Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. J Clin Microbiol 35:2883-2885

Heller R, Artois M, Xemar V, De Briel D, Gehin H, Jaulhac B, Monteil H, Piemont Y (1997) Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. J Clin Microbiol 35:1327-1331

Jacomo V, Kelly PJ, Raoult D (2002) Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate). Clin Diagn Lab Immunol 9:8-18

Klotz SA, Ianas V, Elliott SP (2011) Cat-scratch Disease. Am Fam Physician 83:152-155

Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, Hadfield TL, Berkhoff HA, Breitschwerdt EB (1995) Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. J Clin Microbiol 33:3245-3251

Kordick DL, Breitschwerdt EB (1997) Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. Am J Vet Res 58:492-497

Lappin MR, Black JC (1999) *Bartonella* spp infection as a possible cause of uveitis in a cat. J Am Vet Med Assoc 214:1205-1207

Lappin MR, Davis WL, Hawley JR, Brewer M, Morris A, Stanneck D (2013) A flea and tick collar containing 10% imidacloprid and 4.5% flumethrin prevents flea transmission of *Bartonella henselae* in cats. Parasit Vectors 6:26

Maruyama S, Nakamura Y, Kabeya H, Tanaka S, Sakai T, Katsube Y (2000) Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. J Vet Med Sci 62:273-279

Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, and Krause DC (1995) Differentiation of *Bartonella* like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. J Clin Microbiol 33:1797–1803

Rampersad JN, Watkins JD, Samlal MS, Deonanan R, Ramsubeik S, Ammons DR (2005) A nested-PCR with an internal amplification control for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae*: an examination of cats in Trinidad. BMC Infect Dis 5:63

Rolain JM, Locatelli C, Chabanne L, Davoust B, Raoult D (2004) Prevalence of *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence. Clin Diagn Lab Immunol 11:423-425

Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, Regnery RL, Plikaytis BD, Hadler JL, Cartter ML, Wenger JD (1993) Cat-scratch disease in Connecticut: epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. N Engl J Med 329:8-13

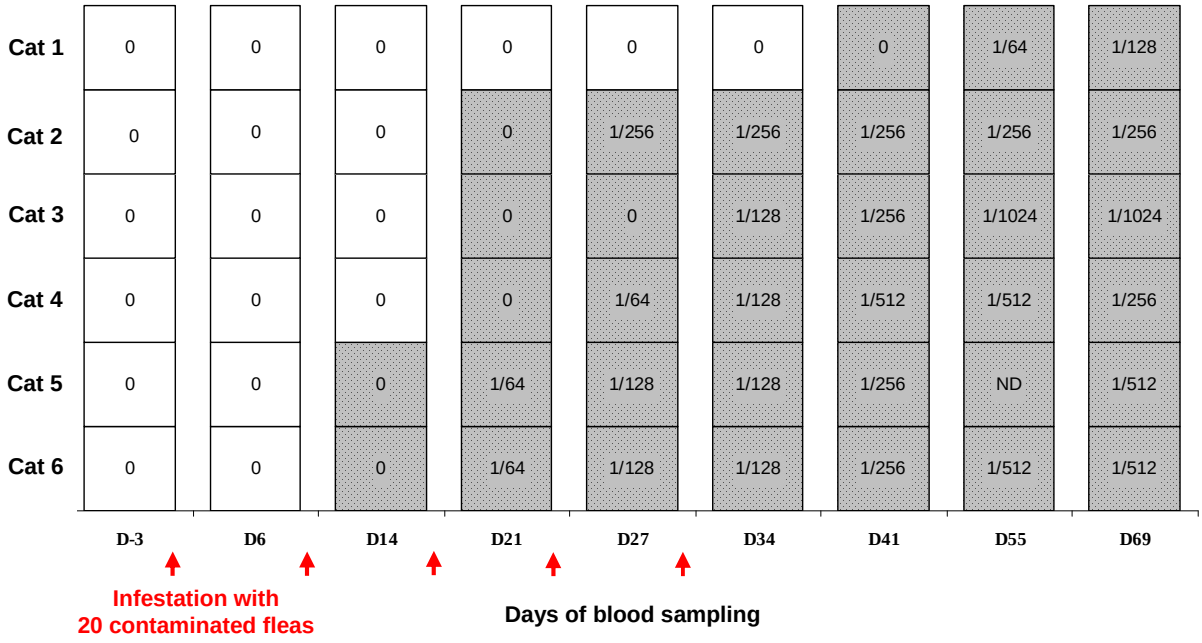


Fig. 1 *Bartonella henselae* PCR, culture and antibody assay results in 6 cats infested directly with *B. henselae* contaminated fleas.

Cats were infested with 20 *C. felis* on days 0, 7, 16, 22 and 28 (indicated by the red arrow). Grey shaded areas indicate PCR positive samples, and the dotted areas indicate culture positive samples. Titres of IgG are indicated in each box. (ND: not done).

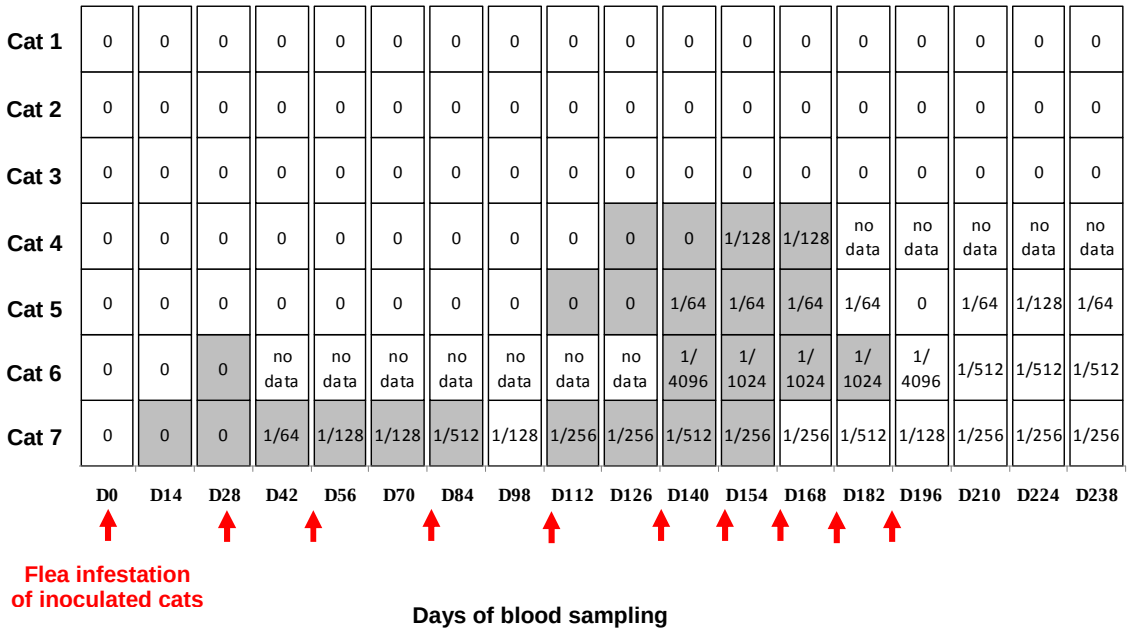


Fig. 2 Results adapted from Lappin et al. (2013)

In this study, 4 donor cats were inoculated with *B. henselae* and then infested with 100 *C. felis* on Day 0, once per month for 6 applications and then every 12 to 14 days for 4 applications (infestations are represented by the red arrows). Seven SPF cats housed next to the bacteremic cats, were followed by PCR and antibody assays for *B. henselae* bacteremia and seroconversion. Grey shaded areas indicate PCR positive samples**.** Titres of IgG are indicated in each box.

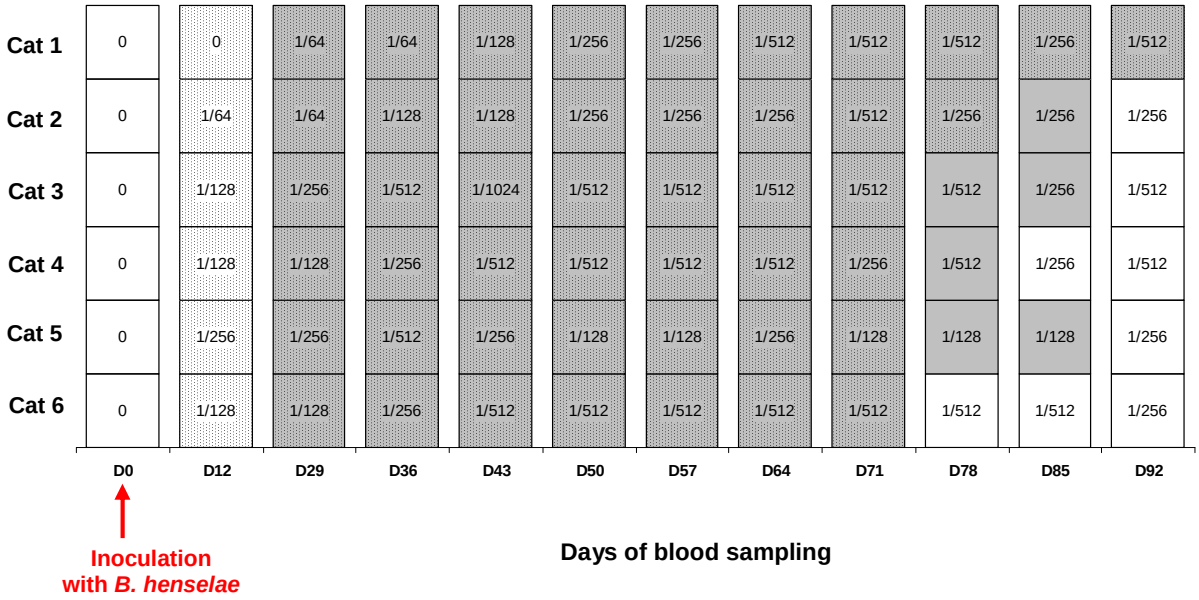


Fig. 3 *Bartonella henselae* PCR, culture and antibody assay results in 6 cats inoculated via intradermal injection on D0 with a suspension of *B. henselae* (106 CFU/cat)

Grey shaded areas indicate the samples that were PCR positive**.** Areas with dots indicate culture positive samples. Titres of IgG are indicated in each box (Unpublished data).

DISCUSSION GENERALE

CONCLUSION

La maladie des griffes du chat a été décrite cliniquement pour la première fois en 1950 (Debré et al., 1950), et *Bartonella henselae* n' a été identifiée comme l'agent responsable de cette maladie que dans les années 1990 (Regnery et al., 1992). Le rôle vecteur de *Ctenocephalides felis* a été démontré pour la première fois par Chomel et al. (1996). Tsai et al. (2011) ont réalisé une revue exhaustive de la diversité des espèces de *Bartonella* spp. et de leurs arthropodes vecteurs, confirmés ou supposés. Il apparait qu'un plus grand nombre d'espèces de *Bartonella* spp sont mises en évidence par biologie moléculaire chez les vecteurs que chez les différentes espèces d'hôtes mammifères (Tsai et al., 2011). Or, la détection d'ADN bactérien dans le vecteur n'est en effet pas une preuve suffisante de la compétence vectorielle de ce dernier ni de la réceptivité de l'hôte vertébré.

La mise en place d'un système de gorgement sur membrane par du sang préalablement contaminé par des bactéries est une voie possible d'exploration des interactions étroites entre le vecteur et une ou plusieurs espèces de *Bartonella* spp. Dans ce contexte, nous avons étudié les capacités de persistance, de transmission horizontale et verticale chez *C. felis* de cinq espèces de *Bartonella* spp.: *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. quintana*, *B. tribocorum* et *B. birtlesii*. Nous avons montré pour la première fois qu'il était possible de contaminer en laboratoire *C. felis* par *B. birtlesii* et *B. tribocorum*. L'ADN de *B. quintana* a été retrouvé une seule fois dans cette espèce de puce en conditions naturelles (Rolain et al., 2013). Nos résultats expérimentaux confirment cette observation. En outre, ces différentes espèces ont persisté dans la puce et ont été excrétées dans les déjections pendant au moins 3 jours après infection. Nous n'avons pas mis en évidence de transmission verticale puisque les bartonelles n'ont pas été retrouvées dans les œufs et dans les larves. En revanche, l'ADN de *Bartonella* spp. a été amplifié dans du sang initialement sain et provenant de nourrisseur sur lequel se sont nourries des puces préalablement contaminées. Cela suggère que la transmission horizontale est possible pour les cinq espèces de *Bartonella* spp impliquées dans nos travaux. Nos résultats confirment la réceptivité de *C. felis* à diverses espèces de *Bartonella* spp., y compris à des espèces, comme *B. tribocorum* et *B. birtlesii,* jusqu'ici décrites uniquement chez les rongeurs, ou détectées dans des puces isolées de rongeurs comme *X. cheopis* (Marignac et al., 2010 ; Bitam et al., 2012 ; Rolain et al., 2012). Il s'avère que *C. felis* peut être retrouvée également chez les rongeurs (Linardi et al., 1984 ; El Bahrawy et al., 1993 ; Bakr et al., 1996 ; Shoukry et al., 2006) et donc rencontrer naturellement ces deux dernières espèces de bartonelles. Les mécanismes œuvrant en faveur de la tolérance de *C. felis* à diverses espèces de *Bartonella* spp ne sont pas encore clairement identifiés et requièrent des investigations supplémentaires (Houpikian et Raoult, 2001 ; Chomel et al., 2009 ;

Kaewmongkol et al., 2011). Nos résultats suggèrent que plusieurs espèces de bactéries peuvent donc être transmises par une seule espèce de puce. Toutefois, il faudrait déterminer si des puces infectées par plusieurs espèces de *Bartonella* spp. transmettent plus efficacement une espèce parmi les autres (Bown et al., 2004). Le spectre d'hôte du vecteur est proposé comme un facteur important de la distribution des espèces de *Bartonella* spp. chez différents réservoirs (Houpikian et Raoult, 2001 ; Chomel et al., 2009).

Dans notre étude de la persistance de *B. henselae* chez *C. felis* (Article III), nous avons montré que les bactéries sont détectées dans les puces tout au long de leur vie sur nourrisseur, et qu'elles sont excrétées dans les fèces. Une étude récente rapporte la persistance de *B. quintana* chez *C. felis* après un gorgement artificiel sur nourrisseur à membrane (Kernif et al., 2014). Une fois contaminées par *B. quintana*, les puces ont été nourries sur du sang sain et analysées en PCR quantitative à trois jours et 13 jours post-infection. En fonction des lots de puces, les auteurs ont obtenu entre 52 et 90% de puces contaminées par *B. quintana* à 3 jours post-infection. Au treizième jour, toutes les puces analysées étaient négatives. Les bactéries ont été excrétées viables dans les fèces, et leur quantité a diminué du 3ème au 11ème jour de suivi. Au 13ème jour, les bactéries ne sont plus détectées ni dans les puces ni dans les fèces. Cette étude confirme que *B. quintana* peut persister dans l'organisme de *C. felis* et être excrétée dans les fèces. *C. felis* peut donc être considérée comme un vecteur potentiel de *B. quintana*, mais aucune multiplication ne semble avoir lieu chez la puce. Il serait intéressant de réaliser un suivi quantitatif quotidien du nombre de bactéries dans les puces, afin de déterminer si la diminution du nombre de bactéries observée dans les fèces est corrélée à une diminution du nombre de bactéries dans les puces, suggérant une élimination progressive par voie fécale. Dans notre étude, les bactéries sont encore détectées au 12ème jour dans les déjections et dans les puces, et au 13ème jour dans les puces. Nous n'avons pas obtenu de données pour les fèces au 13ème jour, car la quantité de déjections excrétées par les puces restantes était trop faible pour être analysée. La quantité de bactéries retrouvées dans les fèces a diminué progressivement jusqu'à la fin du suivi, comme pour *B. quintana*. Cependant, nous n'avons pas observé la même évolution dans les puces. En effet, la quantité de bactéries a augmenté dans les puces entre les jours 8 et 12 de suivi en fonction des essais, suggérant une potentielle dissémination voire une multiplication des bactéries dans des organes extra-digestifs, comme cela a été montré pour *R. felis* (Thepparit et al., 2013).

Bartonella quintana et *B. henselae* ont été mises en évidence dans le tube digestif de *C. felis* par IFI ou immunohistochimie respectivement à trois jours et à neuf jours post-infection (Higgins et al., 1996 ; Kernif et al., 2014). Ces résultats sont en accord avec la

détection de ces bactéries dans les fèces pendant au moins 11 jours post-infection, signifiant la présence des bactéries dans le tractus digestif. La localisation de *B. quintana* chez *C. felis* n'a pas été déterminée pour d'autres jours après infection. La technique de microdissection laser présentée dans notre travail doit être approfondie et pourrait être appliquée à la détermination de la localisation de plusieurs espèces de bartonelles chez *C. felis*. Il serait notamment intéressant d'analyser par PCRq les glandes salivaires après microdissection, afin de déterminer si des bartonelles viables peuvent y résider. Cela confirmerait les résultats présentés dans notre travail (Article II), montrant que *C. felis* peut contaminer du sang sain avec chacune des 5 espèces de *Bartonella* spp. étudiées. Cela permettrait de déterminer le rôle propre de la salive dans la transmission de *Bartonella*. En effet, la contamination du sang lors du repas peut être due à l'inoculation de salive infectée qui précède l'aspiration du sang, ou bien à la régurgitation du contenu digestif contaminé, en raison du blocage du proventricule, comme décrit pour les puces infectées par le bacille de la peste (Bacot et Martin, 1914), ou comme cela peut exister en conditions naturelles chez des puces non infectées (Cox et al., 1999). Récemment, Morick et al. (2013) ont mis en évidence l'ADN de *Bartonella* spp. dans les régurgitations digestives de puces *X. ramesis* contaminées par des bartonelles. Nous pourrions également envisager d'inoculer les glandes salivaires à des chats ou des rongeurs SPF (pour *B. birtlesii* et *B. tribocorum*), comme cela a été effectué avec les glandes salivaires d'*I. ricinus* contaminées par *B. henselae* (Cotté et al., 2008). Leur inoculation à des chats SPF a été suivie d'une bactériémie dans les 7 à 14 jours.

Notre étude de la transmission verticale a montré qu'en conditions expérimentales, il n'y a pas de transmission de bartonelles par voie trans-ovarienne chez *C. felis*. Nos travaux confirment donc les résultats de Morick et al. (2011) effectués chez *X. ramesis*. Toutefois, il semblerait qu'une stratégie originale, non trans-ovarienne de transmission à la génération suivante de *X. ramesis* ait été développée par *Bartonella* sp. OE 1-1, espèce proche de *B. elizabethae* (Morick et al., 2013a). Des œufs de puces ont été mis à évoluer dans un milieu nutritif contenant des déjections et des régurgitations digestives de puces contaminées par la souche de *Bartonella* sp. OE 1-1(Morick et al., 2013a). Seize pour cent des puces issues de ces œufs étaient contaminées par *Bartonella* sp. Ainsi les déjections et les régurgitations digestives de puces contaminées peuvent être une source d'infection pour les larves de la génération suivante qui se nourrissent sur ces substrats (Krasnov, 2008). Des puces contaminées par *B. henselae* ou *B. quintana* émettent des bactéries dans leurs déjections pendant au moins 11 jours (Article III , Kernif et al., 2014), et les bactéries survivent au moins

trois jours dans les fèces (Finkelstein et al., 2002). Ainsi, des puces se nourrissant sur un animal bactériémique vivant dans un environnement favorable à leur cycle biologique (chat vivant en appartement par exemple), pourraient contaminer les larves puis les adultes de la génération suivante. Dans ce système, les bactéries persistent dans la population de puces et seraient susceptibles de maintenir ainsi une pression infectieuse sur la population hôte-mammifère pendant au moins une génération de puces.

Chez l'hôte mammifère réservoir, l'invasion des érythrocytes et des cellules endothéliales leur permet d'échapper à la réponse immunitaire, et leur multiplication dans les érythrocytes ne conduit pas à la lyse de ces derniers (Schülein, 2001, Pulliainen et Dehio, 2012). La persistance des bactéries chez leur hôte peut être de plusieurs années, généralement sans signe clinique, (Kordick et Breitschwerdt, 1995; Jacomo et al., 2002).

Chez le vecteur, les bactéries persistent dans l'organisme de la puce, sans diminuer la survie de cette dernière. Morick et al. (2013b) ont montré que *X. ramesis* infectée par *Bartonella* spp. avait la même durée de vie que des puces non infectées. La fécondité et la fertilité des puces infectées n'ont également pas été altérées (Morick et al., 2013b). Dans notre travail (Article III), les puces *C. felis* contaminées par *B. henselae* ont survécu sur le nourrisseur artificiel aussi longtemps que les puces témoins (10-12 jours en fonction des essais). Des résultats similaires ont été trouvés récemment par Kernif et al. (2014) : la contamination de *C. felis* par *B. quintana* n'a pas eu d'effet délétère sur la survie des puces. Il est intéressant de noter que *C. felis* puisse être un des vecteurs de *B. quintana* suggérant que la co-évolution est très ancienne au sein du couple vecteur-bartonelle. En d'autres termes, les phénomènes ultérieurs de spéciation (apparition des différentes espèces de poux, de puces ou autres arthropodes vecteurs et de bartonelles par exemple) n'auraient pas rompu l'adaptation primitive entre les ancêtres des vecteurs et des bartonelles. Ce caractère a été conservé au fil du temps et a évolué, définissant alors des binômes épidémiologiquement très efficaces comme *C. felis* et *B. henselae* (Chomel et al., 1996), *Pediculus humanus* et *B. quintana* (Maurin et Raoult, 1996) ou *Lutzomyia verrucarum* et *B. bacilliformis* (Noguchi et Battistini, 1926). Une explication envisageable serait le caractère symbiotique des bartonelles pour leurs vecteurs (Tsai et al., 2011), qui jusqu'ici n'a pas encore été démontré (Morick et al., 2013a).

Pour persister dans l'organisme de la puce, les bartonelles doivent faire face à des conditions défavorables à leur survie. Dans le tube digestif des puces gorgées, elles sont en contact avec une grande quantité de sang, donc d'hème dont la dégradation conduit à la formation de

radicaux libres à l'origine du stress oxydatif des cellules, qui est létal pour de nombreuses bactéries (Graca-Souza et al., 2006). Des protéines fixant l'hème, appelée Heme Binding Protein (Hbp) ont été mises en évidence dans l'hémolymphes de tiques. Elles permettraient de fixer l'hème et diminuerait sa capacité à induire la peroxydation lipidique (Dansa-Petretski et al., 1995 ; Maya-Monteiro et al., 2004). Chez les bartonelles, il existe entre trois et cinq Hbp (Minnick et al., 2003). Quatre ont été identifiées chez *B. henselae* et cinq chez *B. quintana* appelées : HbpA, HbpB, HbpC, HbpD et HbpE. Elles permettraient aux bactéries de se protéger de concentrations toxiques d'hème (Roden et al., 2012) et donc de persister chez l'hôte mammifère et chez l'arthropode vecteur. Les modalités de régulations des gènes codant pour ces Hbp ont été étudiées chez *B. quintana* (Battisti et al., 2006). Lorsque les bactéries sont dans un environnement riche en hème libre, avec une forte concentration en oxygène et une faible température (mimant ainsi les conditions trouvées dans l'intestin d'un arthropode vecteur), les gènes codant pour les HbpB et C sont surexprimés. Ainsi ces protéines pourraient jouer un rôle important dans la survie des bactéries chez leur vecteur. Lorsque les bactéries sont dans un environnement proche de celui trouvé chez l'hôte mammifère (faible concentration en hème libre, température supérieure ou égalé à 37°C), les gènes codant pour les Hbp A, D et E sont surexprimés. Ces protéines semblent nécessaires à la survie des bactéries dans la circulation générale de l'hôte mammifère. Chez *B. tribocorum*, la HbpB semble nécessaire pour établir une bactériémie à long terme chez le rat (Saenz et al., 2007).

Le rôle de ces protéines dans la survie de *B. henselae* chez *C. felis* a été étudié (Liu et al., 2012). Pour cela, des puces *C. felis* se sont gorgées pendant 48 heures sur un nourrisseur à membrane avec du sang contenant des mutants de *B. henselae*, pour lesquels l'expression des gènes codant pour une des quatre Hbp a été diminuée successivement. Les puces ont ensuite été nourries pendant 8 jours sur du sang sain. Chez les puces témoins (gorgées sur *B. henselae* non modifiées), l'ADN bactérien a été détecté dans les déjections pendant les 8 jours de suivi après inoculation. Chez les puces nourries sur *B. henselae* mutantes, l'ADN bactérien est détecté pendant seulement quatre jours après infection. Ces résultats ont été obtenus pour le knockdown successif des quatre Hbp. Ainsi, lorsqu'une des quatre Hbp n'est pas exprimée (ou est moins exprimée), les bactéries sont éliminées plus rapidement de l'organisme des puces. Ces protéines favorisent donc la persistance de *B. henselae* chez *C. felis*. De même, ces auteurs ont montré que les Hbp étaient indispensables à l'invasion des cellules endothéliales.

Le rôle du transporteur membranaire SitABCD à fer et manganèse (impliqué dans lutte contre le stress oxydatif) a également été étudié (Liu et al., 2013). Le protocole expérimental de l'étude précédente a été utilisé. Ainsi, lorsque des puces *C. felis* sont nourries sur du sang

contenant des *B. henselae* mutantes (n'exprimant pas ou peu le transporteur membranaire), l'ADN bactérien n'est détecté que pendant quatre jours après infection. Ainsi, les capacités de maintien de *B. henselae* chez *C. felis* sont fortement corrélées à l'expression de gènes impliqués dans la lutte contre le stress oxydatif.
D'un point de vue évolutif, il conviendrait de rechercher si ces gènes existent sous formes alléliques différentes d'une espèce de *Bartonella* spp à l'autre, et suivant le vecteur et l'hôte mammifère préférentiels afin de mettre en lumière l'existence ou l'absence d'adaptations spécifiques impliquées dans la virulence bactérienne.

La dissémination et la transmission des bartonelles dépendent étroitement du vecteur. Dans le cas de *B. henselae*, nous avons vu que la transmission au sein du réservoir félin se fait par les puces (Chomel et al., 1996). Ainsi les modalités de transmission sont également liées au comportement des puces dans l'environnement et sur leur hôte.
Les puces initient rapidement leur repas sanguin après introduction sur leur hôte. Au bout d'une heure, la quasi-totalité des puces est gorgée (Cadiergues et al., 2000b, Cadiergues et al., 2001a). L'émission des déjections est presque instantanée et débute dans les 10 premières minutes après l'initiation du repas (Dryden et Rust, 1994). Il a été montré qu'en conditions expérimentales, *C. felis* est contaminée par *B. henselae* après trois heures de contact avec du sang contaminé (Higgins et al., 1996). Il serait intéressant de définir en combien de temps une puce se contamine et commence à émettre des bactéries dans ses déjections, par PCRq et mises en culture des déjections par exemple. Déterminer à quel moment se fait la transmission à l'hôte vertébré est indispensable pour mettre en place des stratégies de contrôle efficaces.
Dans nos travaux, nous avons vu que *B. henselae* persiste et est excrétée dans les fèces pendant au moins 12 jours, ce qui est supérieur à la durée moyenne de survie de *C. felis* sur le chat (Hinkle et al., 1998). Ainsi lorsqu'une puce contaminée est introduite sur un chat, elle émet des déjections contenant des bactéries qui se disséminent sur le pelage de l'animal infesté et dans l'environnement, et ce pendant toute sa durée de vie, constituant ainsi une source de contamination pour les autres animaux du foyer. Dans notre étude (Franc et al., 2013), nous avons montré que des transferts de puces sont possibles et rapides entre chats vivant en groupe. Lorsque des chats sont infestés par des puces et mis immédiatement en contact avec des chats non infestés, le transfert de puces se produit dès la première heure de contact. Au bout de 24 heures, 20% des puces sont passées des chats infestés aux chats non infestés. Des puces gorgées peuvent se trouver libres dans l'environnement (Dryden et al., 2011b), et donc être une source de contamination pour un nouvel hôte entrant dans le foyer.

Bradburry et Lappin (2010) ont montré que des transferts de puces entre groupes de chats pouvaient s'accompagner du transfert de *B. henselae* de chats bactériémiques à chats SPF. Ainsi, lorsque des chats infestés vivent en collectivité, les puces peuvent changer d'hôtes et donc transmettre leurs bartonelles d'un individu à l'autre. *C. felis* étant faiblement spécifique (Pung et al., 1994; Ménier et al., 1997; Beaucournu et Ménier, 1998), la contamination peut s'étendre à d'autres hôtes du foyer comme l'homme ou le chien.

A l'heure actuelle, la prévention de la transmission de bartonelles est essentiellement basée sur la lutte contre les puces. Nous avons exposé les principales molécules utilisables dans la lutte contre les puces des carnivores domestiques, et nous avons montré que toutes les formulations testées présentaient une bonne activité adulticide. Cependant, une bonne protection contre les puces, ne signifie pas une protection contre les pathogènes qu'elles peuvent transmettre. En effet, les principes actifs utilisés doivent tuer les puces suffisamment rapidement pour qu'aucune transmission ne soit possible. Actuellement, seules les formulations à base d'imidaclopride et de moxidectine et d'imidaclopride et de fluméthrine ont été testées et ont montré une protection contre la transmission de *B. henselae* par *C. felis* (Bradburry et Lappin, 2010 ; Lappin et al., 2013). Le protocole présenté par l'Article VIII pourrait être utilisé pour la détermination de l'efficacité de différentes formulations contre la transmission de *B. henselae* par *C. felis* chez le chat.

Nos travaux ont permis d'approfondir les connaissances sur le rôle vecteur de *C. felis* vis-à-vis de *Bartonella* spp., et soulignent l'intérêt d'un contrôle efficace contre les puces. Certains résultats demandent à être précisés, notamment en ce qui concerne la possibilité de transmission horizontale de *Bartonella* et la localisation de ces bactéries chez *C. felis*.
Il serait envisageable d'étendre nos investigations à d'autres espèces de puces, comme *C. canis* ou *P. irritans*, cette dernière étant en recrudescence notamment dans les élevages ovins et porcins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HORS PUBLICATIONS

ABBOTT RC., CHOMEL BB., KASTEN RW., FLOYD-HAWKINS KA., KIKUCHI Y., KOEHLER JE., PEDERSEN NC.
Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 1997, 20, 1, 41-51.

ABRAMOWICZ KF., WEKESA JW., NWADIKE CN., ZAMBRANO ML., KARPATHY SE., CECIL D., BURNS J., HU R., EREMEEVA ME.
Rickettsia felis in cat fleas, *Ctenocephalides felis* parasitizing opossums, San Bernardino county, California.
Med. Vet. Entomol., 2012, 26, 4, 458-462.

ADAM AA., SAEED OM., IBRAHIM HM., EL MALIK HY., AHMED ME.
Dipylidium caninum infection in a 41 -year- old sudanese man in Nyala, Sudan: the first reported case in Sudan in 2006.
NMJ., 2012, 2, 6, 37-42

ADJEMIAN J., PARKS S., MCELROY K., CAMPBELL J., EREMEEVA ME., NICHOLSON WL., MCQUISTON J., TAYLOR J.
Murine typhus in Austin, Texas, USA, 2008.
Emerg. Infect. Dis., 2010, 16, 3, 412-417.

AHSAN N., HOLMAN MJ., RILEY TR., ABENDROTH CS., LANGHOFF EG., YANG HC.
Peloisis hepatis due to *Bartonella henselae* in transplantation: a hemato-hepato-renal syndrome.
Transplantation, 1998, 65, 7, 1000-1003.

ALCAÍNO HA., GORMAN TR., ALCAÍNO R.
Flea species from dogs in three cities of Chile.
Vet. Parasitol., 2002, 105, 3, 261-265.

ALONSO JM.
Ecological interactions among *Yersinia* in their common reservoir, the rodent.
Bull. Soc. Pathol. Exot., 1999, 92, 5,414-417.

ALVES AS., MILHANO N., SANTOS-SILVA M., SANTOS AS., VILHENA M., DE SOUSA R.
Evidence of *Bartonella* spp., *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in domestic, shelter and stray cat blood and fleas, Portugal.
Clin. Microbiol. Infect., 2009, 15, 1-3.

ANDERSON RC.
Nematodes parasites of vertebrates: their development and transmission (2nd edition).
Wallingford: CABI publishing, 2000-672p.

ANDERSON BE., NEUMAN MA.
Bartonella spp. as emerging human pathogens.
Clin. Microbiol. Rev., 1997, 10, 2, 203-219.

ANYFANTAKIS D., KASTANAKIS M., PAPADOMICHELAKIS A., PETRAKIS G.,

BOBOLAKIS E.
Cat-scratch disease presenting as a solitary splenic abscess in an immunocompetent adult: case report and literature review.
Infez. Med., 2013, 21, 2, 130-133.

ARTHER RG., BOWMANN DD., MCCALL JW., HANSEN O., YOUNG DR..
Feline Advantage Heart (imidacloprid and Moxidectin) topical solution as monthly treatment for prevention of heartworm infection (*Dirofilaria immitis*) and control of fleas (*Ctenocephalides felis*) on cats.
Parasitol. Res., 2003, 90, 3, 137-139.

ASSARASAKORN SJ., VEIR JK., HAWLEY JR., BREWER MM., MORRIS AK., HILL AE., LAPPIN MR.
Prevalence of *Bartonella* Species, *Hemoplasmas*, and *Rickettsia felis* DNA in blood and fleas of cats in Bangkok, Thailand.
Res. Vet. Sci., 2012, 93, 3: 1213-1216.

AVIDOR B., GRAIDY M., EFRAT G. , LEIBOWITZ C., SHAPIRA G., SCHATTNER A., ZIMHONY O., GILADI M.
Bartonella koehlerae, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis.
J. Clin. Microbiol., 2004, 42, 8: 3462-3468.

AZAD AF.
Epidemiology of murine typhus.
Annu. Rev. Entomol., 1990, 35, 553-569.

AZAD AF., SACCI JB., NELSON WM., DASCH GA., SCHMIDTMANN ET., CARL M.
Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like *rickettsia* found in cat fleas.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1992, 89, 1, 43-46.

AZAD AF, RADULOVIC S., HIGGINS JA., NODEN BH., TROYER JM.
Flea-borne rickettsioses: ecologic considerations.
Emerg. Infect. Dis., 1997, 3, 3, 319-327.

BACOT AW., MARTIN CJ.
LXVII. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas.
J. Hyg. (Lond)., 1914, 13, 423-439.

BAI Y., KOSOY MY., LERDTHUSNEE K., PERUSKI LF., RICHARDSON JH.
Prevalence and genetic heterogeneity of *Bartonella* strains cultured from rodents from 17 provinces in Thailand.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2009, 81, 5, 811-816.

BAI Y., KOSOY MY., BOONMAR S., SAWATWONG P., SANGMANEEDET S., PERUSKI LF.
Enrichment culture and molecular identification of diverse *Bartonella* species in stray dogs.
Vet. Microbiol., 2010, 146, 3–4, 314-319.

BALAKRISHNAN N., CHERRY NA., LINDER KE., PIERCE E., SONTAKKE N., HEGARTY BC., BRADLEY JM., MAGGI RG., BREITSCHWERDT EB.
Experimental infection of dogs with *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*.
Vet. Immunol. Immunopathol., 2013, 156, 1-2, 153-158.

BAKR ME., MORSY TA., NASSEF NE., EL MELIGI MA.
Flea ectoparasites of commensal rodents in Shebin El Kom, Menoufia Governorate, Egypt.
J. Egypt. Soc. Parasitol., 1996, 26, 1, 39-52.

BARNETT SL., SCHUELE LG., QUEZADA A., STREHLAU G., DOHERTY P.
Efficacy of pyriprole topical solution against the cat flea, *Ctenocephalides felis*, on dogs.
Vet. Ther., 2008, 9, 1, 4-14.

BARRS VR., BEATTY JA., WILSON BJ., EVANS N., GOWAN R., BARAL RM., LINGARD AE., PERKOVIC G., HAWLEY JR., LAPPIN MR.
Prevalence of *Bartonella* species, *Rickettsia felis*, *Haemoplasmas* and the *Ehrlichia* group in the blood of cats and fleas in eastern Australia.
Aust. Vet. J., 2010, 88, 5, 160-165.

BATTISTI JM., SAPPINGTON KN., SMITHERMAN LS., PARROW NL., MINNICK MF.
Environmental signals generate a differential and coordinated expression of the heme receptor gene family of *Bartonella quintana*.
Infect. Immun., 2006, 74, 6, 3251-361.

GEORGIOS G., KABANAROU SA., FOTIOU P., ROUVAS A., XIROU T.
Retinal arterial occlusive disease in a young patient with cat scratch disease.
Case. Rep. Ophthalmol., 2013, 4, 2, 87-92.

BEAUCOURNU JC, LAUNAY H.
Les puces (Siphonaptera): de France et du Bassin méditerranéen occidental.
Paris: Fédération française des sociétés de sciences naturelles, 1990-550 p (Faune de France 76).

BEAUCOURNU JC., MÉNIER K.
The genus *Ctenocephalides* Stiles and Collins, 1930 (Siphonaptera, Pulicidae).
Parasite, 1998, 5, 1, 3-16.

BECK WK., MACKENSEN BH., WIEGAND B., PFISTER K.
Qualitative and quantitative observations on the flea population dynamics of dogs and cats in several areas of Germany.
Vet. Parasitol., 2006, 137, 1-2, 130-136.

BEERLAGE C., VARANAT M., LINDER K., MAGGI RG., COOLEY J., KEMPF VA., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella vinsonii subsp. *berkhoffii* and *Bartonella henselae* as potential causes of proliferative vascular diseases in animals.
Med. Microbiol. Immunol., 2012, 201, 3, 319-326.

BEN ARI T., GERSHUNOV A., GAGE KL., SNÄLL T., ETTESTAD P., KAUSRUD KL., STENSETH NC.
Human plague in the USA: the importance of regional and local climate.
Bio. Lett., 2008, 4, 6, 737-740.

BERGMANS AM., DE JONG CM., VAN AMERONGEN G., SCHOT CS., SCHOULS LM.
Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands.
J. Clin. Microbiol., 1997, 35, 9, 2256-2261.

BERTHEAU PV., MEIGNIN PV., JANIN A.
Microdissection on histologic and cytologic preparation: an approach to tissue heterogeneity.
Ann. Pathol., 1998, 18, 2, 110-119.

BERTHERAT E., LAMINE KM., FORMENTY P., THUIER P., MONDONGE V., MITIFU A., RAHALISON L.
Major pulmonary plague outbreak in a mining camp in the Democratic Republic of Congo: brutal awakening of an old scourge.
Med. Trop., 2005, 65, 6, 511-514.

BEUGNET F., FRANC M.
Results of a European multicentric field efficacy study of fipronil-(S) methoprene combination on flea infestation of dogs and cats during 2009 summer.
Parasite, 2010, 17, 4, 337-342.

BEUGNET F., FRANC M.
Insecticide and acaricide molecules and/or combinations to prevent pet infestation by ectoparasites.
Trends Parasitol., 2012, 28, 7, 267-279.

BEUGNET F., DELPORT P., LUUS H., CRAFFORD D., FOURIE J.
Preventive efficacy of Frontline(®) Combo and Certifect(®) against *Dipylidium caninum* infestation of cats and dogs using a natural flea (*Ctenocephalides felis*) infestation model.
Parasite, 2013, 20, 7.

BIANCARDI AL., CURI AL.
Cat-Scratch disease.
Ocul. Immunol. Inflamm., 2013. doi:10.3109/09273948.2013.833631.

BILLETER SA., SANGMANEEDET S., KOSAKEWICH RC., KOSOY MY.
Bartonella species in dogs and their ectoparasites from Khon Kaen Province, Thailand.
Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 2012, 43, 5, 1186-1192.

BITAM I., DITTMAR K., PAROLA P., WHITING MF., RAOULT D.
Fleas and flea-borne diseases.
Int. J. Infect. Dis., 2010, 14, 8, e667-676.

BITAM I., ROLAIN JM., NICOLAS V., TSAI YL., PAROLA P., GUNDI VA., CHOMEL BB., RAOULT D.
A multi-gene analysis of diversity of *Bartonella* detected in fleas from Algeria.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2012, 35, 1, 71-76.

BLAGBURN BL., VAUGHAN VL., LINDSAY DS., TEBBITT GL.
Efficacy dosage titration of lufenuron against developmental stages of fleas (*Ctenocephalides felis felis*) in cats.
Am. J. Vet. Res., 1994, 55, 1, 98-101.

BLAGBURN BL., HENDRIX CM., VAUGHAN JL., LINDSAY DS., BARNETT SH.
Efficacy of lufenuron against developmental stages of fleas (*Ctenocephalides felis felis*) in dogs housed in simulated home environments.
Am. J. Vet .Res., 1995, 56, 4, 464-467.

BLAGBURN BL., YOUNG DR., MORAN C., MEYER JA., LEIGH-HEFFRON A., PAARLBERG T., ZIMMERMANN AG., MOWREY D., WISEMAN S., SNYDER DE.
Effects of orally administered spinosad (Comfortis) in dogs on adult and immature stages of the cat flea (*Ctenocephalides felis*).
Vet. Parasitol., 2010, 168, 3-4, 312-317.

BLANCO JR., PÉREZ-MARTÍNEZ L., VALLEJO M., SANTIBÁÑEZ S., PORTILLO A., OTEO JA.
Prevalence of *Rickettsia felis*-like and *Bartonella* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from La Rioja (Northern Spain).
Ann. NY. Acad. Sci., 2006, 1078, 270-274.

BOILLAT N., GREUB G.
Maladie des griffes du chat et autres bartonelloses.
Rev. Med. Suisse, 2008, 152, 4, 901-907.

BOND R., RIDDLE A., MOTTRAM L., BEUGNET F., STEVENSON R.
Survey of flea infestation in dogs and cats in the United Kingdom during 2005.
Vet. Rec., 2007, 160, 15, 503-506.

BOUDEBOUCH N., SARIH M., BEAUCOURNU JC., AMAROUCH H., HASSAR M., RAOULT D., PAROLA P.
Bartonella clarridgeiae, *B. henselae* and *Rickettsia felis* in fleas from Morocco.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 2011, 105, 7, 493-498.

BOUHSIRA E., LIENARD E., JACQUIET P., WARIN S., KALTSATOS V., BADUEL L., FRANC M.
Efficacy of permethrin, dinotefuran and pyriproxyfen on adult fleas, flea eggs collection, and flea egg development following transplantation of mature female fleas (*Ctenocephalides felis felis*) from cats to dogs.
Vet. Parasitol., 2012, 190, 3-4, 541-546.

BOULOUIS HJ., BARRAT F., BERMOND D., BERNEX F., THIBAULT D., HELLER R., FONTAINE JJ., PIÉMONT Y., CHOMEL BB.
Kinetics of *Bartonella birtlesii* infection in experimentally infected mice and pathogenic effect on reproductive functions.
Infect. Immun., 2001, 69, 9, 5313-5317.

BOULOUIS HJ., CHANG CC., HENN JB., KASTEN RW., CHOMEL BB.
Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections.

Vet. Res., 2005, 36, 3, 383-410.

BOURDOISEAU G.
Parasitologie clinique du chien.
Créteil : NEVA, 2000, 455 p.

BOWN KJ., BENNET M., BEGON M.
Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles.
Emerg. Infect. Dis., 2004, 10, 4, 684-687.

BRADBURY CA., LAPPIN MR.
Evaluation of topical application of 10% imidacloprid-1% moxidectin to prevent *Bartonella henselae* transmission from cat fleas.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 2010, 236, 8, 869-873.

BREITSCHWERDT EB., KORDICK DL., MALARKEY DE., KEENE B., HADFIELD TL., WILSON K.
Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies.
J. Clin. Microbiol., 1995a, 33, 1, 154-160.

BREITSCHWERDT EB.
Bartonellosis.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1995b, 206, 1928-1931.

BREITSCHWERDT EB., KORDICK DL.
Bartonella infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection.
Clin. Microbiol. Rev., 2000, 13, 3, 428-438.

BREITSCHWERDT EB., MAGGI RG., SIGMON B., NICHOLSON WL.
Isolation of *Bartonella quintana* from a woman and a cat following putative bite transmission.
J. Clin. Microbiol., 2007, 45, 1, 270-272.

BREITSCHWERDT EB., MAGGI RG., CHOMEL BB., LAPPIN MR.
Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings.
J. Vet. Emerg. Crit. Care., 2010, 20, 1, 8-30.

BREITSCHWERDT EB., MASCARELLI PE., SCHWEICKERT LA., MAGGI RG., HEGARTY BC., BRADLEY JM., WOODS CW.
Hallucinations, sensory neuropathy, and peripheral visual deficits in a young woman infected with *Bartonella koehlerae*.
J. Clin. Microbiol., 2011, 49, 9, 3415-3417.

BRIANTI E., GAGLIO G., NAPOLI E., GIANNETTO S., DANTAS-TORRES F., BAIN O., OTRANTO D.
New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariosis.
Parasitol., 2012, 139, 4, 530-536.

BRINKERHOFF RJ., KABEYA H., INOUE K., BAI Y., MARUYAMA S.
Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and reproductive tissues of fleas collected from sympatric mammals.
ISME J., 2010, 4, 7, 955-958.

BROUAT C., RAHELINIRINA S., LOISEAU A., RAHALISON L., RAJERISON M., LAFFLY D., HANDSCHUMACHER P., DUPLANTIER JM.
Plague circulation and population genetics of the reservoir *Rattus rattus*: the influence of topographic relief on the distribution of the disease within the Madagascan focus.
PLoS Negl. Trop. Dis., 2013, 6; 7, 6:e2266. doi: 10.1371.

BROUQUI P., LASCOLA B., ROUX V., RAOULT D.
Chronic *Bartonella quintana* bacteremia in homeless patients.
N. Engl. J. Med., 1999, 340, 3, 184-189.

BUCHMANN AU., KERSHAW O., KEMPF VA., GRUBER AD.
Does a feline leukemia virus infection pave the way for *Bartonella henselae* infection in cats?
J. Clin. Microbiol., 2010, 48, 9, 3295-3300.

BURROUGHS AL.
Sylvatic plague studies: the vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis.*
J. Hyg. (Lond)., 1947, 45, 3, 371-396.

CADIERGUES MC.
Ctenocephalides canis (Curtis, 1826) (Siphoneptera : Pulicidae) : données épidémiologiques et biologiques-198p.
Th : Parasitologie: Toulouse III: 2000a; 1749.

CADIERGUES MC., HOURCQ P., CANTALOUBE B., FRANC M.
First bloodmeal of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) on cats: time to initiation and duration of feeding.
J. Med. Entomol., 2000b, 37, 4, 634-636.

CADIERGUES MC., JOUBERT C., FRANC M.
A comparison of jump performances of the dog flea, *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) and the cat flea, *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835).
Vet. Parasitol., 2000c, 92, 3, 239-241.

CADIERGUES MC., DELOFFRE P., FRANC M.
Répartition des espèces de puces rencontrées chez le chat en France.
Rev. Med. Vet., 2000d, 151, 5, 447-450.

CADIERGUES MC., SANTAMARTA D., MALLET X., FRANC M.
First blood meal of *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) on dogs: time to initiation of feeding and duration.
J. Par., 2001a, 87, 1, 214-215.

CADIERGUES MC., CAUBET C., FRANC M.
Comparison of the activity of selamectin, imidacloprid and fipronil for the treatment of dogs

infested experimentally with *Ctenocephalides canis* and *Ctenocephalides felis felis*.
Vet. Rec., 2001b, 149, 23, 704-706.

CANTÓ GJ., GUERRERO RI., OLVERA-RAMÍREZ AM., MILIÁN F., MOSQUEDA J., AGUILAR-TIPACAMÚ G.
Prevalence of fleas and gastrointestinal parasites in free-roaming cats in central Mexico.
PloS One, 2013, 8, 4, e60744.

CAPÁRI B., HAMEL D., VISSER M., WINTER R., PFISTER K., REHBEIN S.
Parasitic infections of domestic cats, *Felis catus*, in western Hungary.
Vet. Parasitol., 2013, 192, 1-3, 33-42.

CAPITTA P., ZOBBA R., MASALA G., COCCO R., TOLA S., PARPAGLIA ML.
Isolation and characterization of *Bartonella* strains in cats in Italy.
Transbound. Emerg. Dis., 2010, 57, 3, 201-204.

CARITHERS, HA.
Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients.
Am. J. Dis. Child., 1985, 139, 11, 1124-1133.

CARMAN KB., YIMENICIOGLU S., EKICI A., YAKUT A., DINLEYICI EC.
Co-existence of acute transverse myelitis and Guillain-Barré syndrome associated with *Bartonella henselae* infection.
Paediatr. Int. Child. Health., 2013, 33, 3, 190-192.

CHANG CC., LEE CC., MARUYAMA S., LIN JW., PAN MJ.
Cat-scratch disease in veterinary-associated populations and in its cat reservoir in Taiwan.
Vet. Res., 2006, 37, 4, 565-577.

CHEE JH., KWON JK., CHO HS., CHO KO., LEE YJ., ABD EL-ATY AM., ABDEL-ATY AM., SHIN SS.
A survey of ectoparasite infestations in stray dogs of Gwang-Ju city, republic of Korea.
Korean J. Parasitol., 2008, 46, 1, 23-27.

CHEESEMAN MT., BATES PA., CRAMPTON JM.
Preliminary characterisation of esterase and Platelet-Activating Factor (PAF)-acetylhydrolase activities from cat flea (*Ctenocephalides felis*) salivary glands.
Insect. Biochem. Mol. Biol., 2001, 31, 2, 157-164.

CHOMEL BB., ABBOTT RC., KASTEN RW., FLOYD-HAWKINS KA., KASS PH., GLASER CA., PEDERSEN NC., KOEHLER JE.
Bartonella henselae prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers.
J. Clin. Microbiol., 1995, 33, 9, 2445-2450.

CHOMEL BB., KASTEN RW., FLOYD-HAWKINS K., CHI B., YAMAMOTO K., ROBERTS-WILSON J., GURFIELD AN., ABBOTT RC., PEDERSEN NC., KOEHLER JE.
Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea.
J. Clin. Microbiol., 1996, 34, 8, 1952-1956.

CHOMEL BB., CARLOS ET., KASTEN RW., YAMAMOTO K., CHANG CC., CARLOS RS., ABENES MV., PAJARES CM.
Bartonella henselae and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from the Philippines. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1999, 60, 4, 593-597.

CHOMEL BB., MAC DONALD KA., KASTEN RW., CHANG CC., WEY AC., FOLEY JE., THOMAS WP., KITTLESON MD.
Aortic valve endocarditis in a dog due to *Bartonella clarridgeiae*.
J. Clin. Microbiol., 2001, 39, 10, 3548-3554.

CHOMEL BB., WEY AC., KASTEN RW., STACY BA., LABELLE P.
Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat.
J. Clin. Microbiol., 2003, 4, 11, 5337-5339.

CHOMEL BB., BOULOUIS HJ., BREITSCHWERDT EB.
Cat-scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 2004, 224, 8, 1270-1279.

CHOMEL BB., BOULOUIS HJ., MARUYAMA S., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella spp. in pets and effect on human health.
Emerg. Infect. Dis., 2006, 12, 3, 389-394.

CHOMEL BB., BOULOUIS HJ., BREITSCHWERDT EB., KASTEN RW., VAYSSIER-TAUSSAT M., BIRTLES RJ., KOEHLER JE., DEHIO C.
Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors.
Vet. Res., 2009a, 40, 2, 29. doi: 10.1051/vetres/2009011.

CHOMEL BB., KASTEN RW., WILLIAMS C., WEY AC., HENN JB., MAGGI R., CARRASCO S., MAZET J., BOULOUIS HJ., MAILLARD R., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella endocarditis: a pathology shared by animal reservoirs and patients.
Ann. NY. Acad. Sci., 2009b, 1166, 120-126.

CHOMEL BB., KASTEN RW.
Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis.
J. Appl. Microbiol., 2010, 109, 3, 743-750.

CHOMEL BB., SUN B.
Zoonoses in the bedroom.
Emerg. Infect. Dis., 2011, 17, 2, 167-172.

CHOMEL BB.
Lack of transovarial transmission of *Bartonella* by rodent fleas.
Mol. Ecol., 2011, 20, 13, 2660-2661.

CHOMEL BB., RICHARD WE., KASTEN RW., HENN JB., FLEISCHMAN DA., CHANG CC.
Experimental infection of dogs with various *Bartonella* species or subspecies isolated from their natural reservoir.
Vet. Microbiol., 2014, 168, 1, 169-176.

CHUNG CY., KASTEN RW., PAFF SM., VAN HORN BA., VAYSSIER-TAUSSAT M., BOULOUIS HJ., CHOMEL BB.
Bartonella spp. DNA associated with biting flies from California.
Emerg. Infect. Dis., 2004, 10, 7, 1311-1313.

CHUNG JY., HAN TH., KIM BN., YOO YS., LIM SJ.
Detection of *Bartonella henselae* DNA by Polymerase Chain Reaction in a patient with cat scratch disease: a case report.
J. Korean Med. Sci., 2005, 20, 5, 888-891.

CIVEN R., NGO V.
Murine typhus: an unrecognized suburban vectorborne disease.
Clin. Infect. Dis., 2008, 46, 6, 913-918.

COLSON P., LEBRUN L., DRANCOURT M., BOUÉ F., RAOULT D., NORDMANN P.
Multiple recurrent bacillary angiomatosis due to *Bartonella quintana* in an HIV-infected patient.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1996, 15, 2, 178-180.

COTTE V., BONNET S., LE RHUN D., LE NAOUR E., CHAUVIN A., BOULOUIS HJ., LECUELLE B., LILIN T., VAYSSIER-TAUSSAT M.
Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*.
Emerg. Infect. Dis., 2008, 14, 7, 1074-1080.

COYNE MJ.
Efficacy of a topical ectoparasiticide containing dinotefuran, pyriproxyfen, and permethrin against *Amblyomma americanum* (Lone Star tick) and *Amblyomma maculatum* (Gulf Coast tick) on dogs.
Vet. Ther., 2009, 10, 1-2, 17-23.

COX R., STEWART PD., Mc DONALD DW.
The ectoparasites of the european badger, *Meles meles*, and the behaviour of the host-specific flea, *Paraceras melis*.
J. Insect Behav., 12, 2, 245-265.

CRUZ-VAZQUEZ C., CASTRO GAMEZ E., PARADA FERNANDEZ M., RAMOS PARRA M.
Seasonal occurrence of *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) infesting dogs and cats in an urban area in Cuernavaca, Mexico.
J. Med. Entomol., 2001, 38, 1, 111-113.

DANSA-PETRETSKI M., RIBEIRO JM., ATELLA GC., MASUDA H., OLIVEIRA PL.
Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation.
J. Bio.l Chem., 1995, 270, 18, 10893-10896.

DANTAS-TORRES F., MELO MF., FIGUEREDO LA., BRANDÃO-FILHO SP.
Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil.

Rev. Bras. Parasitol. Vet., 2009, 18, 3, 75-77.

DANTAS-TORRES F., CAPELLI G., GIANNELLI A., RAMOS RA., LIA RP., CANTACESSI C., DE CAPRARIS D., DE TOMMASI AS., LATROFA MS., LACASELLA V., TARALLO VD., DI PAOLA G., QUROLLO B., BREITSCHWERDT EB., STANNECK D., OTRANTO D.
Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs.
Parasit. Vectors., 2013, 6, 1, 245. 10.1186/1756-3305-6-245.

DAVIS RM., SMITH RT, MADON MB, SITKO-CLEUGH E.
Flea, rodent, and plague ecology at Chuchupate Campground, Ventura County, California.
J. Vector Ecol., 2002, 27, 1, 107-127.

DEBRÉ R., LAMY M., JAMMET M.L., COSTIL L., MOZZICONACCI P.
La maladie des griffes de chat,
Bull. Memb. Soc. Méd. Hosp., 1950, 76-79.

DEHIO C., SAUDER U., HIESTAND U.
Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis.
J. Clin. Microbiol., 2004, 42, 11, 5320-5323.

DEHIO C.
Bartonella-host-cell interactions and vascular tumour formation.
Nat. Rev. Microbiol., 2005, 3, 621-631.

DESFONTIS JC.
Guide pratique des médicaments à usage vétérinaire.
Paris: Éditions Med'com, 2010-1737 p.

DIEHL KH., HULL R., MORTON D., PFISTER R., RABEMAMPIANINA Y., SMITH D., VIDAL JM., VAN DE VORSTENBOSCH C.
European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods
A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes.
J. Appl. Toxicol., 2001, 21, 1, 15-23.

DI FRANCESCO A., SANGUINETTI V., GALLINA L., GAVIOLI R., PIVA S., BALDELLI R.
Prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in dogs in Italy.
Vet. Rec., 2007, 161, 14, 489-490.

DIMOPOULOS S., ELEFTHERAKIS E., CHARITOS C., SAKELLARIDIS T., SINAPIDIS D., KOSTIS E., TOUMANIDIS S., EFSTATHIOU E.
Bartonella quintana endocarditis as a cause of severe aortic insufficiency and heart failure.
Hellenic J. Cardiol., 2012, 53, 6, 476-479.

DINIZ PP., WOOD M., MAGGI RG., SONTAKKE S., STEPNIK M., BREITSCHWERDT

EB.
Co-isolation of *Bartonella henselae* and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* from blood, joint and subcutaneous seroma fluids from two naturally infected dogs.
Vet. Microbiol., 2009, 138, 3-4, 368-372.

DOBLER G., PFEFFER M.
Fleas as parasites of the family canidae.
Parasit. Vectors, 2011, 4, 139. doi: 10.1186/1756-3305-4-139.

DOBSON P., TINEMBART O., FISCH RD., JUNQUERA P.
Efficacy of nitenpyram as a systemic flea adulticide in dogs and cats.
Vet. Rec., 2000, 147, 25, 709-713.

DOBY JM., BIGAIGNON G., AUBERT M., IMBERT G.
Les ectoparasites du renard et la maladie de Lyme. Recherche de *Borrelia burgdorferi* chez les tiques (Ixodidés) et les puces (Siphonaptera).
Bull. Soc. Franç. Parasitol., 1991, 9, 279-288.

DONOSO G., PAULSEN C., RIQUELME P., LOBO G., GUTIERREZ D., PEREZ A., JIMÉNEZ C.
Bone scintigraphy in children with cat-scratch disease.
Clin. Nucl. Med., 2013, 38, 12, 936-939.

DORMAN DC., BEASLEY VR.
Neurotoxicology of pyrethrin and the pyrethroid insecticides.
Vet. Hum. Toxicol., 1991, 33, 3, 238-243.

DRANCOURT M., MAINARDI JL., BROUQUI P., VANDENESCH F., CARTA A., LEHNERT F., ETIENNE J., GOLDSTEIN F., ACAR J., RAOULT D.
Bartonella (*Rochalimaea*) *quintana* endocarditis in three homeless men.
N. Engl. J. Med., 1995, 332, 7, 419-423.

DROZ S., CHI B., HORN E., STEIGERWALT AG., WHITNEY AM., BRENNER DJ.
Bartonella koehlerae sp. nov., isolated from cats.
J. Clin. Microbiol., 1999, 37, 4, 1117-1122.

DRYDEN MW.
Host association, on-host longevity and egg production of *Ctenocephalides felis felis*.
Vet. Parasitol., 1989, 34, 1-2, 117-122.

DRYDEN MW., GAAFAR SM.
Blood consumption by the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 1991, 28, 3, 394-400.

DRYDEN MW., BROCE AB., MOORE WE.
Severe flea infestation in dairy calves.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1993, 203, 10, 1448-1452.

DRYDEN MW., RUST MK.
The cat flea: biology, ecology and control.

Vet. Parasitol., 1994, 52, 1-2, 1-19.

DRYDEN MW., SMITH V., PAYNE PA., Mc TIER PL.
Comparative speed of kill of selamectin, imidacloprid, and fipronil-(S)-methoprene spot-on formulations against fleas on cats.
Vet. Ther., 2005, 6, 3, 228-236.

DRYDEN MW., PAYNE PA., SMITH V., HOSTETLER J.
Efficacy of imidacloprid + moxidectin and selamectin topical solutions against the KS1 *Ctenocephalides felis* flea strain infesting cats.
Parasit. Vectors, 2011a, 4, 174.

DRYDEN M., CARITHERS D., MCBRIDE A., RIGGS B., SMITH L., DAVENPORT J., SMITH V., PAYNE P., GROSS SJ.
A comparison of flea control measurement methods for tracking flea populations in highly infested private residences in Tampa, FL following topical treatment of pets with Frontline Plus (Fipronil/(S)-methoprene).
Intern. J.of Appl. Res.Vet. Med., 2011b, 9, 4, 356–367.

DRYDEN MW., PAYNE PA., SMITH V., HEANEY K., SUN F.
Efficacy of indoxacarb applied to cats against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis*, flea eggs and adult flea emergence.
Parasit. Vectors, 2013, 6, 126. doi: 10.1186/1756-3305-6-126.

DUNCAN AW., MAGGI RG., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella DNA in dog saliva.
Emerg. Infect. Dis., 2007, 13, 12, 1948-1950.

DUNCAN AW., MARR HS., BIRKENHEUER AJ., MAGGI RG., WILLIAMS LE., CORREA MT., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella DNA in the blood and lymph nodes of Golden Retrievers with lymphoma and in healthy controls.
J. Vet. Intern. Med., 2008, 22, 1, 89-95.

DUPLANTIER JM., DUCHEMIN JB., CHANTEAU S., CARNIEL E.
From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence.
Vet. Res., 2005, 36, 3, 437-453.

DURDEN LA., KOLLARS TM Jr.
The fleas (Siphonaptera) of Tennessee.
J. Vector. Ecol., 1997, 22, 1, 13-22.

DURDEN LA., JUDY TN., MARTIN JE., SPEDDING LS.
Fleas parasitizing domestic dogs in Georgia, USA: species composition and seasonal abundance.
Vet. Parasitol., 2005, 130, 1-2, 157-162.

DUSSER P., EYSSETTE-GUERREAU S., KONE-PAUT I.
Osteomyelitis in cat-scratch disease: a case report and literature review.

Arch. Pediatr., 2013, 20, 6, 624-628.

EDOUARD S., RAOULT D.
Bartonella henselae, an ubiquitous agent of proteiform zoonotic disease.
Med. Mal. Infect., 2010, 40, 6, 319-330.

EINSTEIN R.
Principles of veterinary therapeutics.
Harlow, Essex, England: Longman Scientific & Technical, 1994-591 p.

EISEN RJ., BORCHERT JN., HOLMES JL., AMATRE G., VAN WYK K., ENSCORE RE., BABI N., ATIKU LA., WILDER AP., VETTER SM., BEARDEN SW., MONTENIERI JA., GAGE KL.
Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by cat fleas (*Ctenocephalides felis*) and their potential role as vectors in a plague-endemic region of Uganda.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2008, 78, 6, 949-956.

EISEN RJ., EISEN L., GAGE KL.
Studies of vector competency and efficiency of north american fleas for *Yersinia pestis*: state of the field and future research needs.
J. Med. Entomol., 2009, 46, 4, 737-744.

EISEN RJ., GAGE KL.
Transmission of flea-borne zoonotic agents.
Annu. Rev. Entomol., 2012, 57, 61-82.

EL BAHRAWY AA., AL DAKHIL MA.
Studies on the ectoparasites (fleas and lice) on rodents in Riyadh and its surroundings, Saudi Arabia.
J. Egypt. Soc. Parasitol., 1993, 23, 3, 723-735.

EMMERT-BUCK MR., BONNER RF., SMITH PD., CHUAQUI RF., ZHUANG Z., GOLDSTEIN SR., WEISS RA., LIOTTA LA.
Laser capture microdissection.
Science, 1996, 274, 5289, 998–1001.

EPE C., COATI N., STANNECK D.
Efficacy of the compound preparation imidacloprid 10%/permethrin 50% spot-on against ticks (*I. ricinus*, *R. sanguineus*) and fleas (*Ct. felis*) on dogs.
Parasitol. Res., 2003, 90, S122–124.

ESAMAEILI S., AZADMANESH K., NADDAF SR., RAJERISON M., CARNIEL E., MOSTAFAVI E.
Serologic survey of plague in animals, Western Iran.
Emerg. Infect. Dis., 2013, 19, 9. doi: 10.3201/eid1909.121829.

ESCARMELLE A., DELBRASSINE N., DE POTTER P.
Cat-scratch disease and Parinaud's oculoglandular syndrome.
J. Fr. Ophtalmol., 2004, 27, 2, 179-183.

ESPINA V., WULFKUHLE JD., CALVERT VS., VANMETER A., ZHOU W., COUKOS G., GEHO DH., PETRICOIN EF., LIOTTA LA.
Laser-capture microdissection.
Nat. Protoc., 2006, 1, 2, 586-603.

FAGBEMI BO.
Effect of *Ctenocephalides felis strongylus* infestation on the performance of West African dwarf sheep and goats.
Vet. Q., 1982, 4, 2, 92-95.

FARKAS R., GYURKOVSZKY M., SOLYMOSI N., BEUGNET F.
Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness.
Med. Vet. Entomol., 2009, 23, 3, 187-194.

FINKELSTEIN JL., BROWN TP., O'REILLY KL., WEDINCAMP J Jr., FOIL LD.
Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 2002, 39, 6, 915-919.

FLEXMAN JP., LAVIS NJ., KAY ID., WATSON M., METCALF C., PEARMAN JW.
Bartonella henselae is a causative agent of cat-scratch disease in Australia.
J. Infect., 1995, 31, 3, 241-245.

FOIL L., ANDRESS E., FREELAND RL., ROY AF., RUTLEDGE R., TRICHE PC., O'REILLY KL.
Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces.
J. Med. Entomol., 1998, 35, 5, 625-628.

FONT RL., DEL VALLE M., MITCHELL BM., BONIUK M.
Cat-scratch uveitis confirmed by histological, serological, and molecular diagnoses.
Cornea, 2011, 30, 4, 468-471.

FOONGLADDA S., INTHAWONG D., KOSITANONT U., GAYWEE J.
Rickettsia, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, and *Bartonella* in ticks and fleas from dogs and cats in Bangkok.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2011, 11, 10, 1335-1341.

FOSS RD., GUHA-THAKURTA N., CONRAN RM., GUTMAN P.
Effects of fixative and fixation time on the extraction and Polymerase Chain Reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls.
Diagn. Mol. Pathol., 1994, 3, 3, 148-155.

FOUCAULT C., BROUQUI P., RAOULT D.
Bartonella quintana characteristics and clinical management.
Emerg. Infect. Dis., 2006, 12, 2, 217-223.

FOURNIER PE., LELIEVRE H., EYKYN SJ., MAINARDI JL., MARRIE TJ., BRUNEEL F., ROURE C., NASH J., CLAVE D., JAMES E., BENOIT-LEMERCIER C., DEFORGES

L., TISSOT-DUPONT H., RAOULT D.
Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients.
Medicine, 2001, 80, 4, 245-251.

FRANC M.
Fleas and methods of control.
Rev. Sci. Tech., 1994, 13, 4, 1019-1037.

FRANC M., CADIERGUES MC.
Use of injectable lufenuron for treatment of infestations of *Ctenocephalides felis* in cats.
Am. J. Vet. Res., 1997a, 58, 2, 140-142.

FRANC M., CADIERGUES MC.
Mode of contamination of dogs by adult fleas (*Ctenocephalides felis*) in different controlled environments.
Rev. Med. Vet., 1997b, 148, 1, 23-26.

FRANC M.
Ctenocephalides felis (Bouché 1835) (Siphoneptera: Pulicidae): données épidémiologiques et biologiques. Méthodes d'évaluation des moyens de lutte-290p.
Th : Parasitologie : Toulouse III : 1998a ; 2974.

FRANC M., CHOQUART P., CADIERGUES MC.
Répartition des espèces de puces rencontrées chez le chien en France.
Rev. Med.Vet., 1998b, 149, 2, 135-140.

FRANC M., YAO KP.
Comparison of the activity of selamectin, imidacloprid and fipronil for the treatment of cats infested experimentally with *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides felis strongylus*.
Vet. Parasitol., 2007a, 143, 2, 131-133.

FRANC M., BEUGNET F., VERMOT S.
Efficacy of fipronil-(S)-methoprene on fleas, flea egg collection, and flea egg development following transplantation of gravid fleas onto treated cats.
Vet. Ther., 2007, 8, 4, 285-292.

FRANC M., BEUGNET F.
A comparative evaluation of the speed of kill and duration of efficacy against weekly infestations with fleas on cats treated with fipronil-(S)-methoprene or metaflumizone.
Vet. Ther., 2008, 9, 2, 102-110.

FRANC M., BOUHSIRA E.
Efficacy of a combination of a fipronil-(S)-methoprene spot-on formulation and a deltamethrin-impregnated collar in controlling fleas and sandflies on dogs.
Vet. Ther., 2009a, 10, 1-2, 71-77.

FRANC M., BOUHSIRA E.
Evaluation of speed and duration of efficacy of spinosad tablets for treatment and control of *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae) infestations in dogs.

Parasite, 2009b, 16, 2, 125-128.

FUEHRER HP., IGEL P., TREIBER M., BAUMANN TA., RIEDL J., SWOBODA P., JOACHIM A., NOEDL H.
Ectoparasites of livestock, dogs, and wild rodents in the Chittagong Hill tracts in southeastern Bangladesh.
Par. Res., 2012, 111, 4, 1867-1870.

FUKUSHIMA H., HAO Q, WU K, HU X, CHEN J, GUO Z, DAI H, QIN C, LU S, GOMYODA M.
Yersinia enterocolitica O9 as a possible barrier against *Y. pestis* in natural plague foci in Ningxia, China.
Curr. Microbiol., 2001, 42, 1, 1-7.

FULCHINI R., BLOEMBERG G., BOGGIAN K.
Bacillary angiomatosis and bacteremia due to *Bartonella quintana* in a patient with chronic lymphocytic leukemia.
Case Rep. Infect. Dis., 2013, 2013:694765, doi: 10.1155/2013/694765.

GAGE KL., DENNIS DT., ORLOSKI KA., ETTESTAD P., BROWN TL., REYNOLDS PJ., PAPE WJ., FRITZ CL., CARTER LG., STEIN JD.
Cases of cat-associated human plague in the western US, 1977-1998.
Clin. Infect. Dis., 2000, 30, 6, 893–900.

GALDAN B., BAATAR U., MOLOTOV B., DASHDAVAA O.
Plague in Mongolia.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2010, 10, 1, 69-75.

GALLAGHER RI., BLAKELY SR., LIOTTA LA., ESPINA V.
Laser capture microdissection: Arcturus (XT) infrared capture and UV cutting methods.
Methods Mol. Biol., 2012, 823, 157–178.

GILLESPIE TN., WASHABAU RJ., GOLDSCHMIDT MH., CULLEN JM., ROGALA AR., BREITSCHWERDT EB.
Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 2003, 222, 1, 47-51.

GLAUS T., HOFMANN-LEHMANN R., GREENE C., GLAUS B., WOLFENSBERGER C., LUTZ H.
Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland.
J. Clin. Microbiol., 1997, 35, 11, 2883-2885.

GOBERT GN., Mc MANUS DP., NAWARATNA S., MOERTEL L., MULVENNA J., JONES MK.
Tissue specific profiling of females of *Schistosoma japonicum* by integrated laser microdissection microscopy and microarray analysis.
PLoS Negl. Trop. Dis., 2009, 3, 6, e469. doi: 10.1371/journal.pntd.0000469.

GOING JJ., LAMB RF.
Practical histological microdissection for PCR analysis.
J. Pathol., 1996, 179, 1, 121-124.

GONZÁLEZ A., CASTRO DEL C., GONZÁLEZ S.
Ectoparasitic species from *Canis familiaris* (Linné) in Buenos Aires province, Argentina.
Vet. Parasitol., 2004, 120, 1-2, 123-129.

GOODMAN RA., BREITSCHWERDT EB.
Clinicopathologic findings in dogs seroreactive to *Bartonella henselae* antigens.
Am. J. Vet. Res., 2005, 66, 12, 2060-2064.

GOURIET F., LEPIDI H., HABIB G., COLLART F., RAOULT D.
From cat-scratch disease to endocarditis, the possible natural history of *Bartonella henselae* infection.
BMC Infect. Dis., 2007, 7, 30.

GRAÇA-SOUZA AV., MAYA-MONTEIRO C., PAIVA-SILVA GO., BRAZ GR., PAES MC., SORGINE MH., OLIVEIRA MF., OLIVEIRA PL.
Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods.
Insect. Biochem. Mol. Biol., 2006, 36, 4, 322-335.

GRACIA MJ., CALVETE C., ESTRADA R., CASTILLO JA., PERIBÁÑEZ MA., LUCIENTES J.
Fleas parasitizing domestic dogs in Spain.
Vet. Parasitol., 2008, 151, 2-4, 312-319.

GRACIA MJ., CALVETE C., ESTRADA R., CASTILLO JA., PERIBAÑEZ MA., LUCIENTES J.
Survey of flea infestation in cats in Spain.
Med. Vet. Entomol., 2013, 27, 2, 175-180.

GUAGUERE E., PRÉLAUD P.
Guide pratique de dermatologie canine.
Paris : Kalianxis, 2006-597 p

GUNDI VA., BOURRY O., DAVOUST B., RAOULT D., LA SCOLA B.
Bartonella clarridgeiae and *B. henselae* in dogs, Gabon.
Emerg. Infect. Dis., 2004, 10, 12 , 2261-2262.

GUPTILL L., SLATER L., WU CC., LIN TL., GLICKMAN LT., WELCH DF., HOGENESCH H.
Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*.
J. Infect. Dis., 1997, 176, 1, 206-216.

GUPTILL L., SLATER LN., WU CC., LIN TL., GLICKMAN LT., WELCH DF., TOBOLSKI J., HOGENESCH H.
Evidence of reproductive failure and lack of perinatal transmission of *Bartonella henselae* in experimentally infected cats.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1998, 65, 2-4, 177-189.

GUPTILL L., SLATER L., WU CC., GLICKMAN LT., LIN TL., WELCH DF., CRIPPEN JT., HOGENESCH H.
Immune response of neonatal specific pathogen-free cats to experimental infection with *Bartonella henselae*.
Vet. Immunol. Immunopathol., 1999, 71, 3-4, 233-243.

GUPTILL L.
Bartonellosis.
Vet. Microbiol., 2010a, 140, 3-4, 347-359.

GUPTILL L.
Feline bartonellosis.
Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract., 2010b, 40, 1073-1090.

GURFIELD AN., BOULOUIS HJ., CHOMEL BB., HELLER R., KASTEN RW., YAMAMOTO K., PIEMONT Y.
Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different *Bartonella henselae* strains in domestic cats.
J. Clin. Microbiol., 1997, 35, 8, 2120-2123.

GUTIÉRREZ R., MORICK D., GROSS I., WINKLER R., ABDEEN Z., HARRUS S.
Bartonellae in domestic and stray cats from Israel: comparison of bacterial cultures and high-resolution melt real-time PCR as diagnostic methods.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2013, 13, 12, 857-864.

GUZMAN RF.
A survey of cats and dogs for fleas: with particular reference to their role as intermediate hosts of *Dipylidium caninum*.
NZ. Vet. J., 1984, 32, 5, 71-73.

HACKETT TB., JENSEN WA., LEHMAN TL., HOHENHAUS AE., CRAWFORD PC., GIGER U., LAPPIN MR.
Prevalence of DNA of *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Anaplasma phagocytophilum*, and species of *Bartonella*, *Neorickettsia*, and *Ehrlichia* in cats used as blood donors in the United States.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 2006, 229, 5, 700-705.

HALOS L., JAMAL T., MAILLARD R., GIRARD B., GUILLOT J., CHOMEL B., VAYSSIER-TAUSSAT M., BOULOUIS HJ.
Role of *Hippoboscidae* flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants.
Appl. Environ. Microbiol., 2004, 70, 10, 6302-6305.

HALOS L., JAMAL T., MAILLARD R., BEUGNET F., LE MENACH A., BOULOUIS HJ., VAYSSIER-TAUSSAT M.
Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia* sp.
Vet. Res., 2005, 36, 1, 79-87.

HELLER R., ARTOIS M., XEMAR V., DE BRIEL D., GEHIN H., JAULHAC B., MONTEIL H., PIEMONT Y.
Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats.
J. Clin. Microbiol., 1997, 35, 6, 1327-1331.

HELLMANN K., KNOPPE T., KRIEGER K., STANNECK D.
European multicenter field trial on the efficacy and s of a topical formulation of imidacloprid and permethrin (Advantix) in dogs naturally infested with ticks and/or fleas.
Par. Res., 2003, 90, S125-126.

HELLMANN K., ADLER K., PARKER L., PFISTER K., DELAY RL., RUGG D.
Evaluation of the efficacy and safety of a novel formulation of metaflumizone plus amitraz in dogs naturally infested with fleas and ticks in Europe.
Vet. Parasitol., 2007, 150, 3, 239-245.

HENDRIX LR.
Contact-dependent hemolytic activity distinct from deforming activity of *Bartonella bacilliformis.*
FEMS Microbiol. Lett., 2000, 2182, 119-124.

HENN JB., LIU CH., KASTEN RW., VANHORN BA., BECKETT LA., KASS PH., CHOMEL BB.
Seroprevalence of antibodies against *Bartonella* species and evaluation of risk factors and clinical signs associated with seropositivity in dogs.
Am. J. Vet. Res., 2005, 66, 4, 688-694.

HIGGINS JA., SACCI JB Jr, SCHRIEFER ME., ENDRIS RG., AZAD AF.
Molecular identification of *Rickettsia*-like microorganisms associated with colonized cat fleas (*Ctenocephalides felis*).
Insect. Mol. Biol., 1994, 3, 1, 27-33.

HIGGINS JA., RADULOVIC S., JAWORSKI DC., AZAD AF.
Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 1996, 33, 3, 490-495.

HII SF., KOPP SR., ABDAD MY., THOMPSON MF., O'LEARY CA., REES RL., TRAUB RJ.
Molecular evidence supports the role of dogs as potential reservoirs for *Rickettsia felis*.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2011a, 11, 8, 1007-10012.

HII SF., KOPP SR., THOMPSON MF., O'LEARY CA., REES RL., TRAUB RJ.
Molecular evidence of *Rickettsia felis* infection in dogs from Northern Territory, Australia.
Parasit Vectors, 2011b, 11 4:198. doi: 10.1186/1756-3305-4-198.

HII SF., ABDAD MY., KOPP SR., STENOS J., REES RL., TRAUB RJ.
Seroprevalence and risk factors for *Rickettsia felis* exposure in dogs from Southeast Queensland and the Northern Territory, Australia.
Parasit Vectors, 2013, 3, 6:159. doi: 10.1186/1756-3305-6-159.

HINKLE NC., KOEHLER PG., PATTERSON RS.
Host grooming efficiency for regulation of cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) populations.
J. Med. Entomol., 1998, 35, 3, 266-269.

HIRUNKANOKPUN S., THEPPARIT C., FOIL LD., MACALUSO KR.
Horizontal transmission of *Rickettsia felis* between cat fleas, *Ctenocephalides felis*.
Mol. Ecol. 2011, 20, 21, 4577-4586.

HOLZMER SJ., HAIR A., DRYDEN MW., YOUNG DR., CARTER L.
Efficacy of a novel formulation of metaflumizone for the control of fleas (*Ctenocephalides felis*) on cats.
Vet. Parasitol., 2007, 150, 3, 219-224.

HONG YS., KANG S., HAN M., GOBERT GN., JONES MK.
High quality RNA isolation from *Aedes aegypti* midguts using laser microdissection microscopy.
Parasit. Vectors, 2011, 4, 83. doi: 10.1186/1756-3305-4-83.

HOUPIKIAN P., RAOULT D.
Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge?
FEMS Microbiol. Lett., 2001, 200, 1), 1-7.

HOUPIKIAN P., RAOULT D.
Blood culture-negative endocarditis in a reference center: etiologic diagnosis of 348 cases.
Medicine, 2005, 84, 3, 162-173.

HUTCHINSON MJ., JACOBS DE., MENCKE N.
Establishment of the cat flea (*Ctenocephalides felis felis*) on the ferret (*Mustela putorius furo*) and its control with imidacloprid.
Med. Vet. Entomol., 2001, 15, 2, 212-214.

HUYNH T., THEAN J., MAINI R.
Dipetalonema reconditum in the human eye.
Br. J. Ophthalmol., 2001, 85, 11, 1391–1392.

INOUE K., MARUYAMA S., KABEYA H., KAWANAMI K., YANAI K., JITCHUM S., JITTAPARAPONG S.
Prevalence of *Bartonella* infection in cats and dogs in a metropolitan area, Thailand.
Epidemiol. Infect., 2009, 137, 11, 1568-1573.

ISHIDA C., TSUNEOKA H., IINO H., MURAKAMI K., INOKUMA H., OHNISHI T., TSUKAHARA M.
Bartonella henselae infection in domestic cat and dog fleas.
Kansenshogaku Zasshi., 2001, 75, 2, 133-136.

JACKSON LA., PERKINS BA., WENGER JD.
Cat-scratch disease in the United States: an analysis of three national databases.
Am. J. Public Health, 1993, 83, 12, 1707-1711.

JACOBS DE., HUTCHINSON MJ., KRIEGER KJ., BARDT D.
A novel approach to flea control on cats, using pyriproxyfen.
Vet. Rec., 1996, 139, 23, 559-561.

JACOBS DE., HUTCHINSON MJ., RYAN MG.
Control of flea populations in a simulated home environment model using lufenuron, imidacloprid or fipronil.
Med. Vet. Entomol., 2001, 15, 1, 73-77.

JACOMO V., KELLY PJ., RAOULT D.
Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate).
Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2002, 9, 1, 8-18.

JARRETT CO., DEAK E., ISHERWOOD KE., OYSTON PC., FISCHER ER., WHITNEY AR., KOBAYASHI SD., DELEO FR., HINNEBUSCH BJ.
Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector.
J. Infect. Dis., 2004, 190, 4, 783-792.

JOHN M., MATHEW SM., SEBASTIAN V., BISWAS J., RAMAN M.
Multiple live subconjunctival *Dipetalonema*: report of a case.
Indian J. Ophthalmol., 2012, 60, 3, 228-229.

JONES MK., RANDALL LM., MCMANUS DP., ENGWERDA CR.
Laser microdissection microscopy in parasitology: microscopes meet thermocyclers.
Trends Parasitol., 2004, 20, 11, 502-506.

KABEYA H., INOUE K., IZUMI Y., MORITA T., IMAI S., MARUYAMA S.
Bartonella species in wild rodents and fleas from them in Japan.
J. Vet. Med. Sci., 2011, 73, 12, 1561-1567.

KAEWMONGKOL G., KAEWMONGKOL S., FLEMING PA., ADAMS PJ., RYAN U., IRWIN PJ., FENWICK SG.
Zoonotic *Bartonella* species in fleas and blood from red foxes in Australia.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2011, 11, 12, 1549-1553.

KAISER PO., RIESS T., WAGNER CL., LINKE D., LUPAS AN., SCHWARZ H., RADDATZ G., SCHÄFER A., KEMPF VA.
The head of *Bartonella* adhesin A is crucial for host cell interaction of *Bartonella henselae*.
Cell. Microbiol., 2008, 10, 11, 2223-2234.

KAISER PO., RIESS T., O' ROURKE F., LINKE D., KEMPF VA.
Bartonella spp.: throwing light on uncommon human infections.
Int. J. Med. Microbiol., 2011, 1, 7-15.

KAMRANI A., PARREIRA VR., GREENWOOD J., PRESCOTT JF.
The prevalence of *Bartonella*, *Hemoplasma*, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario.
Can. J. Vet. Res., 2008, 72, 5, 411-419.

KAREM KL., PADDOCK CD., REGNERY RL.

Bartonella henselae, *B. quintana*, and *B. bacilliformis*: historical pathogens of emerging significance.
Microbes Infect., 2000, 2, 10, 1193-1205.

KELLY PJ., NIC EOGHAIN G., RAOULT D.
Antibodies reactive with *Bartonella henselae* and *Ehrlichia canis* in dogs from the communal lands of Zimbabwe.
J. S. Afr. Vet. Assoc., 2004, 75, 3, 116-120.

KELLY P., ROLAIN JM., RAOULT D.
Prevalence of human pathogens in cat and dog fleas in New Zealand.
N. Z. Med., 2005, 118, 1226, U1754.

KELLY P., ROLAIN JM., MAGGI R., SONTAKKE S., KEENE B., HUNTER S., LEPIDI H., BREITSCHWERDT KT., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella quintana endocarditis in dogs.
Emerg. Infect. Dis., 2006, 12, 12, 1869-1872.

KEMPF VA., VOLKMANN B., SCHALLER M., SANDER CA., ALITALO K., RIESS T., AUTENRIETH IB.
Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations.
Cell. Microbiol., 2001, 3, 9, 623-632.

KENNY MJ., BIRTLES RJ., DAY MJ., SHAW SE.
Rickettsia felis in the United Kingdom.
Emerg. Infect. Dis., 2003, 9, 8, 1023-1024.

KERNIF T., AISSI M., DOUMANDJI SE., CHOMEL BB., RAOULT D., BITAM I.
Molecular evidence of *Bartonella* infection in domestic dogs from Algeria, North Africa, by Polymerase Chain Reaction (PCR).
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2010, 83, 2, 298-300.

KERNIF T., PAROLA P., DAVOUST B., PLAIRE L., CABRE O., RAOULT D., ROLAIN JM.
Bartonella clarridgeiae in fleas, Tahiti, french Polynesia.
Emerg. Infect. Dis., 2011, 17, 9, 1773-1775.

KERNIF T., SOCOLOVSCHI C., WELLS K., LAKIM MB., INTHALAD S., SLESAK G., BOUDEBOUCH N., BEAUCOURNU JC., NEWTON PN., RAOULT D., PAROLA P.
Bartonella and *Rickettsia* in arthropods from the Lao PDR and from Borneo, Malaysia.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2012, 35, 1, 51-57.

KERNIF T., LEULMI H., SOCOLOVSCHI C., BERENGER JM., LEPIDI H., BITAM I., ROLAIN JM., RAOULT D., PAROLA P.
Acquisition and excretion of *Bartonella quintana* by the cat flea, *Ctenocephalides felis felis*.
Mol. Ecol., 2014. doi: 10.1111/mec.12663 [Epub ahead of print].

KILONBACK AC., GULY C., BERNATONIENE J., RAMANAN AV.
Unilateral neuroretinitis secondary to *Bartonella henselae* infection.

Arch. Dis. Child., 2014, 99, 1, 70.
KIM YS., SEO KW., LEE JH., CHOI EW., LEE HW., HWANG CY., SHIN, NS., YOUN HJ., YOUN HY.
Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats and dogs in Korea.
J. Vet. Sci., 2009, 10, 1, 85-87.

KITCHELL BE., FAN TM., KORDICK D., BREITSCHWERDT EB., WOLLENBERG G., LICHTENSTEIGER CA.
Peliosis hepatis in a dog infected with *Bartonella henselae*.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 2000, 216, 4, 519-523.

KLIMPEL S., HEUKELBACH J., POTHMANN D., RÜCKERT S.
Gastrointestinal and ectoparasites from urban stray dogs in Fortaleza (Brazil): high infection risk for Humans?
Parasitol. Res., 2010, 107, 3, 713-719.

KOEHLER JE., QUINN FD., BERGER TG., LEBOIT PE., TAPPERO JW.
Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis.
N. Engl. J. Med., 1992, 327, 23, 1625-1631.

KOEHLER JE., GLASER CA., TAPPERO JW.
Rochalimaea henselae infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir.
JAMA, 1994, 271, 531-535.

KOEHLER JE., CEDERBERG L.
Intra-abdominal mass associated with gastrointestinal hemorrhage: a new manifestation of bacillary angiomatosis.
Gastroenterology., 1995, 109, 6, 2011-2014.

KOEHLER JE., SANCHEZ MA., GARRIDO CS., WHITFELD MJ., CHEN FM., BERGER TG., RODRIGUEZ-BARRADAS MC., LEBOIT PE., TAPPERO JW.
Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis.
N. Engl. J. Med., 1997, 337, 26, 1876-1883.

KOEHLER JE., SANCHEZ MA., TYE S., GARRIDO-ROWLAND CS., CHEN FM., MAURER T., COOPER JL., OLSON JG., REINGOLD AL., HADLEY WK., REGNERY RR., TAPPERO JW.
Prevalence of *Bartonella* infection among human immunodeficiency virus-infected patients with fever.
Clin. Infect. Dis., 2003, 37, 4, 559-566.

KORDICK DL., BREITSCHWERDT EB.
Intraerythrocytic presence of *Bartonella henselae*.
J. Clin. Microbiol., 1995, 33, 6, 1655-1656.

KORDICK DL., WILSON KH., SEXTON DJ., HADFIELD TL., BERKHOFF HA., BREITSCHWERDT EB.
Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients.

J. Clin. Microbiol., 1995, 33, 12, 3245-3251.
KORDICK DL., BREITSCHWERDT EB.
Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats.
Am. J. Vet. Res., 1997, 58, 5, 492-497.

KORDICK DL., HILYARD EJ., HADFIELD TL., WILSON KH., STEIGERWALT AG., BRENNER DJ., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella clarridgeiae, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat-scratch disease).
J. Clin.Microbiol., 1997, 35, 7, 1813-1818.

KORDICK DL., BROWN TT., SHIN K., BREITSCHWERDT EB.
Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats.
J. Clin. Microbiol., 1999, 37, 5, 1536-1547.

KOSOY M., BAI Y., SHEFF K., MORWAY C., BAGGETT H., MALONEY SA., BOONMAR S., BHENGSRI S., DOWELL SF., SITDHIRASDR A., LERDTHUSNEE K., RICHARDSON J., PERUSKI LF.
Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2010, 82, 6, 1140-1145.

KOUTINAS AF., PAPAZAHARIADOU MG., RALLIS TS., TZIVARA NH., HIMONAS CA.
Flea species from dogs and cats in northern Greece: environmental and clinical implications.
Vet. Parasitol., 1995, 58, 1-2, 109-115.

KRAMER F., MENCKE N.
Flea biology and control.
Berlin: Springer-Verlag, 2001-192 p.

KRASNOV B.
Functional and evolutionary ecology of fleas: a model for ecological parasitology.
Cambridge: Cambridge University Press, 2008- 593p.

KRAUSE R., AUNER HW., DAXBÖCK F., MULABECIROVIC A., KREJS GJ., WENISCH C., REISINGER EC.
Monoclonal and biclonal gammopathy in two patients infected with *Bartonella henselae*.
Ann. Hematol., 2003, 82, 7, 455-457.

KUMASAKA K., ARASHIMA Y., YANAI M., HOSOKAWA N., KAWANO K.
Survey of veterinary professionals for antibodies to *Bartonella henselae* in Japan.
Rinsho Byori., 2001, 49, 9, 906-910.

KUMSA B., PAROLA P., RAOULT D., SOCOLOVSCHI C.
Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Bartonella henselae* in dog and cat fleas in central Oromia, Ethiopia.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2014, [Epub ahead of print].

KUSABA N., YOSHIDA H., SHIMOKAWA Y., SATA M.
Two cases of suspected *Bartonella henselae* infection from a dog.
Kansenshogaku Zasshi., 1999, 73, 9, 930-934.

LANG JD.
Rodent-flea-plague relationships at the higher elevations of San Diego County, California.
J. Vector Ecol., 2004, 29, 2, 236-247.

LA SCOLA B., DAVOUST B., BONI M., RAOULT D.
Lack of correlation between *Bartonella* DNA detection within fleas, serological results, and results of blood culture in a *Bartonella*-infected stray cat population.
Clin. Microbiol. Infect., 2002, 8, 6, 345-351.

LA VD., TRAN-HUNG L., ABOUDHARAM G., RAOULT D., DRANCOURT M.
Bartonella quintana in domestic cat.
Emerg. Infect. Dis., 2005, 11, 8, 1287-1289.

LAMPS LW., SCOTT MA.
Cat-scratch disease: historic, clinical, and pathologic perspectives.
Am. J. Clin. Pathol., 2004, 121, 71-80.

LAPPIN MR., BLACK JC.
Bartonella spp. infection as a possible cause of uveitis in a cat.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1999, 214, 8, 1205-1207.

LAPPIN MR., GRIFFIN B., BRUNT J., RILEY A., BURNEY D., HAWLEY J., BREWER MM., JENSEN WA.
Prevalence of *Bartonella* species, *Haemoplasma* species, *Ehrlichia* species, *Anaplasma Phagocytophilum*, and *Neorickettsia risticii* DNA in the blood of cats and their fleas in the United States.
J. Feline Med. Surg., 2006, 8, 2, 85-90.

LAPPIN MR., HAWLEY J.
Presence of *Bartonella* species and *Rickettsia* species DNA in the blood, oral cavity, skin and claw beds of cats in the United States.
Vet. Dermatol., 2009, 20, 5-6, 509-514.

LAPPIN MR., DAVIS WL., HAWLEY JR., BREWER M., MORRIS A., STANNECK D.
A flea and tick collar containing 10% imidacloprid and 4.5% flumethrin prevents flea transmission of *Bartonella henselae* in cats.
Parasit. Vectors, 2013, 6: 26.

LAUDISOIT A., LEIRS H., MAKUNDI RH., VAN DONGEN S., DAVIS S., NEERINCKX S., DECKERS J., LIBOIS R.
Plague and the human flea, Tanzania.
Emerg. Infect. Dis., 2007, 13, 5, 687-693.

LEWIS RE.
Siphonaptera.
Science, 1981, 212, 4497, 913-914.

LIDDELL PW, SPARKS MJ.
Murine typhus: endemic *Rickettsia* in Southwest Texas.
Clin. Lab. Sci., 2012, 25, 2, 81-87.

LIN, JW., CHEN CM., CHANG CC.
Unknown fever and back pain caused by *Bartonella henselae* in a veterinarian after a needle puncture: a case report and literature review.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2011, 11, 5, 589-591.

LINARDI PM., BOTELHO JR., CUNHA HC., MOREIRA N.
Ectoparasites of rodents of the urban region of Belo Horizonte, MG. I. Interaction between ectoparasites and hosts.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 1984, 79, 2, 239-247.

LINARDI PM., SANTOS JL.
Ctenocephalides felis felis vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species.
Rev. Bras. Parasitol. Vet., 2012, 21, 4, 345-354.

LIU M., FERRANDEZ Y., BOUHSIRA E., MONTEIL M., FRANC M., BOULOUIS HJ., BIVILLE F.
Heme binding proteins of *Bartonella henselae* are required when undergoing oxidative stress during cell and flea invasion.
PLoS One, 2012, 7, 10. e48408. doi: 10.1371/journal.pone.0048408.

LIU M., BOUHSIRA E., BOULOUIS HJ., BIVILLE F.
The *Bartonella henselae* SitABCD transporter is required for confronting oxidative stress during cell and flea invasion.
Res. Microbiol., 2013, 164, 8, 827-837.

LLEDÓ L., GEGÚNDEZ MI., SERRANO JL., SAZ JV., BELTRÁN M.
A sero-epidemiological study of *Rickettsia typhi* infection in dogs from Soria Province, central Spain.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 2003, 97, 8, 861-864.

MACALUSO KR., PORNWIROON W., POPOV VL., FOIL LD.
Identification of *Rickettsia felis* in the salivary glands of cat fleas.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2008, 8, 3, 391-396.

MACKENZIE RB.
Public health importance of rodents in South America.
Bull. World Health Organ., 1972, 47, 2, 161-169.

MAGGI RG., ERICSON M., MASCARELLI PE., BRADLEY JM., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella henselae bacteremia in a mother and son potentially associated with tick exposure.
Parasit. Vectors, 2013a, 6, 101. doi: 10.1186/1756-3305-6-101.

MAGGI RG., MASCARELLI PE., HAVENGA LN., NAIDOO V., BREITSCHWERDT EB.
Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian.

Parasit. Vectors, 6, 2013b, 103. doi: 10.1186/1756-3305-6-103.

MANCUSO M., JIANG L., CESARMAN E., ERICKSON D.
Multiplexed colorimetric detection of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus and *Bartonella* DNA using gold and silver nanoparticles.
Nanoscale, 2013, 5, 4, 1678-1686.

MANI I., MAGUIRE JH.
Small animal zoonoses and immuncompromised pet owners.
Top. Companion Anim. Med., 2009, 24, 4, 164-174.

MARCHIONDO AA., RINER JL., SONENSHINE DE., ROWE KF., SLUSSER JH.
Ovicidal and larvicidal modes of action of fenoxycarb against the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 1990, 27, 5, 913-921.

MARCHIONDO AA., HOLDSWORTH PA., FOURIE LJ., RUGG D., HELLMANN K., SNYDER DE., DRYDEN MW.
World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition: guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats.
Vet. Parasitol., 2013, 194, 1, 84-97.

MARGILETH AM., BAEHREN DF.
Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to *Bartonella clarridgeiae*: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD.
Clin. Infect. Dis., 1998, 27, 2, 353-357.

MARIGNAC G., BARRAT F., CHOMEL B., VAYSSIER-TAUSSAT M., GANDOIN C., BOUILLIN C., BOULOUIS HJ.
Murine model for *Bartonella birtlesii* infection: new aspects.
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2010, 33, 2, 95-107.

MÁRQUEZ FJ., MUNIAIN MA., PÉREZ JM., PACHÓN J.
Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe.
Emerg. Infect. Dis., 2002, 8, 1, 89-91.

MARQUEZ FJ., MILLAN J., RODRIGUEZ-LIEBANA JJ., GARCIA-EGEA I., MUNIAIN MA.
Detection and identification of *Bartonella* sp. in fleas from carnivorous mammals in Andalusia, Spain.
Med. Vet. Entomol., 2009, 23, 4, 393-398.

MARRUGAL A., CALLEJÓN R., DE ROJAS M., HALAJIAN A., CUTILLAS C.
Morphological, biometrical, and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions.
Parasitol Res., 2013, 112, 6, 2289-2298.

MARUYAMA S., NAKAMURA Y., KABEYA H., TANAKA S., SAKAI T., KATSUBE Y.
Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of

Bartonella henselae among pet cats in Japan.
J. Vet. Med. Sci., 2000, 62, 3, 273-279.

MARUYAMA S., SAKAI T., MORITA Y., TANAKA S., KABEYA H., BOONMAR S., POAPOLATHEP A., CHALARMCHAIKIT T., CHANG CC., KASTEN RW., CHOMEL BB., KATSUBE Y.
Prevalence of *Bartonella* species and 16s rRNA gene types of *Bartonella henselae* from domestic cats in Thailand.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2001, 65, 6, 783-787.

MASCARELLI PE., MAGGI RG., HOPKINS S., MOZAYENI BR., TRULL CL., BRADLEY JM., HEGARTY BC., BREITSCHWERDT EB.
Bartonella henselae infection in a family experiencing neurological and neurocognitive abnormalities after woodlouse hunter spider bites.
Parasit. Vectors, 2013, 6, 98. doi:10.1186/1756-3305-6-98.

MASSEI F., MESSINA F., GORI L., MACCHIA P., MAGGIORE G.
High prevalence of antibodies to *Bartonella henselae* among Italian children without evidence of cat-scratch disease.
Clin. Infect. Dis., 2004, 38, 1, 145-148.

MAURIN M., RAOULT D.
Bartonella (*Rochalimaea*) *quintana* infections.
Clin. Microbiol. Rev., 1996, 9, 3, 273-292.

MAYA-MONTEIRO CM., ALVES LR., PINHAL N., ABDALLA DS., OLIVEIRA PL.
HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role.
Insect. Biochem. Mol. Biol., 2004, 34, 1, 81-88.

MBA PA., MARIÉ JL., ROLAIN JM., DAVOUST B., BEAUCOURNU JC., RAOULT D., PAROLA P.
Rickettsia felis and *Bartonella henselae* in fleas from Lebanon.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2011, 11, 7, 991-992.

Mc CANN SF., ANNIS GD., SHAPIRO R., PIOTROWSKI DW., LAHM GP., LONG JK., LEE KC., HUGHES MM., MYERS BJ., GRISWOLD SM., REEVES BM., MARCH RW., SHARPE PL., LOWDER P., BARNETTE WE., WING KD.
The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides.
Pest Manag. Sci., 2001, 57, 2, 153-164.

MEDIANNIKOV O., DAVOUST B., CABRE O., ROLAIN JM., RAOUL D.
Bartonellae in animals and vectors in New Caledonia.
Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis., 2011, 34, 6, 497-501.

MENCKE N., VOBIS M., MEHLHORN H., HAESE JD., REHAGEN M., MANGOLD-GEHRING S., TRUYEN U.
Transmission of feline calicivirus via the cat flea (*Ctenocephalides felis*).
Parasitol. Res., 2009, 105, 1, 185-189.

MENIER K., LEJEUNE T., PLE F., BEAUCOURNU JC.

Infestation massive de veaux par la puce Ctenecephalides felis (Insecta- Siphonaptera) dans le Jura (France).
Rev. Med. Vet., 1997, 147, 7, 619-620.

MÉNIER K., BEAUCOURNU JC.
Taxonomic study of the genus *Ctenocephalides* Stiles & Collins, 1930 (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae) by using aedeagus characters.
J. Med. Entomol., 1998, 35, 5, 883-890.

MERTZ FP., YAO RC.
Saccharopolyspora spinosa sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 1990, 40, 1, 34-39

MESSICK JB.
New perspectives about hemotrophic *Mycoplasma* (formerly, *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* species) infections in dogs and cats.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 2003, 33, 6, 1453-1465.

MIKOLAJCZYK MG., O'REILLY KL.
Clinical disease in kittens inoculated with a pathogenic strain of *Bartonella henselae*.
Am. J. Vet. Res., 2000, 61, 4, 375-379.

MILLER RJ., BROCE AB., DRYDEN MW., THRONE JE.
Emergence, survival, and fecundity of adult cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) exposed as pupae to juvenile hormone mimics.
J. Med. Entomol., 1999, 36, 6, 776-779.

MINNICK MF., SAPPINGTON KN., SMITHERMAN LS., ANDERSSON SG., KARLBERG O., CARROLL JA.
Five-member gene family of *Bartonella quintana*.
Infect Immun. 2003 Feb;71(2):814-21.

MOKHTAR AS., TAY ST.
Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Bartonella henselae*, and *B. clarridgeiae* in fleas from domestic dogs and cats in Malaysia.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2011, 85, 5, 931-933.

MORICK D., KRASNOV BR., KHOKHLOVA IS., GOTTLIEB Y., HARRUS S.
Investigation of *Bartonella* acquisition and transmission in *Xenopsylla ramesis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae).
Mol. Ecol., 2011, 20, 13, 2864-2870.

MORICK D., KRASNOV BR., KHOKHLOVA IS., GUTIÉRREZ R., GOTTLIEB Y., HARRUS S.
Vertical nontransovarial transmission of *Bartonella* in fleas.
Mol. Ecol., 2013a, 22, 18, 4747-4752.

MORICK D., KRASNOV BR., KHOKHLOVA IS., GUTIÉRREZ R., FIELDEN LJ., GOTTLIEB Y., HARRUS S.
Effects of *Bartonella* spp. on flea feeding and reproductive performance.

Appl. Environ. Microbiol., 2013b, 79, 11, 3438-3443.

MOSALLANEJAD B., ALBORZI AR., KATVANDI N.
A survey on ectoparasite infestations in companion dogs of Ahvaz district, south-west of Iran.
J. Arthropod. Borne Dis., 2012, 6, 1, 70-78.

MULUNGU LS., NGOWO V., MDANGI M., KATAKWEBA AS., TESHA P., MROSSO FP., MCHOMVU M., SHEYO PM., KILONZO BS.
Population dynamics and breeding patterns of multimammate mouse, Mastomys natalensis (Smith 1834), in irrigated rice fields in eastern Tanzania.
Pest Manag. Sci., 2013, 69, 3, 371-377.

MURAKAMI K., TSUKAHARA M., TSUNEOKA H., IINO H., ISHIDA C., TSUJINO K., UMEDA A., FURUYA T., KAWAUCHI S., SASAKI K.
Cat-scratch disease: analysis of 130 seropositive cases.
J. Infect. Chemother., 2002, 8, 4, 349-352.

MURANO I., TSUNEOKA H., IINO H., KAMEI T., NAKAMURA I., TSUKAHARA M.
Two patients with *Bartonella henselae* infection from a dog.
Kansenshogaku Zasshi., 2001, 75, 9, 808-811.

MURPHY M., BALL CA., GROSS S.
Comparative in vivo adulticidal activity of a topical dinotefuran versus an imidacloprid-based formulation against cat fleas (*Ctenocephalides felis*) on cats.
Vet. Ther., 2009, 10, 1-2, 9-16.

NAJI M., CANTE V., CAMUS M., MONEGIER DU SORBIER C., GUILLET G.
An uncommon cutaneous presentation of cat scratch disease.
Ann. Dermatol. Venereol., 2013, 140, 10, 614-618.

NARAHASHI T., ZHAO X., IKEDA T., SALGADO VL., YEH JZ.
Glutamate-activated chloride channels: unique fipronil targets present in insects but not in mammals.
Pestic. Biochem. Physiol., 2010, 97, 2, 149-152.

NARASIMHAM MV., PANDA P., MOHANTY I., SAHU S., PADHI S., DASH M.
Dipylidium caninum infection in a child: a rare case report.
Indian J. Med. Microbiol. 2013, 31, 1, 82-84.

NEERINCKX SB., PETERSON AT., GULINCK H., DECKERS J., LEIRS H.
Geographic distribution and ecological niche of plague in sub-saharan Africa.
Int. J. Health Geogr., 2008, 7, 54. doi: 10.1186/1476-072X-7-54.

NEERINCKX S., BERTHERAT E., LEIRS H.
Human plague occurrences in Africa: an overview from 1877 to 2008.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 2010, 104, 2, 97-103.

NELDER MP., REEVES WK., ADLER PH., WOZNIAK A., WILLS W.
Ectoparasites and associated pathogens of free-roaming and captive animals in zoos of South Carolina.

Vector Borne Zoonotic Dis., 2009, 9, 5, 469-477.

NOAH DL., KRAMER CM., VERBSKY MP., ROONEY JA., SMITH KA., CHILDS JE.
Survey of veterinary professionals and other veterinary conference attendees for antibodies to *Bartonella henselae* and *B. quintana*.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1997, 210, 3, 342-344.

NODEN BH., RADULOVIC S., HIGGINS JA., AZAD AF.
Molecular identification of *Rickettsia typhi* and *R. felis* in co-infected *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 1998, 35, 4, 410-414.

NOGUCHI H., BATTISTINI TS.
Etiology of oroya fever: cultivation of *Bartonella bacilliformis*.
J. Exp. Med., 1926, 43, 6, 851-864.

NOGUERAS MM., PONS I., ORTUÑO A., SEGURA F.
Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in dogs from north-eastern spain.
Clin. Microbiol. Infect., 2009, 15, 2, 237-238.

NOGUERAS MM., PONS I., ORTUÑO A., MIRET J., PLA J., CASTELLÀ J., SEGURA F.
Molecular detection of *Rickettsia typhi* in cats and fleas.
PloS One, 2013a, 8, 8, e71386. doi: 10.1371/journal.pone.0071386.

NOGUERAS MM., PONS I., PLA J., ORTUÑO A., MIRET J., SANFELIU I., SEGURA F.
The role of dogs in the eco-epidemiology of *Rickettsia typhi*, etiological agent of murine typhus. Vet. Microbiol., 2013b, 163, 1-2, 97-102. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.043.

NOVACCO M., MELI ML., GENTILINI F., MARSILIO F., CECI C., PENNISI MG., LOMBARDO G., LLORET A., SANTOS L., CARRAPIÇO T., WILLI B., WOLF G., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R.
Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in mediterranean countries and analysis of risk factors for infection.
Vet. Microbiol., 2010, 142, 3-4, 276-284.

O' BRIEN RD.
Mode of action of insecticides, binding of organophosphates to cholinesterases.
J. Agric. Food Chem., 1963, 11, 2, 163-166.

O' REILLY KL., BAUER RW., FREELAND RL., FOIL LD., HUGHES KJ., ROHDE KR., ROY AF., STOUT RW., TRICHE PC.
Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU16).
Infect. Immun., 1999, 67, 6, 3066-3072.

OBASAJU MF., OTESILE EB.
Ctenocephalides canis infestation of sheep and goats.
Tropical Animal Health and Production, 1980, 12, 2, 116-118.

OHAD DG., MORICK D., AVIDOR B., HARRUS S.

Molecular detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella koehlerae* from aortic valves of Boxer dogs with infective endocarditis.
Vet. Microbiol., 2010, 141, 1-2, 182-185.

OLIVEIRA RP., GALVÃO MA., MAFRA CL., CHAMONE CB., CALIC SB., SILVA SU., WALKER DH.
Rickettsia felis in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil.
Emerg. Infect. Dis., 2002, 8, 3, 317-319.

ORLOSKI KA., EIDSON M.
Yersinia pestis infection in three dogs.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 1995, 207, 3, 316-318.

ORMEROD LD., SKOLNICK KA., MENOSKY MM., PAVAN PR., PON DM.
Retinal and choroidal manifestations of cat-scratch disease.
Ophthalmology, 1998, 105, 6, 1024-1031.

ORMEROD LD., DAILEY JP.
Ocular manifestations of cat-scratch disease.
Curr. Opin. Ophthalmol., 1999, 10, 3, 209-216.

OSKOUIZADEH K., ZAHRAEI-SALEHI T., ALEDAVOOD S.
Detection of *Bartonella henselae* in domestic cats' saliva.
Iran. J. Microbiol., 2010, 2, 2, 80-84.

OTRANTO, D., EBERHARD ML.
Zoonotic helminths affecting the human eye.
Parasit. Vectors, 2011, 4, 41. doi:10.1186/1756-3305-4-41.

PALMA KG., MEOLA SM., MEOLA RW.
Mode of action of pyriproxyfen and methoprene on eggs of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 1993, 30, 2, 421-426.

PAPPALARDO BL., CORREA MT., YORK CC., PEAT CY., BREITSCHWERDT EB.
Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs.
Am. J. Vet. Res., 1997, 58, 5, 467-471.

PAPPALARDO BL., BROWN T., GOOKIN JL., MORRILL CL., BREITSCHWERDT EB.
Granulomatous disease associated with *Bartonella* infection in 2 dogs.
J. Vet. Intern. Med., 2000, 14, 137-142.

PAROLA P., SANOGO OY., LERDTHUSNEE K., ZEAITER Z., CHAUVANCY G., GONZALEZ JP., MILLER RS., TELFORD SR., WONGSRICHANALAI C., RAOULT D.
Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in from the Thai-Myanmar border.
Ann. NY. Acad. Sci., 2003, 990, 173-181.

PENNINGTON NE., PHELPS CA.
Canine filariasis on Okinawa, Ryukyu islands.

J. Med. Entomol., 1969, 6, 1, 59-67.

PÉREZ C., MAGGI RG., DINIZ PP., BREITSCHWERDT EB.
Molecular and serological diagnosis of *Bartonella* infection in 61 dogs from the United States.
J. Vet. Intern. Med., 2011, 25, 4, 805-810.

PÉREZ-MARTÍNEZ L., VENZAL JM., GONZÁLEZ-ACUÑA D., PORTILLO A., BLANCO JR., OTEO JA.
Bartonella rochalimae and other *Bartonella* spp. in fleas, Chile.
Emerg. Infect. Dis., 2009, 15, 7, 1150-1152.

PERRY RD., FETHERSTON JD.
Yersinia pestis-etiologic agent of plague.
Clin. Microbiol. Rev., 1997, 10, 1, 35-66.

PLUMB DC.
Plumb's veterinary drug handbook (7th Edition).
Stockholm: Wiley- Blackwell, 2011-1187 p

PODSIADLY E., CHMIELEWSKI T., SOCHON E., TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA S.
Bartonella henselae in *Ixodes ricinus* ticks removed from dogs.
Vector. Borne Zoonotic Dis., 2007, 7, 2, 189-192.

PRÉLAUD P.
Allergologie canine.
Paris, Milan, Barcelone: Masson, 1999-150 p.

PSAROULAKI A., ANTONIOU M., PAPAEUSTATHIOU A., TOUMAZOS P., LOUKAIDES F., TSELENTIS Y.
First detection of *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* fleas parasitizing rats in Cyprus.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 2006, 74, 1, 120-122.

PULLIAINEN AT., DEHIO C.
Persistence of *Bartonella* spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation.
FEMS Microbiol. Rev., 2012, 36, 3, 563-599.

PUNG OJ., DURDEN LA., BANKS CW., JONES DN.
Ectoparasites of opossums and raccoons in southeastern Georgia.
J. Med. Entomol., 1994, 31, 6, 915-919.

QUIMBY JM., ELSTON T., HAWLEY J., BREWER M., MILLER A., LAPPIN MR.
Evaluation of the association of *Bartonella* species, feline herpesvirus 1, feline calicivirus, feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis.
J. Feline Med. Surg., 2008, 10, 1, 66-72.

RAOULT D., FOURNIER PE., DRANCOURT M., MARRIE TJ., ETIENNE J., COSSERAT J., CACOUB P., POINSIGNON Y., LECLERCQ P., SEFTON AM.

Diagnosis of 22 new cases of *Bartonella* endocarditis.
Ann. Intern. Med., 1996, 125, 8, 646-652.

RAOULT D., ROUX V.
Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases.
Clin. Microbiol. Rev., 1997, 10, 4, 694-719.

RAOULT D., NDIHOKUBWAYO JB., TISSOT-DUPONT H., ROUX V., FAUGERE B., ABEGBINNI R., BIRTLES RJ.
Outbreak of epidemic typhus associated with trench fever in Burundi.
Lancet, 1998, 352, 9125, 353-358.

RAOULT D., ROUX V.
The body louse as a vector of reemerging human diseases.
Clin. Infect. Dis., 1999, 29, 4, 888-911.

REEVES WK., NELDER MP., KORECKI JA.
Bartonella and *Rickettsia* in fleas and lice from mammals in South Carolina, U.S.A.
J. Vector Ecol., 2005, 30, 2, 310-315.

REEVES WK., NELDER MP., COBB KD., DASCH GA.
Bartonella spp. in deer keds, *Lipoptena mazamae* (Diptera: Hippoboscidae), from Georgia and South Carolina, USA.
J. Wildl. Dis., 2006, 42, 2, 391-396.

REGNERY RL., OLSON JG., PERKINS BA., BIBB W.
Serological response to *Rochalimaea henselae* antigen in suspected cat-scratch disease.
Lancet, 1992, 339, 8807, 1443-1445.

REIF KE., MACALUSO KR.
Ecology of *Rickettsia felis*: a review.
J. Med. Entomol., 2009, 46, 4, 723-736.

REIF KE., KEARNEY MT., FOIL LD., MACALUSO KR.
Acquisition of *Rickettsia felis* by cat fleas during feeding.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2011, 11, 7, 963-968.

REIS C., COTE M., LE RHUN D., LECUELLE B., LEVIN ML., VAYSSIER-TAUSSAT M., BONNET SI.
Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*.
PLoS Negl. Trop. Dis., 2011, 5, 5:e1186. doi: 10.1371/journal.pntd.0001186

RIBEIRO JM., ASSUMPÇÃO TC., MA D., ALVARENGA PH., PHAM VM., ANDERSEN JF., FRANCISCHETTI IM., MACALUSO KR.
An insight into the sialotranscriptome of the cat flea, *Ctenocephalides felis*.
PloS One, 2012, 7, 9, e44612. doi: 10.1371/journal.pone.0044612.

RICHTER J., FOURNIER PE., PETRIDOU J., HÄUSSINGER D., RAOULT D.
Rickettsia felis infection acquired in Europe and documented by Polymerase Chain Reaction.
Emerg. Infect. Dis., 2002, 8, 2, 207-208.

RIESS T., ANDERSSON SG., LUPAS A., SCHALLER M., SCHÄFER A., KYME P., MARTIN J., WÄLZLEIN JH., EHEHALT U., LINDROOS H., SCHIRLE M., NORDHEIM A., AUTENRIETH IB., KEMPF VA.
Bartonella adhesin a mediates a proangiogenic host cell response.
J. Exp. Med., 2004, 200, 10, 1267-1278.

RITZHAUPT LK., ROWAN TG., JONES RL., CRACKNELL VC., MURPHY MG., SHANKS DJ.
Evaluation of the comparative efficacy of selamectin against flea (*Ctenocephalides felis felis*) infestations on dogs and cats in simulated home environments.
Vet. Parasitol., 2002, 106, 2, 165-175.

ROBERTSON-PLOUCH C., BAKER KA., HOZAK RR., ZIMMERMANN AG., PARKS SC., HERR C., HART LM., JAY J., HUTCHENS DE., SNYDER DE.
Clinical field study of the safety and efficacy of spinosad chewable tablets for controlling fleas on dogs.
Vet. Ther., 2008, 9, 1, 26-36.

RODEN JA, WELLS DH, CHOMEL BB, KASTEN RW, KOEHLER JE.
Hemin binding protein C is found in outer membrane vesicles and protects *Bartonella henselae* against toxic concentrations of hemin.
Infect. Immun., 2012, 80, 3, 929-942.

ROLAIN JM., FOURNIER PE., RAOULT D., BONERANDI JJ.
First isolation and detection by immunofluorescence assay of *Bartonella ko*ehlerae in erythrocytes from a french cat.
J. Clin. Microbiol., 2003a, 41, 8, 4001-4002.

ROLAIN JM., FRANC M., DAVOUST B., RAOULT D.
Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in cat fleas, France.
Emerg. Infect. Dis., 2003b, 9, 3, 338-342.

ROLAIN JM., LOCATELLI C., CHABANNE L., DAVOUST B., RAOULT D.
Prevalence of *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence.
Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2004, 11, 2, 423-425.

ROLAIN JM., BOURRY O., DAVOUST B., RAOULT D.
Bartonella quintana and *Rickettsia felis* in Gabon.
Emerg. Infect. Dis., 2005, 11, 11, 1742-1744.

ROLAIN JM., VAYSSIER-TAUSSAT M., GIMENEZ G., ROBERT C., FOURNIER PE., RAOULT D.
Genome sequence of *Bartonella birtlesii*, a bacterium isolated from small rodents of the genus Apodemus.
J. Bacteriol., 2012, 194, 17, 4779. doi: 10.1128/JB.01044-12.

ROSS DH., ARTHER RG., VON SIMSON C., DOYLE V., DRYDEN MW.
Evaluation of the efficacy of topically administered imidacloprid + pyriproxyfen and orally

administered spinosad against cat fleas (*Ctenocephalides felis*): impact of treated dogs on flea life stages in a simulated home environment.
Parasit. Vectors, 2012, 5, 192. doi:10.1186/1756-3305-5-192.

ROTHSCHILD M., SCHLEIN Y., ITAO S.
A colour atlas of insect tissues via the flea.
Weert: Wolfe publishing Ltd, 1986-184 p.

RUDZIŃSKA M., SULGOSTOWSKA T.
Parasitic fleas in dogs from two Warsaw shelters, urban and suburban.
Wiad. Parazytol., 1996, 42, 2, 229-234.

RUST MK.
Influence of photoperiod on egg production of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) infesting cats.
J. Med. Entomol., 1992, 29, 2, 242-245.

RUST MK.
Interhost movement of adult cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 1994, 31, 3, 486-489.

RYDKINA EB., ROUX V., GAGUA EM., PREDTECHENSKI AB., TARASEVICH IV., RAOULT D.
Bartonella quintana in body lice collected from homeless persons in Russia.
Emerg. Infect. Dis., 1999, 5, 1, 176-178.

SACCI JB Jr., AGUIAR JC., LAU AO., HOFFMAN SL.
Laser capture microdissection and molecular analysis of *Plasmodium yoelii* liver-stage parasites.
Mol. Biochem. Parasitol., 2002, 119, 2, 285-289.

SACKAL C., LAUDISOIT A., KOSOY M., MASSUNG R., EREMEEVA ME., KARPATHY SE., VAN WYK K., GABITZSCH E., ZEIDNER NS.
Bartonella spp. and *Rickettsia felis* in fleas, Democratic Republic of Congo.
Emerg. Infect. Dis., 2008, 14, 12, 1972-1974.

SAENZ HL., ENGEL P., STOECKLI MC., LANZ C., RADDATZ G., VAYSSIER-TAUSSAT M., BIRTLES R., SCHUSTER SC., DEHIO C.
Genomic analysis of Bartonella identifies type IV secretion systems as host adaptability factors.
Nat. Genet., 2007, 39, 12, 1469-1476.

SAISONGKORH W., BARRASSI L., DAVOUST B., DE BROUCKER CA., RAOULT D., ROLAIN JM.
First isolation of *Bartonella bovis* from animals in french Guyana, South America.
Clin. Microbiol. Infect., 2009, 15, 124-126.

SANTOS R., CARDOSO O., RODRIGUES P., CARDOSO J., MACHADO J., AFONSO A., BACELLAR F., MARSTON E., PROENÇA R.
Bacillary angiomatosis by *Bartonella quintana* in an HIV-infected patient.

J. Am. Acad. Dermatol., 2000, 42, 2, 299-301.

SCHÖFFEL I., SCHEIN E., WITTSTADT U., HENTSCHE J.
Parasite fauna of red foxes in Berlin (West).
Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 1991, 104, 5, 153-157.

SCHRIEFER ME., SACCI Jr JB., TAYLOR JP., HIGGINS JA., AZAD AF.
Murine typhus: updated roles of multiple urban components and a second typhuslike *Rickettsia*.
J. Med. Entomol., 1994, 31, 5, 681-685.

SCHUELE G., BARNETT S., BAPST B., CAVALIERO T., LUEMPERT L., STREHLAU G., YOUNG DR., MORAN C., JUNQUERA.
The effect of water and shampooing on the efficacy of a pyriprole 12.5% topical solution against brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*) and cat flea (*Ctenocephalides felis*) infestations on dogs.
Vet. Parasitol., 2008, 151, 2-4, 300-311.

SCHÜLEIN R., SEUBERT A., GILLE C., LANZ C., HANSMANN Y., PIEMONT Y., DEHIO C.
Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*.
J. Exp. Med., 2001, 193, 9, 1077-1086.

SEMBLAT JP., SILVIE O., FRANETICH JF., HANNOUN L., ELING W., MAZIER D.
Laser capture microdissection of *Plasmodium falciparum* liver stages for mRNA analysis.
Mol. Biochem. Parasitol., 2002, 121, 2, 179-183.

SENEVIRATNA P., WEERASINGHE, ARIYADASA S.
Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*.
Res. Vet. Sci., 1973, 14, 1, 112-114.

SÈVE P., TURNER R., STANKOVIC K., PERARD L., BROUSSOLLE C.
Transient monoclonal gammopathy in a patient with *Bartonella quintana* endocarditis.
Am. J. Hematol., 2006, 81, 2, 115-117.

SHAW SE., KENNY MJ., TASKER S., BIRTLES RJ.
Pathogen carriage by the cat flea *Ctenocephalides felis* (Bouché) in the United Kingdom.
Vet. Microbiol., 2004, 102, 3-4, 183-188.

SHEPHERD AJ., HUMMITZSCH DE., LEMAN PA., HARTWIG EK.
Studies on plague in the eastern Cape Province of South Africa.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1983, 77, 6, 800-808.

SHOUKRY NM., EL-NAGGAR MH., DARWISH AB., SOLIMAN BA., EL-SAWAF BM.
Studies on rodents role as reservoir hosts of leishmaniasis with specical reference to their ectoparasites in Suez Governorate.
J. Egypt. Soc. Parasitol., 2006, 36, 1, 93-106.

SILAGHI C., KNAUS M., RAPTI D., SHUKULLARI E., PFISTER K., REHBEIN S.

Rickettsia felis and *Bartonella* spp. in fleas from cats in Albania.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2012, 12, 1, 76-77.

SILVER KS., SONG W., NOMURA Y., SALGADO VL., DONG K.
Mechanism of action of sodium channel blocker insecticides (SCBIs) on insect sodium channels.
Pestic. Biochem. Physiol., 2010, 97, 2, 87-92.

SILVERMAN J., APPEL AG.
Adult cat flea (Siphonaptera: Pulicidae) excretion of host blood proteins in relation to larval nutrition.
J. Med. Entomol., 1994, 31, 2, 265-271.

SILVERMAN J., RUST MK., REIERSON DA.
Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae).
J. Med. Entomol., 1981, 18, 1, 78–83.

SIMOND M., GODLEY ML., MOURIQUAND PD.
Paul-Louis Simond and his discovery of plague transmission by rat fleas: a centenary.
J. R. Soc. Med., 1998, 91, 2, 101-104.

SKERGET M., WENISCH C., DAXBOECK F., KRAUSE R., HABERL R., STUENZNER D.
Cat or dog ownership and seroprevalence of ehrlichiosis, Q fever, and cat-scratch disease.
Emerg. Infect. Dis., 2003, 9, 10, 1337-1340.

SLATER LN., WELCH DF., MIN KW.
Rochalimaea henselae causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis.
Arch. Intern. Med., 1992, 152, 3, 602-606.

SOLANO-GALLEGO L., BRADLEY J., HEGARTY B., SIGMON B., BREITSCHWERDT E.
Bartonella henselae IgG antibodies are prevalent in dogs from southeastern USA.
Vet. Res., 2004, 35, 5, 585-595.

SORVILLO FJ., GONDO B., EMMONS R., RYAN P., WATERMAN SH., TILZER A., ANDERSEN EM., MURRAY RA., BARR R.
A suburban focus of endemic typhus in Los Angeles county: association with seropositive domestic cats and opossums.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1993, 48, 2, 269-273.

SPACH DH., KANTER AS., DANIELS NA., NOWOWIEJSKI DJ., LARSON AM., SCHMIDT RA., SWAMINATHAN B., BRENNER DJ.
Bartonella (*Rochalimaea*) species as a cause of apparent ‘culture-negative’ endocarditis.
Clin. Infect. Dis., 1995a, 20, 4, 1044-1047.

SPACH DH., KANTER AS., DOUGHERTY MJ., LARSON AM., COYLE MB., BRENNER DJ., SWAMINATHAN B., MATAR GM., WELCH DF., ROOT RK., STAMM WE.
Bartonella (Rochalimaea) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism.

N. Engl. J. Med., 1995b, 332, 7, 424-428.

SPARKS TC., CROUSE GD., DURST G.
Natural products as insecticides: the biology, biochemistry and quantitative structure-activity relationships of spinosyns and spinosoids.
Pest. Manag. Sci., 2001, 57, 10, 896-905.

SRÉTER-LANCZ Z., TORNYAI K., SZÉLL Z., SRÉTER T., MÁRIALIGETI K.
Bartonella infections in fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and lack of *Bartonellae* in ticks (Acari: Ixodidae) from Hungary.
Folia Parasitol., 2006, 53, 4, 313-316.

STAPP P., SALKELD DJ., EISEN RJ., PAPPERT R., YOUNG J., CARTER LG., GAGE KL., TRIPP DW., ANTOLIN MF.
Exposure of small rodents to plague during epizootics in black-tailed prairie dogs.
J. Wildl. Dis., 2008, 44, 3, 724-730.

STEIN A., RAOULT D.
Return of trench fever.
Lancet, 1995, 345, 8947, 450-451.

STENSETH NC., ATSHABAR BB., BEGON M., BELMAIN SR., BERTHERAT E., CARNIEL E., GAGE KL., LEIRS H., RAHALISON L.
Plague: past, present, and future.
PLoS Med., 2008, 5, 1: e3. doi:10.1371/journal.pmed.0050003.

SUN J., LIU Q., LU L., DING G., GUO J., FU G., ZHANG J., MENG F., WU H., SONG X., REN D., LI D., GUO Y., WANG J., LI G., LIU J., LIN H.
Coinfection with four genera of bacteria (*Borrelia*, *Bartonella*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia*) in *Haemaphysalis longicornis* and *Ixodes sinensis* ticks from China.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2008, 8, 6, 791-795.

SYKES JE., BALL LM., BAILIFF NL., FRY MM.
Candidatus Mycoplasma haematoparvum, a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2005, 55, 1, 27-30.

SYKES JE., KITTLESON MD., PESAVENTO PA., BYRNE BA., MACDONALD KA., CHOMEL BB.
Evaluation of the relationship between causative organisms and clinical characteristics of infective endocarditis in dogs: 71 cases (1992-2005).
J. Am. Vet. Med. Assoc., 2006, 228, 11, 1723-1734.

SYKES JE.
Feline hemotropic mycoplasmas.
Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., 2010, 40, 6, 1157-1170.

TABAR MD., MAGGI RG., ALTET L., VILAFRANCA M., FRANCINO O., ROURA X.
Gammopathy in a spanish dog infected with *Bartonella henselae*.
J. Small Anim. Pract., 2011, 52, 4, 209-212.

TAPPERO JW., KOEHLER JE.
Images in clinical medicine. Bacillary angiomatosis or Kaposi's sarcoma?
NE. J. Med., 1997, 337, 26, 1888. doi:10.1056/NEJM199712253372605.

TAVASSOLI M., AHMADI A., IMANI A., AHMADIARA E., JAVADI S., HADIAN M.
Survey of flea infestation in dogs in different geographical regions of Iran.
Korean J. Parasitol., 2010, 48, 2, 145-149.
TAYLOR T., ZITZMANN MB.
Dipylidium caninum in a 4-month old male.
Clin. Lab. Sci., 2011, 24, 4, 212-214.

TEOH LS., HART HH., SOH MC., CHRISTIANSEN JP., BHALLY H., PHILIPS MS., RAI-CHAUDHURI DS.
Bartonella henselae aortic valve endocarditis mimicking systemic vasculitis.
BMJ Case Rep., 2010. doi: 10.1136/bcr.04.2010.2945.

THEPPARIT C., HIRUNKANOKPUN S., POPOV VL., FOIL LD., MACALUSO KR.
Dissemination of bloodmeal acquired *Rickettsia felis* in cat fleas, *Ctenocephalides felis*.
Parasit. Vectors, 2013, 6, 1, 149. doi:10.1186/1756-3305-6-149.

TIJSSE-KLASEN E., FONVILLE M., GASSNER F., NIJHOF AM., HOVIUS EK., JONGEJAN F., TAKKEN W., REIMERINK JR., OVERGAAUW PA., SPRONG H
Absence of zoonotic *Bartonella* species in questing ticks: first detection of *Bartonella clarridgeiae* and *Rickettsia felis* in cat fleas in the Netherlands.
Parasit. Vectors, 2011, 4, 61. doi:10.1186/1756-3305-4-61.

TRAVERSA D.
Fleas infesting pets in the era of emerging extra-intestinal nematodes.
Parasit Vectors, 2013, 7, 6:59. doi: 10.1186/1756-3305-6-59.

TSAI KH., HUANG CG., FANG CT., SHU PY., HUANG JH., WU WJ.
Prevalence of *Rickettsia felis* and the first identification of *Bartonella henselae* Fizz/CAL-1 in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from Taiwan.
J. Med. Entomol., 2011a, 48, 2, 445-452.

TSAI YL., CHANG CC., CHUANG ST., CHOMEL BB.
Bartonella species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host?
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis., 2011b, 34, 4, 299-314.

TSAI YL., LIN CC., CHOMEL BB., CHUANG ST., TSAI KH., WU WJ., HUANG CG., YU JC., SUNG MH., KASS PH., CHANG CC.
Bartonella infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites.
Vector Borne Zoonotic Dis., 2011c, 11, 8, 1023-1030.

UENO H., HOHDATSU T., MURAMATSU Y., KOYAMA H., MORITA C.
Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats?
Microbiol. Immunol., 1996, 40, 9, 617-620.

UGOCHUKWU EI., APEH AO.

Prevalence of ectoparasites of small ruminants in Nsukka, Nigeria.
Int. J. Zoonoses., 1985, 12, 4, 313-317.

VARAGNOL M., PAROLA P., JOUAN R., BEAUCOURNU JC., ROLAIN JM., RAOULT D.
First detection of *Rickettsia felis* and *Bartonella clarridgeiae* in fleas from Laos.
Clin. Microbiol. Infect., 2009, 15, 2, 334-335.

VAUGHAN JA., AZAD AF.
Patterns of erythrocyte digestion by bloodsucking insects: constraints on vector competence.
J. Med. Entomol., 1993, 30, 1, 214-216.

VERA CP., MAGGI RG., WOODS CW., MASCARELLI PE., BREITSCHWERDT EB.
Spontaneous onset of complex regional pain syndrome type I in a woman infected with *Bartonella koehlerae.*
Med. Microbiol. Immunol.., 2013. doi:10.1007/s00430-013-0320-3.

VOBIS M., D'HAESE J., MEHLHORN H., MENCKE N.
Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*).
Parasitol. Res., 2003, 91, 6, 467-470.

VOBIS M., D'HAESE J., MEHLHORN H., MENCKE N., BLAGBURN BL., BOND R., DENHOLM I., DRYDEN MW., PAYNE P., RUST MK., SCHROEDER I., VAUGHN MB., BLEDSOE D.
Molecular phylogeny of isolates of *Ctenocephalides felis* and related species based on analysis of ITS1, ITS2 and mitochondrial 16S rDNA sequences and random binding primers.
Parasitol Res., 2004, 94, 3, 219-226.

VOBIS M., D'HAESE J., MEHLHORN H., MENCKE N.
Experimental quantification of the feline leukaemia virus in the cat flea (*Ctenocephalides felis*) and its faeces.
Parasitol. Res., 2005, 97, 1, 102-106.

VOLFOVA V., HOSTOMSKA J., CERNY M., VOTYPKA J., VOLF P.
Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on *Leishmania* infection in mice. PLoS Negl. Trop. Dis., 2008, 2, 9, e294. doi:10.1371/journal.pntd.0000294.

WALL R., SHAW SE., PENALIGGON J.
The prevalence of flea species on cats and dogs in Ireland.
Med. Vet. Entomol., 1997, 11, 4, 404-406.

WANG C., MOUNT J., BUTLER J., GAO D., JUNG E., BLAGBURN BL., KALTENBOECK B.
Real-time PCR of the mammalian hydroxymethylbilane synthase (HMBS) gene for analysis of flea (*Ctenocephalides felis*) feeding patterns on dogs.
Parasit. Vectors, 2012, 5, 4. doi:10.1186/1756-3305-5-4.

WEDINCAMP J., FOIL LD.
Infection and seroconversion of cats exposed to cat fleas (*Ctenocephalides felis* Bouché)

infected with *Rickettsia felis*.
J. Vector Ecol., 2000, 25, 1, 123-126.

WEDINCAMP J., FOIL LD.
Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché).
J. Vect. Ecol., 2002, 27, 1, 96-101.

WELCH DF., PICKETT DA., SLATER LN., STEIGERWALT AG., BRENNER DJ.
Rochalimaea henselae sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis.
J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 2, 275-280.

WENZEL U., HEINE J., MENGEL H., ERDMANN F., SCHAPER R., HEINE S., DAUGSCHIESS A.
Efficacy of imidacloprid 10%/moxidectin 1% (Advocate/Advantage multi) against fleas (*Ctenocephalides felis felis*) on ferrets (*Mustela putorius furo*).
Parasitol. Res., 2008, 103, 1, 231-234.

WILKERSON MJ., BAGLADI-SWANSON M., WHEELER DW., FLOYD-HAWKINS K., CRAIG C., LEE KW., DRYDEN M.
The immunopathogenesis of flea allergy dermatitis in dogs, an experimental study.
Vet. Immunol. Immunopathol., 2004, 99, 3-4, 179-192.

WILLI B., NOVACCO M., MELI M., WOLF-JÄCKEL G., BORETTI F., WENGI N., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R.
Haemotropic mycoplasmas of cats and dogs: transmission, diagnosis, prevalence and importance in Europe.
Schweiz. Arch. Tierheilkd., 2010, 152, 5, 237-244.

WILLIAMS SG., SACCI JB., SCHRIEFER ME., ANDERSEN EM., FUJIOKA KK., SORVILLO FJ., BARR AR., AZAD AF.
Typhus and typhuslike *Rickettsiae* associated with opossums and their fleas in Los Angeles County, California.
J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 7, 1758-1762.

WING KD., SACHER M., KAGAYA Y., TSURUBUCHI Y., MULDERIG L., CONNAIR M., SCHNEE M.
Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects.
Crop Protection, 2000, 19, 8-10, 537-545.

WOLKEN S., FRANC M., BOUHSIRA E., WISEMAN S., HAYES B., SCHNITZLER B., JACOBS DE.
Evaluation of spinosad for the oral treatment and control of flea infestations on dogs in Europe.
Vet. Rec., 2012, 170, 4, 99. doi:10.1136/vr.100211.

WOODS JE., BREWER MM., HAWLEY JR., WISNEWSKI N., LAPPIN MR.
Evaluation of experimental transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats.
Am. J. Vet. Res., 2005, 66, 6, 1008-1012.

WOODS JE., WISNEWSKI N., LAPPIN MR.
Attempted transmission of *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Mycoplasma haemofelis* by feeding cats infected *Ctenocephalides felis*.
Am. J. Vet. Res., 2006, 67, 3, 494-497.

XHAXHIU D., KUSI I., RAPTI D., VISSER M., KNAUS M., LINDNER T., REHBEIN S.
Ectoparasites of dogs and cats in Albania.
Parasitol. Res., 2009, 105, 6, 1577-1587.

YAMAMOTO K., CHOMEL BB., KASTEN RW., HEW CM., WEBER DK., LEE WI., DROZ S., KOEHLER JE.
Experimental infection of domestic cats with *Bartonella koehlerae* and comparison of protein and DNA profiles with those of other *Bartonella* species infecting felines.
J. Clin. Microbiol., 2002, 40, 2, 466-474.

YAO KP., NGORAN KE., FRANC M.
Some ecological parameters of *Ctenocephalides felis strongylus* (Jordan, 1925) (Siphonaptera: Pulicidae).
Parasite, 2006, 13, 2, 159-164.

YERUHAM I., ROSEN S., HADANI A.
Mortality in calves, lambs and kids caused by severe infestation with the cat flea *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) in Israel.
Vet. Parasitol., 1989, 30, 4, 351-356.

YORE K, DIGANGI B., BREWER M., BALAKRISHNAN N., BREITSCHWERDT EB., LAPPIN M.
Flea species infesting dogs in Florida and *Bartonella* spp. prevalence rates.
Vet. Parasitol., 2014, 199, 3-4, 225-229.

YOUNG DR., JEANNIN PC., BOECKH A.
Efficacy of fipronil/(S)-methoprene combination spot-on for dogs against shed eggs, emerging and existing adult cat fleas (*Ctenocephalides felis*, Bouché).
Vet. Parasitol., 2004, 125, 3-4, 397-407.

ZAKSON-AIKEN, M., GREGORY LM., SHOOP WL.
Reproductive strategies of the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae): parthenogenesis and autogeny?
J. Med. Entomol., 1996, 33, 3, 395-397.

ZANGWILL KM., HAMILTON DH., PERKINS BA., REGNERY RL., PLIKAYTIS BD., HADLER JL., CARTTER ML., WENGER JD.
Cat-scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test.
N. Engl. J. Med., 1993, 329, 1,8-13.

ZAVALA-VELÁZQUEZ JE., ZAVALA-CASTRO JE., VADO-SOLÍS I., RUIZ-SOSA JA., MORON CG., BOUYER DH., WALKER DH.
Identification of *Ctenocephalides felis* fleas as a host of *Rickettsia felis*, the agent of a spotted fever rickettsiosis in Yucatań, Mexico.

Vector Borne Zoonotic Dis., 2002, 2, 2, 69-75.

ZENONE T.
Systemic *Bartonella henselae* infection in immunocompetent adult presenting as fever of unknown origin.
Case Reports in Medicine, 2011, 183937. doi:10.1155/2011/183937.

ANNEXE

Principe de la microdissection laser utilisant le système ARCTURUS XT LCM

La microdissection laser est une technique qui a pour but d'isoler des cellules ou des groupes de cellules à partir d'une coupe histologique, afin d'effectuer des analyses en biologie moléculaire (mise en évidence d'ADN, d'ARN ou de protéines) (Going et Lamb, 1996 ; Bertheau et al., 1998). Cette technique permet une sélection précise des tissus sans altération morphologique ou chimique de l'échantillon. Elle est adaptée à l'isolement de cellules uniques ou d'épithéliums, et elle permet de préserver l'intégrité des molécules extraites, en particulier les ARN et les ADN.

Principe (Espina et Lance, 2012) :

La microdissection laser se déroule en trois étapes : la visualisation des cellules d'intérêt par microscopie, le transfert d'énergie d'un faisceau laser (Infrarouge (IR) ou Ultra-violet (UV)) à un polymère thermosensible qui forme un complexe cellule-polymère, et le retrait de ce complexe de la coupe tissulaire (Figure 1). L'Arcturus modèle XT, que nous avons utilisé dans nos travaux, associe deux faisceaux laser : un faisceau UV-A pulsé de 355 nm de longueur d'ondes et un faisceau IR continu de 810 nm. Le statif de microscope est de type Nikon TIE équipé d'objectifs x2, x10, x20, x40. Les lames sur lesquelles sont disposées les coupes histologiques sont recouvertes sur toute leur surface d'une fine membrane en polyéthylène naphthalate (PEN) (1,36 µm d'épaisseur) qui n'adhère au verre qu'en périphérie. La partie centrale de la lame, sur laquelle est déposée l'échantillon, n'adhère pas au support en verre. Cette membrane permet un meilleur prélèvement des zones d'intérêt après leur découpage, en s'affranchissant de l'adhérence possible du microdisséquat à la lame. Des capsules recouvertes d'un polymère thermosensible transparent sont déposées sur la coupe à l'intérieur de l'appareil de microdissection (Figure 1). Le faisceau UV, qui est focalisé à travers les objectifs (x10, x20 ou x40), réalise un pré-découpage de la région ciblée en brûlant le tissu périphérique, et un découpage de la membrane de la lame PEN. Le faisceau IR traverse ensuite la capsule et fait fondre le polymère thermosensible qui vient adhérer aux zones découpées (Figure 1). Lorsque toutes les cellules sélectionnées ont été capturées, la capsule est soulevée de l'échantillon, emportant avec elle les cellules d'intérêt, alors que les tissus environnants restent sur la lame. La précision de la sélection est de l'ordre du micron (Emmert-Buck et al., 1996). Les capsules font ensuite office de bouchons de tubes Eppendorf de 500 µl contenant ici un tampon de lyse, permettant de solubiliser les tissus prélevés, et

d'initier la première étape de l'extraction d'ADN génomique. Les capsules peuvent être stockées à - 20°C en attendant d'être analysées.

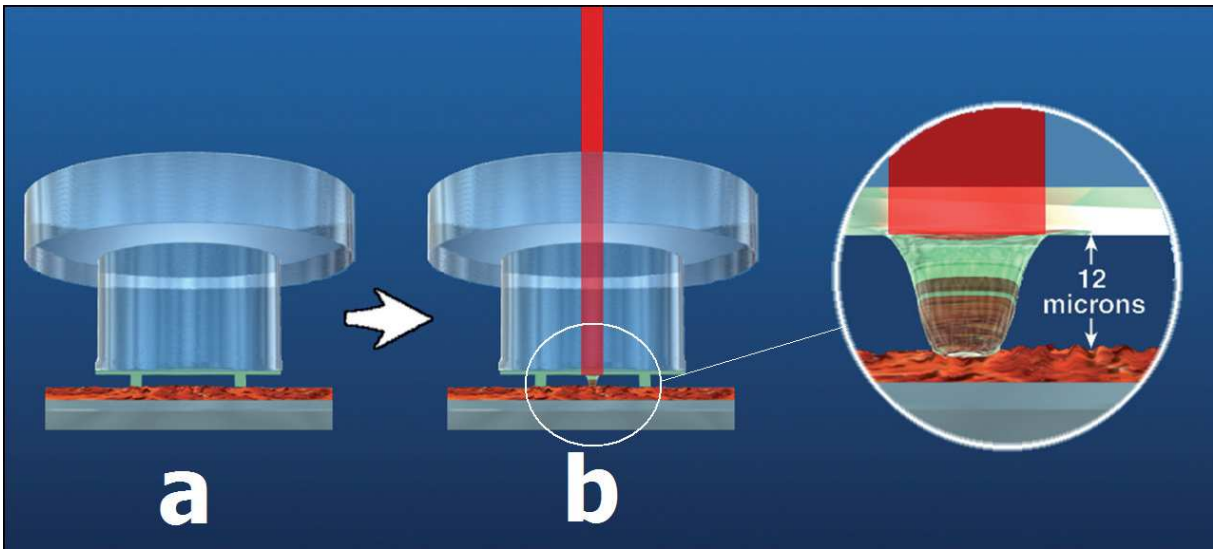


Figure 1. Système de microdissection laser (d'après Legrès et al., 2010).

a. La capsule recouverte d'un film thermosensible est posée au contact de la coupe histologique.
b. Le laser IR fait fondre la membrane de la capsule qui vient ainsi adhérer à la zone d'intérêt, prédécoupée par le rayon UV. Lorsque la capsule est retirée, les zones sélectionnées sont prélevées. Il n'y a pas de contamination des prélèvements avec les tissus environnants qui restent sur la lame.

Microdissection laser appliquée aux prélèvements d'organes chez *C. felis*

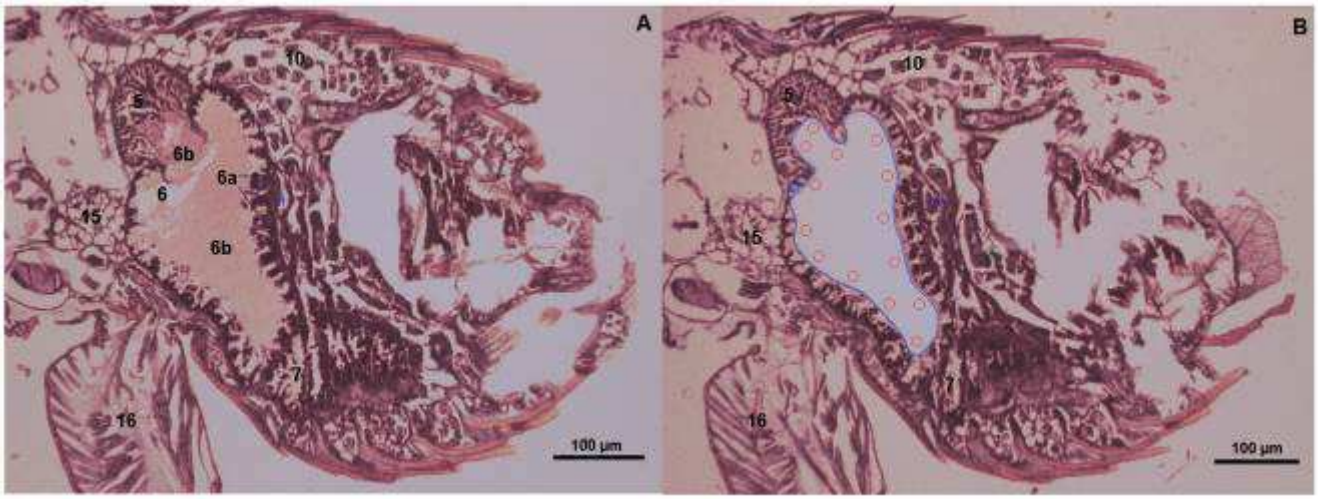


Figure 2. Microdissection laser du contenu digestif de *C. felis* (Photographies originales). Coupe histologique de l'abdomen d'une puce *C. felis* femelle gorgée (Coloration à l'hémalun, grossissement d'origine x400) avant microdissection (A) et après microdissection (B). Le laser coupe la membrane thermosensible et le tissu le long de la région délimitée par le tracé bleu. La zone tissulaire sélectionnée adhère ensuite à la membrane de la capsule permettant son prélèvement.

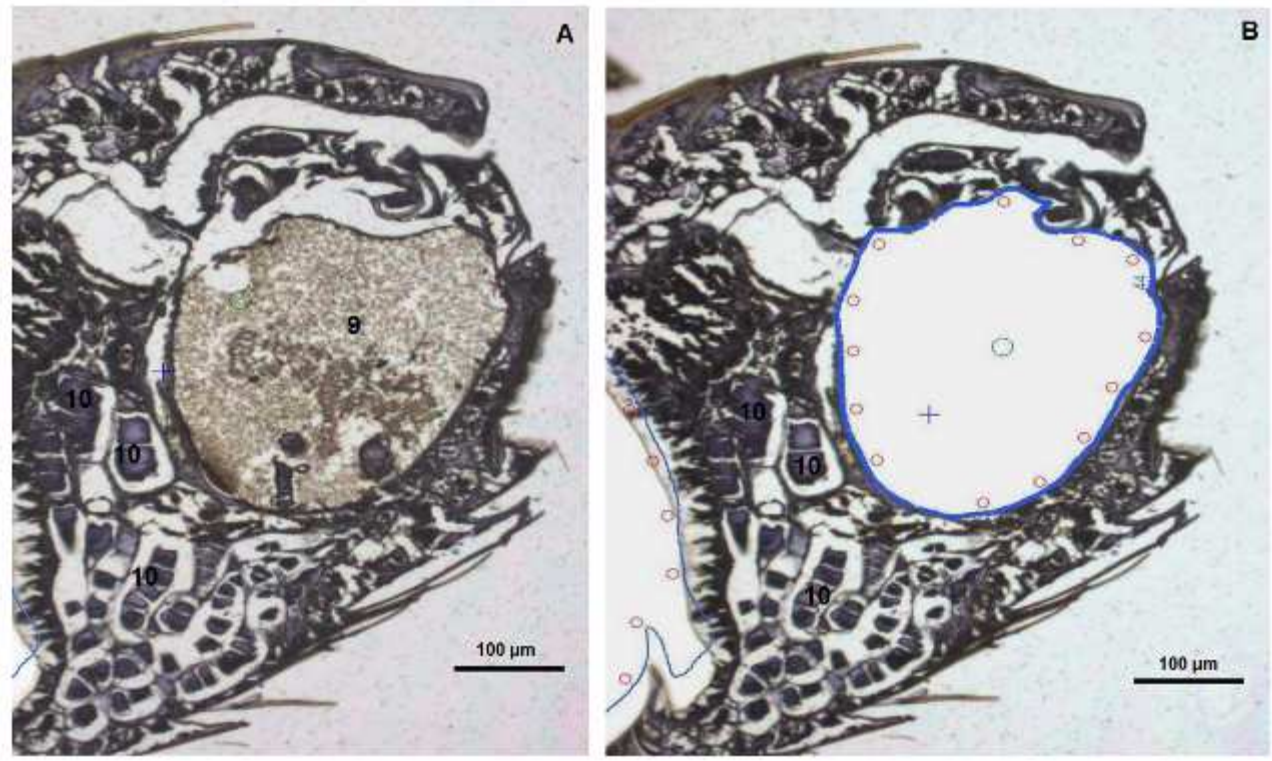


Figure 3. Microdissection laser de l'ampoule rectale de *C. felis* (Photographies originales). Coupe histologique de l'ampoule rectale contenant du sang digéré (fèces prêt à être excrété) d'une puce *C. felis* femelle (Coloration à l'hémalun, grossissement d'origine x400) avant microdissection (A) et après microdissection (B).

5= Proventricule, 6= Intestin moyen, 6a= Cellules épithéliales, 6b= sang digéré, 7= Intestin postérieur, 8= Glande rectale, 9= Ampoule rectale, 10= Ovarioles.

Emilie BOUHSIRA

Title: Role of *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) [Siphonaptera: Pulicidae] in the transmission of *Bartonella* spp. and control.

Ph.D. thesis : INP de Toulouse : Parasitology : 2014.

Abstract

Ctenocephalides felis is a cosmopolitan flea species mainly parasitizing pets, transmitting several pathogens of veterinary and zoonotic importance including the facultative intracellular bacteria of the genus *Bartonella*. The vector competence of this flea was investigated for *B. henselae*, *B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. tribocorum* and *B. birtlesii,* using an artificial feeding system. In these experimental conditions, these bartonellae proved to persist for three days, in a first study, while *B. henselae* persisted for the 13 days of its life span, in a second study. All five bartonellae were excreted in the flea's faeces. On the whole, these five species were not transmitted transovarially in the fleas, though horizontal transmission was suggested. Furthermore, we propose an original protocol allowing the evaluation of the efficacy of ectoparasiticidal products against *Bartonella* spp. infection in cats.

Key words: *Ctenocephalides canis*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana,* vector, artificial feeding system, insecticides, flea control.

Ph.D. thesis supervisor: Pr Michel FRANC
Ph.D thesis co-supervisor**:** Dr Emmanuel LIENARD
Laboratoire de Parasitologie et Maladies Parasitaires, INP-ENVT, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France.