

République Algérienne
Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement
Supérieur et la Recherche
Scientifique
Ecole Nationale Supérieure
Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Magister
Option : Épidémiologie des maladies animales
Et santé publique

Thème :

***Cryptosporidium* chez les caprins dans la région de
Bouira :
Aspects diagnostiques et épidémiologiques**

Présenté par : BEDJAOUI Samia

Les membres du jury :

Président : Dr TENNAH Safia..... Maitre de conférences A- ENSV

Examineur : Pr TRIKI YAMANI R.R....Professeur –Université Blida1

Examineur : Dr HAFSI Fella..... Maitre de conférences A- ENSV

Promoteur : Pr GHALMI Farida.....Professeur -ENSV

CO promoteur : Dr BAROUDI Djamel.....Maitre de conférences B-ENSV

Année universitaire : 2016/2017

DéDicace

Je dédie ce travail

A mes parents, qui m'ont toujours encouragé dans le choix de mes études

A mon très cher père

Qui m'a guidé jusqu'à aujourd'hui et qui a toujours été présent pour moi

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour toi

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A ma très chère mère

Le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du sacrifice qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.

Puisse DIEU, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes très chères sœurs : Nassima, Fadila, Faiza et Karima

Qui ont su me supporter et qui ont toujours été présentes quand j'en avais besoin, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A tous les membres de ma famille

A Nadjia et Mr SALMI de la faculté d'architecture de Blida

Que je ne remercierai jamais assez.

Merci pour tous ce que vous avez fait pour moi

A tous ceux cités précédemment, et à tous les autres, parce qu'on ne dit jamais assez à ceux qu'on aime combien on tient à eux...

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu DIEU de m'avoir donné le courage et la force pour réaliser ce modeste travail.

A madame le professeur GHALMI.F :

Pour sa patience, son soutien inestimable et pour le temps qu'elle m'a consacré.

A Monsieur le docteur BAROUDI. D

Pour son aide précieuse, ses orientations et sa bonne humeur tout au long de ce travail.

Sincère remerciement

Je tiens à remercier le Dr TENNAH Safia qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence u jury de cette thèse

Hommage respectueux

Mes sincères remerciements vont au Professeur TRIKI YAMANI R.R pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de ce jury de thèse

Sincère reconnaissance

Je remercie cordialement le Dr HAFSI.F

Vous me faites un grand honneur en acceptant de prendre part au présent jury.

Sincère gratitude.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail

Au laboratoire

A Ami Ahmed pour son aide, sa patience et sa disponibilité.

Aux techniciens de L.A.M de C.H.U de Béjaia en particulier Ami Brahim pour leur aide inconditionnelle

Je remercie tout particulièrement ma très chère sœur Dr. Fadila pour sa participation, sa disponibilité et son soutien.

Je remercie vivement le Dr Hansali et le Dr Djamila de la DSA de Bouira toujours prêts à rendre service

J'adresse mes plus sincères remerciements aux éleveurs de

- La région d'El Adjiba
- La région d'Ouled Rached
- La région de Taguedit.
- La région d'Ain Laloui.
- La région de Dechmia.

Pour leur implication, leur disponibilité et leur accueil tout au long de ce travail
Sincères remerciements.

Je remercie cordialement ceux qui ont contribué de près ou de loin à
l'élaboration de ce travail et à tous ceux que nous avons peut-être oublié.

RESUME

La cryptosporidiose est une protozoose à répartition mondiale.

Le caprin, et particulièrement le jeune, est considéré comme l'espèce la plus sensible, avec des fréquences accrues de morbidité (80%) et de mortalité (>50%).

L'objectif de ce travail a été d'évaluer la prévalence de cette parasitose chez les caprins dans la région de Bouira ainsi que les facteurs de risque susceptibles de favoriser l'infection par *Cryptosporidium spp*.

Un total de 171 prélèvements de matières fécales a été récolté entre septembre 2016 et janvier 2017 sur des caprins âgés de 15j à 24 mois au sein de vingt-sept (27) élevages répartis sur cinq (5) communes de la wilaya de Bouira.

Deux méthodes de diagnostic ont été utilisées pour la mise en évidence de *Cryptosporidium spp* ou de ses antigènes, à savoir, la coloration de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz et la technique copro-ELISA.

Des prévalences de 36.26% et de 38% ont été obtenues par la coloration ZNM et la copro-ELISA respectivement.

L'analyse des facteurs de risque susceptibles d'influencer les prévalences vis-à-vis du parasite a montré que l'âge ou encore l'état d'hygiène dans les élevages pouvaient être considérés comme des facteurs potentiels favorisant l'infestation par *Cryptosporidium spp*.

Enfin, notre travail a montré que la méthode de coloration ZNM a présenté une bonne performance pour le diagnostic de l'infection par *Cryptosporidium spp*, ce qui permet de la recommander à l'état actuel de nos connaissances comme un outil suffisant et efficace dans le diagnostic de cette infection.

Mots clés : *Cryptosporidium spp*, prévalence, facteurs de risque, caprins, matières fécales, Bouira, copro-ELISA, coloration de ZNM.

ABSTRACT

Cryptosporidium is a globally distributed protozoan

Goats, particularly young, is considered the most sensitive species, with increased morbidity (80%) and mortality (>50%) rates.

The objective of this work was to evaluate the prevalence of this parasitosis in goats in the Bouira region as well as the risk factors that may favor the infection by *Cryptosporidium* spp.

This is why 171 samples of faecal matter were taken between September 2016 and January 2017 in goats aged 15 to 24 months in twenty-seven (27) farms distributed over five (5) communes of the wilaya of Bouira

Two techniques were used in this study for the detection of *cryptosporidium* spp, a modified Ziehl-Neelsen stain and detection of cryposporidia antigens by copro-ELISA which revealed a prevalence of 36.26% and 38 % respectively.

The analysis of the risk factors, which may influence the prevalence of the parasite studied, showed the role of age and the hygienic state of the farms on infection by this parasite.

In our work we observed that young goats less than 4 months old showed the highest prevalence which in agreement with the main publications on goat cryptosporidiosis.

Finally, an essential point emphasized by our work is that the modified Ziehl-Neelsen stain has presented a good performance for the diagnosis of cryptosporidiosis.

This observation may allow us to advocate that it alone may constitute a in the present state a sufficient and effective diagnostic tool.

Keywords : *Cryptosporidium* spp., prevalence, risk factors, goats, faecal matter, Bouira, modified Ziehl-Neelsenstain, by copro-ELISA

ملخص

كربتوسبورديديوس مرض طفيلي بتوزيع عالمي.

يعتبر الماعز، وخاصة الجدي، الحيوان الأكثر إصابة بهذا المرض مع ارتفاع في معدل الاعتلال (80%) والوفيات (<50%).

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم مدى انتشار هذا المرض في الماعز في منطقة البويرة فضلا عن عوامل الخطر التي تشجع الإصابة بالكربتوسبورديديوم.

تم جمع ما مجموعه 171 عينة من براز الحيوانات بين سبتمبر 2016 و جانفي 2017 على الماعز تتراوح أعمارهم بين 15 يوما إلى 24 شهرا في سبعة وعشرين (27) مزرعة موزعة على خمس (5) بلديات في ولاية البويرة.

استخدمت طريقتين تشخيصيتين للكشف عن الكربتوسبورديديوم أو مولد الضد و هي طريقة Ziehl neelsen

copro-ELISA و modifiée

وقد تم الحصول على نسبة مئوية لانتشار المرض عند الماعز تتمثل في 36.26% و 38% عن طريق التلوين ب ZNM و copro-ELISA على التوالي.

تحليل عوامل الخطر التي قد تؤثر في انتشار هذا الطفيل أظهرت أن العمر أو حالة النظافة في المزارع يمكن اعتبارها العوامل الرئيسية التي تزيد في احتمال الإصابة بالكربتوسبورديديوم.

في الأخير، أظهرت دراستنا أن طريقة التشخيص ب ZNM قد أعطت فعالية جيدة لتشخيص العدوى بهذا الطفيل، و هذا ما يسمح لنا بالنصح بها في حدود معارفنا في الحالة الراهنة كأداة كافية وفعالة في تشخيص هذا المرض.

الكلمات المفتاحية :

كربتوسبورديديوم، النسبة المئوية، عوامل الخطر، الماعز، البراز، البويرة. ZNM , copro-ELISA

Liste des abréviations

- **ARNr18s** : sous unité ribosomique de l'acide nucléique
- **C** : *Cryptosporidium*
- **C°** : degré Celsius
- **CD4** : cluster de différenciation 4 (glycoprotéine exprimée à la surface des lymphocytes T)
- **DSA** : Direction des services agricoles
- **DMI** : dose infectante minimale
- **E.coli** : Escherichia coli
- **ELISA** : Enzyme linked immunosorbent assay
- **FAE** : Formaline acétate d'éthyle
- **FE** : Formaline éther
- **FITC** : l'isothiocyanate de fluorescéine
- **g**: gramme
- **IC** : immunochromatographie
- **IC** : Intervalle de confiance
- **ICZN** : International code of zoological nomenclature
- **IF** : Immunofluorescence
- **N** : Taille d'échantillon
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **pH** : potentiel Hydrogène
- **SIDA** : syndrome d'immunodéficience acquise
- **TMB** : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
- **µm** : Micromètre
- **UV** : Ultra violet
- **VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine
- **X²** : Test statistique de khi 2

- **ZNM** : coloration de Ziehl Neelsen modifiée
- **ZnSO₄** : Sulfate de Zinc

Liste des tableaux

Tableau1 : Classification taxonomique de <i>Cryptosporidium spp.</i>	4
Tableau2 : Liste des espèces de <i>Cryptosporidium spp</i>	5
Tableau3 : Nombre d'élevages visités repartis sur les cinq communes	35
Tableau4 : Les tranches d'âge retrouvées dans les élevages visités	36
Tableau5 : Les paramètres de l'analyse statistique de facteurs de risque	46
Tableau6 : Comparaison des deux méthodes (coloration ZNM et le test copro- ELISA)	50
Tableau7 : Paramètre de la comparaison des deux techniques	50

Liste des figures

Figure1 : Cycle biologique de <i>Cryptosporidium spp.</i> D'après Smith et al 2007	12
Figure2 : identification de <i>Cryptosporidium</i> révélée par la technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz	25
Figure3 : Oocystes de <i>Cryptosporidium spp</i> observés en immunofluorescence (X400).	26
Figure4 : Limites géographiques de la wilaya de Bouira	33
Figure5 : Localisation géographique des territoires visités dans la wilaya de Bouira	34
Figure6 : Répartition des animaux en fonction de l'âge	36
Figure7 : Mise en évidence des oocystes de <i>Cryptosporidium spp</i> par coloration de Ziehl Neelsen modifiée	43
Figure8 : Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i> par la technique de Ziehl Neelsen modifiée.	44
Figure 9 : Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i> par le test copro-ELISA	45
Figure 10 : Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i> en fonction du sexe de l'animal	47
Figure 11 : Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i> en fonction de la race	48
Figure 12 : Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i> en fonction de l'âge	48
Figure 13 : Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i> selon l'état d'hygiène	49

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
-------------------	---

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Cryptosporidium spp

I. Historique.....	2
II. Étude de parasite.....	3
1. Taxonomie.....	3
2. Espèces parasitaires.....	4
3. Spécificité d'hôte.....	7
4. Espèces présentes.....	7
Chez l'homme.....	7
Chez les caprins.....	8
5. Localisation.....	8
6. Biologie du parasite.....	9
A. Cycle évolutif.....	9
a. Développement chez l'hôte.....	9
b. Dissémination d'oocystes dans l'environnement.....	10
B. Caractères morphologiques de <i>Cryptosporidium spp</i>	12

La cryptosporidiose

III. Épidémiologie.....	14
1. Répartition géographique.....	14
2. Réceptivité et sensibilité.....	14
3. Source de contamination.....	15
4. Mode de transmission et la dose infectante.....	16
5. Prévalence de la cryptosporidiose.....	17
Chez l'homme.....	17
Chez les caprins.....	17
IV. Pathogénie.....	18
1. Pouvoir pathogène.....	18

2. Pouvoir immunogène.....	19
V. Clinique.....	19
La cryptosporidiose humaine.....	19
La cryptosporidiose chez les ruminants.....	21
VI. Lésions.....	22
VIII. Diagnostic.....	22
1. Epidémio-clinique.....	22
2. Diagnostic différentiel.....	23
3. Expérimental.....	23
A. Mise en évidence des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> spp...	23
a. Techniques de concentration.....	23
b. Techniques de coloration.....	24
c. Méthodes immunologiques.....	25
B. Biologie moléculaire.....	27
IX. Méthode de lutte chez l'homme et le caprin.....	29
1. Traitement.....	29
1.1. Traitements spécifiques.....	29
1.2. Traitements symptomatiques.....	29
2. Prophylaxie.....	30
2.1. Sanitaire.....	30
2.2 Médicale.....	31
CONTEXTE EXPERIMENTAL	
Objectif.....	32
I. Cadre de l'étude.....	32
1. Description de la région étudiée.....	32
2. Description de l'élevage caprin prélevé.....	33
II. Matériels et méthodes.....	35
A. Animaux.....	35

1. Critère d'inclusion et d'exclusion.....	35
2. Renseignements sur les élevages	37
a. Conduite d'élevage.....	37
b. Matériels Utilisés.....	38
1. Matériels utilisés pour la réalisation des prélèvements ...	38
2. Matériels utilisés pour la coproscopie.....	39
1) Technique d'enrichissement : technique de Ritchie simplifiée.....	39
2) Coloration de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz.....	39
3. Matériels utilisés pour le test ELISA.....	39
B. Méthode de prélèvement et d'analyse.....	40
I. Méthode de prélèvement.....	40
II. Méthodes utilisées.....	40
a. Choix de la méthode.....	40
1) Technique de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley....	41
2) Technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz.....	41
3) Test ELISA en sandwich.....	41
4) Analyses statistiques.....	42
III. Résultats.....	43
1. Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i>	43
a. Prévalence de <i>Cryptosporidium spp</i> par la technique de Ziehl Neelsen.....	43
b. Prévalence de cryptosporidium spp par le test copro- ELISA.....	44
2. Analyse des facteurs de risque de l'infection par <i>Cryptosporidium spp</i>	45

3. Comparaison des deux méthodes (coloration de ZNM et copro- ELISA) pour le diagnostic de <i>Cryptosporidium spp</i>	49
IV. Discussion.....	51
1. Analyse critique.....	51
a. Protocole.....	51
❖ Echantillonnage.....	51
❖ Choix de méthode de détection de <i>Cryptosporidium spp.</i> ..	52
b. Etude des facteurs de risque liés à la prévalence vis-à-vis de <i>Cryptosporidium spp</i>	53
❖ Sexe.....	53
❖ Race.....	53
❖ Age.....	53
❖ Conditions d'hygiène.....	54
V. Conclusion et perspectives.....	55

Introduction

La cryptosporidiose est une infection parasitaire due à un protozoaire du genre *Cryptosporidium*, ubiquiste parasitant essentiellement les épithéliums des voies digestives d'un grand nombre de vertébrés, y compris l'homme (O'Donoghue, 1995). Chez les ruminants, la maladie se manifeste principalement par des symptômes digestifs.

Cette parasitose est à l'origine d'importantes pertes économiques en élevages caprins du fait de l'atteinte intestinale entraînant des retards de croissance et des diarrhées.

Les chevreaux âgés de 5 à 21 jours sont particulièrement sensibles à cette maladie diarrhéique, avec une morbidité élevée et une mortalité pouvant atteindre 80% (Chartier, 1999).

La cryptosporidiose peut être théoriquement prévenue en élevage par des mesures d'hygiène très strictes. Cependant, du fait d'une grande résistance des oocystes dans l'environnement, la transmission ne peut être totalement contrôlée.

En matière de santé publique, l'importance de la cryptosporidiose n'est pas moindre. En effet, c'est une zoonose qui affecte principalement et gravement les personnes immunodéprimées, il est donc indispensable de pouvoir distinguer les différentes espèces circulantes afin de mieux appréhender les facteurs de risques propres à chaque agent pathogène et les interactions entre les populations humaines et animales.

De nos jours, la détection et l'identification des espèces du genre *Cryptosporidium* sont en constante évolution notamment par l'apport des outils de biologie moléculaire.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la prévalence de cryptosporidiose dans la région de Bouira ainsi que les facteurs de risques associés à l'infection par ce parasite.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Cryptosporidium spp

I. Historique

Tout d'abord *Cryptosporidium* fut décrit pour la première fois dans les glandes gastriques d'une souris de laboratoire (*Mus musculus*) par Ernest Edward Tyzzer en 1907, il le nomma en 1910 *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1910).

En 1912, Tyzzer observa, une nouvelle espèce, dans l'intestin grêle d'une souris : *C. parvum*.

Cryptosporidium fut longtemps considéré comme spécifique d'hôte et non pathogène.

En 1955, la première association entre la présence du parasite et signes cliniques fut établie. En effet, Slavin décrit *C. meleagridis* comme responsable de diarrhée dans un élevage de dindons (Slavin, 1955).

Dans les années 70, Panciera et al attribuent la diarrhée d'une génisse de 8 mois, aux cryptosporidies.

Ce parasite fut reconnu par les vétérinaires comme étant responsable d'épizooties de diarrhées pouvant être mortelles dans les élevages de jeunes veaux (Panciera et al., 1971) mais il fallut attendre les années 80 pour que leur pouvoir pathogène propre soit reconnu.

Chez l'homme, leur présence fut signalée en 1976, deux cas ont été diagnostiqués : le premier cas chez un enfant de trois ans immunocompétent vivant en zone rurale présentant une gastroentérite (Nime et al., 1976) et le second cas chez un patient immunodéprimé décrit par Meisel et al (1976).

Mais ce n'est qu'au début des années 80 avec l'émergence du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) que la cryptosporidiose fut reconnue comme responsable de diarrhée chez l'homme.

En 1979, *Cryptosporidium felis* fut découvert par Iseki chez un chat (Fayer, 2010).

Un an plus tard, Levine a décrit *Cryptosporidium serpentis* au niveau de la glande gastrique chez un serpent (Fayer, 2010).

Cryptosporidium spp est un parasite responsable de nombreuses épidémies d'origine hydrique depuis les années 80 (Fayer et al., 2000 a). D'autres épidémies, liées aux aliments (lait, salade de poulet, viande...), ont également été signalées (Smith et al., 2007 ; Robertson et Huang, 2012).

(Current et *al.*, 1986 ; et Pavlásek, 1999) décrivent *Cryptosporidium baileyi* dans l'intestin grêle et *Cryptosporidium galli* dans les glandes gastriques chez le poulet Fayer et *al* ont observé en 2001 *Cryptosporidium canis* dans l'intestin grêle d'un chien (Fayer, 2010).

En 2002, première description d'une nouvelle espèce colonisant l'intestin grêle de l'homme : *Cryptosporidium hominis* par Morgan et Ryan et *al.* (Fayer, 2010).

Deux ans plus tard *Cryptosporidium suis* a été observé dans l'intestin grêle d'un porc par Ryan et *al.* ; puis en 2005 par Fayer et *al.*

En 2008 *Cryptosporidium bovis* et *ryanae* ont été décrits par Ryan chez le bétail (Fayer, 2010).

II. Étude du parasite

1. Taxonomie

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont des protozoaires appartenant au phylum des Apicomplexa (ou Sporozoaires).

Ce phylum représente un groupe d'agents pathogènes de très grande importance économique et médicale qui partagent des caractéristiques communes et diffèrent cependant par leur spécificité d'hôte, leur tropisme pour les tissus parasités, et l'obligation pour certains, de se développer chez plusieurs hôtes pour l'aboutissement du cycle de développement.

On a longtemps pensé que *Cryptosporidium* était lié aux coccidies, en raison des nombreuses similitudes de leur cycle biologique. Néanmoins il n'avère pas posséder d'organelle «l'apicoplaste» retrouvé chez les coccidies classiques (Abrahamsem et *al.*, 2004).

Des études récentes, indiquent que *Cryptosporidium spp* est davantage apparenté aux grégarines qu'aux coccidies (Carreon et *al.*, 1999 ; Yens, 2006), ceci en raison des nombreuses similitudes de leur stratégie de développement qui est apparemment plus simple.

La classification de *Cryptosporidium spp* au sein des protozoaires est décrite ci-dessous (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification taxonomique de *Cryptosporidium spp.* (D'après Current et Garcia, 1991 a ; Fayer et Xiao, 2007)

Classification	Caractéristiques biologiques
Empire : Eukaryota	présence d'un noyau avec une enveloppe nucléaire
Règne : Protiste	organismes à organisation cellulaire simple ou multiples
Sous règne : Protozoa	petit organisme unicellulaire
Phylum : Apicomplexa	Présence d'un complexe apical chez les formes invasives
Classe : Sporozoasida	Reproduction asexuée et sexuée avec formation d'oocystes contenant des sporozoïtes infectieux.
Sous classe : Coccidiasinae	Cycle biologique comprenant schizogonie, gamétogonie et sporogonie.
Ordre : Eucoccidiorida	Présence de schizogonie, aussi appelée mérogonie.
Sous-Ordre : Eimeriorina	Développement indépendant des macrogamontes et microgamontes
Famille :Cryptosporidiidae	-Cycle biologique monoxène. -Oocystes contenant quatre sporozoïtes nus. -Développement intracellulaire extracytoplasmique -Développement sous la bordure en brosse des cellules épithéliales colonisées.
Genre : Cryptosporidium	Seul genre de la famille des Cryptosporidiidae

2. Espèces parasitaires

Malgré la description de plus d'une vingtaine d'espèces dans la littérature avant 1980 (Morgan et *al.*, 1999), plusieurs espèces sont maintenant reconnues valides chez les vertébrés.

Aujourd'hui pour valider une espèce appartenant au genre *Cryptosporidium spp* il faut tenir compte des critères morphologiques (taille, forme, structure des différents stades de développement), biologiques (site de prédilection de l'infection, durée des

périodes pré patente et patente, hôtes infectés...) et génétiques (différences dans la séquence nucléotidique de gènes bien connus (codant pour l'ARN ribosomal (18S), glycoprotéine de surface des sporozoïtes gp60, des protéines fonctionnelles..) (Fayer et Xiao, 2007 ; Fayer, 2010) :

Pour nommer les nouvelles espèces de *Cryptosporidium spp* quatre conditions de base doivent être remplies (Xiao et *al.*, 2004) :

- a. Une étude morphométrique des oocystes
- b. Une caractérisation génétique
- c. Une identification des hôtes naturels ou expérimentaux
- d. La conformité aux règles de l'ICZN

La taxonomie de *Cryptosporidium spp* est en évolution et des espèces sont fréquemment renommées. De même, des isolats initialement décrits comme des génotypes sont ensuite considérés comme des espèces à part entière.

Le tableau 2 présente la liste des espèces de *Cryptosporidium spp* validées.

Tableau 2: Liste des espèces de *Cryptosporidium sp.* validées d'après (Kváč et *al.* 2012 ; Slapeta, 2012).

Espèce	Hôte	Référence
<i>C. muris</i>	Mammifères Homme	(Tyzzer, 1907)
<i>C. parvum</i>	Mammifères Homme	(Tyzzer, 1912)
<i>C. meleagridis</i>	Mammifères Oiseaux Homme	(Slavin, 1955)
<i>C. wrairi</i>	Mammifères	(Vetterling et <i>al.</i> , 1971)
<i>C. bovis</i>	Mammifères	(Barker & Carbonell, 1974) (Fayer, Santín & Xiao, 2005)
<i>C. cuniculus</i>	Mammifères Homme	(Robinson et <i>al.</i> , 2010)
<i>C. felis</i>	Mammifères Homme	(Iseki, 1979)

<i>C. serpentis</i>	Reptiles	(Levine, 1980)
<i>C. baileyi</i>	Oiseaux	(Current et al., 1986)
<i>C. varanii</i>	Reptiles	(Pavlassek et al., 1995)
<i>C. galli</i>	Oiseaux	(Ryan et al., 2003)
<i>C. andersoni</i>	Mammifères Homme	(Lindsay et al., 2000)
<i>C. canis</i>	Mammifères Homme	(Fayer et al., 2001)
<i>C. hominis</i>	Homme	(Morgan-Ryan et al., 2002)
<i>C. molnari</i>	Poissons	(Alvarez-Pellitero & Sitjà-Bobadilla, 2002)
<i>C. suis</i>	Mammifères Homme	(Ryan et al., 2004)
<i>C. fayeri</i>	Mammifères	(Ryan et al., 2008)
<i>C. ryanae</i>	Mammifères	(Fayer et al., 2010)
<i>C. fragile</i>	Amphibiens	(Jirků et al., 2008)
<i>C. macropodom</i>	Mammifères	(Power & Ryan, 2008)
<i>C. xiao</i>	Mammifères	(Fayer & Santín, 2009)
<i>C. ubiquitum</i>	Mammifères Homme	(Fayer et al., 2010)
<i>C. Tyzzeri</i> (invalidé par Slapeta 2012)	Mammifères	(Zhao et al., 2012)
<i>C. viatorum</i>	Homme	(Elwin et al., 2012)
<i>C. scorfarum</i>	Mammifères	(Kváč et al., 2012)
<i>C. nasoris</i>	Poissons	(Hoover et al., 1981)
<i>C. cichlidis</i>	Poissons	(Paperna & Vilenkin, 1996)
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Poissons	(Paperna & Vilenkin, 1996)
<i>C. pestis</i> (invalidée par (Xiao et al. 2007))	Mammifères	(Slapeta, 2006)
<i>C. ducismarci</i>	Reptiles	(Traversa, 2010)

3. Spécificité d'hôte

Il a longtemps été considéré que le parasite du genre *Cryptosporidium* spécifique à l'hôte, chez qui ils ont été isolés pour la première fois (Slapeta, 2009). Cependant, *Cryptosporidium parvum* a une très large gamme d'hôtes et est fréquemment incriminé dans les infections de l'homme et du bétail (ubiquiste).

Des études ont montré que cette espèce était retrouvée chez plus de 150 mammifères du monde entier (Fayer et al., 2000 a ; Fayer, 2010).

Ceci illustre l'absence de spécificité d'hôte qui caractérise cette espèce.

En outre et suite à des essais de transmission croisée cette hypothèse de spécificité d'hôte a été écartée (O'Donoghue, 1995; Tzipori et Griffiths, 1998).

Des expériences de transmission croisée montrent que des parasites issus d'une espèce hôte particulière étaient capables d'infecter expérimentalement des espèces-hôtes différentes de celles d'origine.

Les scientifiques ont remarqué que la plupart des essais de transmission de l'infection entre des hôtes appartenant à la même classe de vertébrés (de mammifère à mammifère ou d'oiseau à oiseau) ont réussi, alors que la majorité des essais de transmission de l'infection entre des hôtes appartenant à des classes de vertébrés différentes (de mammifère à oiseau, d'oiseau à mammifère ou de reptile à mammifère) ont échoué.

Ces résultats confirment alors la notion d'une spécificité de classe de vertébrés. Mais cette spécificité ne semble pas stricte entre les différentes classes de vertébrés (Ynes, 2006). La difficulté de la spéciation des cryptosporidies a fait conduire de plus en plus les chercheurs à utiliser le terme d'isolat de parasite référencé à partir de l'espèce hôte dont il est issu (isolat d'agneau, isolat de souris.....) (Xiao et al., 2004).

4. Espèces présentes

Chez l'homme

Plusieurs espèces parasitaires de *Cryptosporidium spp.* sont incriminées dans la cryptosporidiose humaine, cependant, *C. hominis* spécifique de l'Homme et des primates redécrite récemment (Morgan-Ryan et al., 2002) et *C. parvum*, parasite de plus de 150 espèces de mammifères (Fayer, 2004) sont principalement reconnues comme étant à l'origine de l'affection chez l'homme.

Chez les caprins

La cryptosporidiose a été décrite chez de nombreuses espèces animales, aussi bien domestiques que sauvages.

Parmi tous les ruminants, le chevreau est indiscutablement l'animal le plus sensible.

C. parvum est l'espèce majoritairement retrouvée en Europe chez le chevreau non sevré, lors d'épisodes de diarrhée ou non (Ngouanesavanh et al., 2006 ; Geurden et al., 2008 a ; Quílez et al., 2008 ; Paraud et al., 2009). Récemment, il a été mis en évidence la présence de *C. xiaoi* (anciennement *C. bovis* like genotype ou *C. bovis* chez les moutons), chez des chevrettes de moins de 21 jours présentant de la diarrhée en Espagne (Díaz et al., 2010 a). Au Pérou, Cama, (2008) a mis en évidence la présence d'une autre espèce de *Cryptosporidium*, chez 8 chèvres adultes : *C. ubiquitum* (anciennement *Cryptosporidium cervine* genotype).

Les espèces *C. hominis* et *C. parvum* ont été décrites de façon véritable chez des chèvres adultes (Chalmers et al., 2002 ; Hajdusek et al., 2004 ; Park et al., 2006 ; Giles et al., 2009 ; Xiao, 2010).

C. xiaoi, une espèce très proche génétiquement de *C. bovis* a également été retrouvée récemment chez des chevreaux diarrhéiques (Díaz et al., 2010 a).

5. Localisation

La première description de *Cryptosporidium* fut dans les glandes gastriques d'une souris (Tyzzer, 1907).

Toutefois, le site de prédilection de *Cryptosporidium* est l'intestin grêle distale (jéjunum inférieur et iléon) bien que des infections sont aussi observées dans le caecum, le colon et occasionnellement dans le duodénum.

Le développement de *Cryptosporidium* au niveau de la cellule épithéliale est intracellulaire mais extracytoplasmique en position marginale, sous la membrane des cellules-hôtes, mais toujours au sein d'une vacuole parasitophore (O'Donoghue, 1995 ; Tzipori et Griffiths, 1998).

6. Biologie du parasite

A. Cycle évolutif

Le cycle de développement des espèces du genre *Cryptosporidium*, est un cycle monoxène, c'est-à-dire que tous les stades de développement se déroulent chez un seul et même hôte (Matthews, 1991) dans les cellules épithéliales de l'intestin (pour la plupart des espèces).

Il commence par l'ingestion d'oocystes sporulés (formes de résistance et de dissémination) et se poursuit par des stades de multiplication asexuée et de reproduction sexuée du parasite.

Le cycle peut être divisé en deux phases principales :

a. Développement chez l'hôte

Une phase interne chez l'hôte, comprenant :

Excystation La contamination est effectuée par l'ingestion d'oocystes, après l'ingestion, les conditions du milieu intestinal (température, enzymes (la trypsine), sels biliaires, pH ...) altèrent la paroi de l'oocyste qui se fend, chaque oocyste libère 4 sporozoïtes infestants dans la lumière du tractus digestif. Ensuite, les sporozoïtes libres s'attachent à la membrane plasmique de la cellule épithéliale de la bordure en brosse, puis s'entourent d'une vacuole parasitophore, ayant pour origine la membrane plasmique des cellules épithéliales, pour devenir des trophozoïtes et à partir de ce moment-là, le parasite se développe en position intracellulaire mais extra-cytoplasmique (O'Donoghue, 1995).

Mérogonie Le cycle de multiplication asexuée appelé également schizogonie mène à la formation de mérontes de type I qui contiennent jusqu'à 8 mérozoïtes de type I. Ces derniers sont libérés de la vacuole parasitophore et envahissent les cellules épithéliales voisines. Ils forment ensuite soit de nouveau des mérontes de type I (**auto-infestation ou rétro-infection**), soit des mérontes de type II qui contiennent 4 mérozoïtes de type II (2ème génération de la reproduction asexuée) (Current et Garcia, 1991 ; Fayer, 1997)

Gamétogonie

Par la suite les mérozoïtes de type II vont initier le cycle de multiplication sexuée ou gamétogonie et se différencient soit en microgamontes (mâle) (36 heures post-infection), soit en macrogamontes (femelle) (48 heures post-infection).

Les microgamontes deviennent plurinucléés (chaque noyau contenu dans les microgamontes est incorporé dans un microgamète non flagellé).

Les macrogamètes, eux, restent uninucléés en devenant des macrogamètes.

Un micro-gamonte produit jusqu'à 16 microgamètes qui, une fois matures, féconderont le macro-gamète pour donner un zygote diploïde (oocyste immature 2 N chromosomes) (Current et Garcia, 1991 ; Fayer, 1997).

Sporogonie ou sporulation

Elle a lieu in situ, dans la cellule hôte, contrairement à la plupart des coccidies.

Le zygote après sporulation (sporogonie), donne naissance à un oocyste directement sporulé dans la lumière intestinale est donc directement infectant pour un hôte sensible contenant quatre sporozoïtes non enveloppés (N chromosomes).

Il existe deux sortes d'oocystes formés :

- Ceux à paroi épaisse (80%) résistant dans le milieu extérieur et directement infectants, éliminés dans les selles de l'hôte.
- Ceux à paroi fine (20%) libérant leurs sporozoïtes dans le tractus digestif et participant au phénomène d'auto-infestation (excystation in situ) chez le même hôte (un nouveau cycle de développement chez le même hôte) (Current et Garcia, 1991 ; Fayer, 1997).

Les particularités du cycle de *Cryptosporidium* (oocyste directement infectant, auto-infection par des oocystes à parois fine) ne sont pas partagées par les autres coccidies.

b. Dissémination d'oocystes dans l'environnement

Les animaux infectés par *Cryptosporidium spp*, excrètent de grandes quantités d'oocystes déjà sporulés et donc directement infectants qui contaminent alors l'environnement et la nappe phréatique (Peeters et al, 1989).

Ces oocystes sont très résistants pouvant survivre plusieurs mois dans le milieu extérieur.

En effet, ils peuvent survivre plus de 6 mois dans des conditions favorables d'humidité et de chaleur (Fayer et Xiao, 2007 ; Chalmers et Giles, 2010).

Période prépatente :

C'est le délai entre l'ingestion d'oocystes infectants et le début de l'excrétion des oocystes dans les matières fécales. Elle est de 2 à 14 jours chez la plupart des espèces domestiques avec une moyenne de 3 à 6 jours (Villeneuve, 2003).

La période pré patente dépend de l'espèce de *Cryptosporidium* ; elle est d'environ 4 jours pour *C. parvum* (Fayer et Xiao, 2007).

Pour *C. hominis*, cette période, semble être un peu plus longue, en moyenne 8 jours (Morgan-Ryan et al., 2002 ; Fayer et Xiao, 2007).

Période patente :

Correspond à la durée d'excrétion du parasite, elle varie de quelques jours à quelques mois.

Ces deux périodes varient en fonction des espèces hôtes, les espèces de *Cryptosporidium* en cause, la dose infectante et le statut immunitaire de l'individu (Villeneuve, 2003 ; Fayer et al., 2005 ; Fayer et al., 2008).

Des études ont montré que les oocystes de *Cryptosporidium* résistent également aux désinfectants chlorés utilisés pour le traitement de l'eau, le risque de contamination peut donc être présent dans les eaux traitées par chloration (Fayer, 2004).

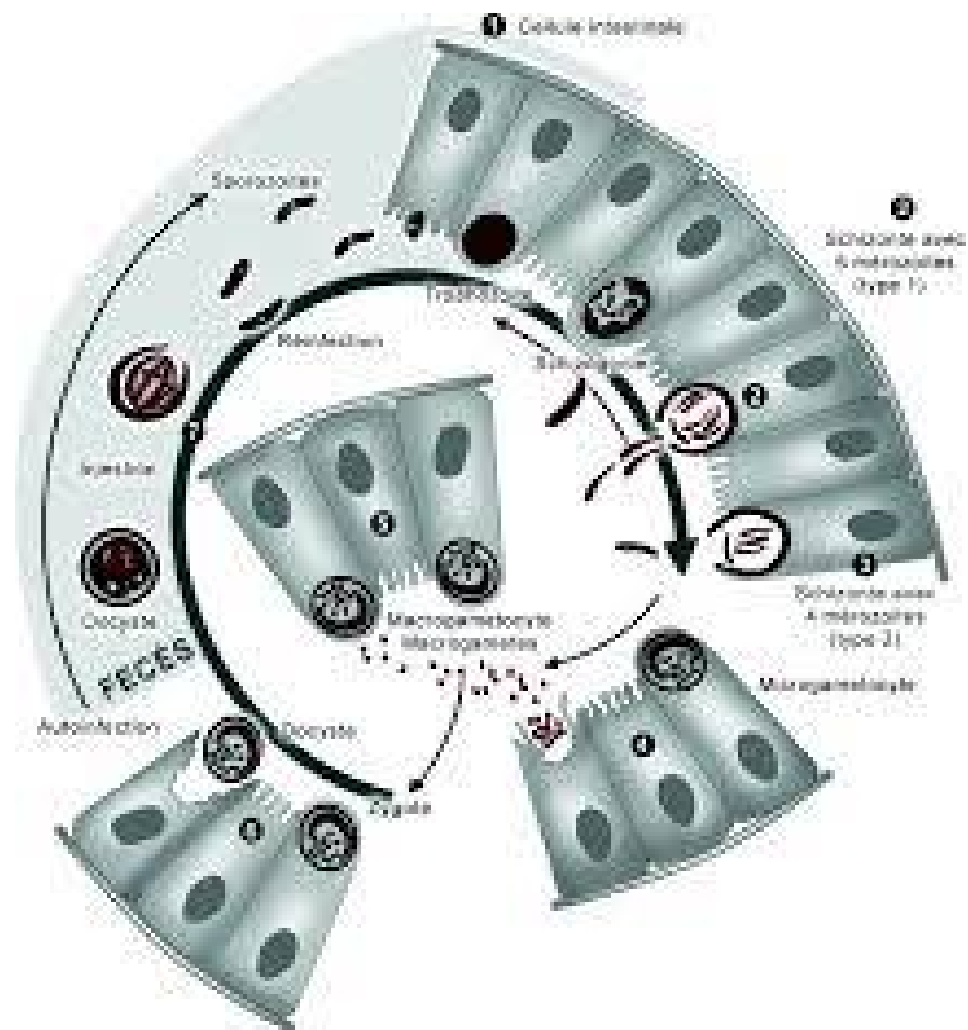


Figure 01 : Cycle biologique de *Cryptosporidium* sp. D'après Smith et al., 2007

B. Caractères morphologiques de *Cryptosporidium* spp.

Cryptosporidium est un parasite intracellulaire obligatoire de l'épithélium de l'intestin grêle dont le cycle comporte une multiplication asexuée (schizogonie) et une multiplication sexuée (gamogonie) conduisant à la formation d'oocystes éliminés avec les selles.

Morphologie des différents stades parasitaires

Les oocystes

Les oocystes de *Cryptosporidium spp* sont petits, leur forme est ovoïde à elliptique le diamètre des oocystes varie entre 4 et 8 μm selon l'espèce parasitaire (O'Donoghue, 1995).

Chaque oocyste contient 4 sporozoïtes, non enveloppés, (sans sporocyste).

Leur paroi est très résistante, ce qui leur permet une grande survie dans le milieu extérieur.

Les sporozoïtes

C'est la forme invasive du parasite, mobiles.

Ils ont une forme de croissant, avec une partie postérieure arrondie.

Les trophozoïtes

Caractérisés par la présence d'un noyau unique de grande taille.

Présence d'une organelle nourricière bien développée

Les mérontes et mérozoïtes de types I et II

Les deux types de mérontes mesurent entre 4 et 5 μm de diamètre.

Les mérontes de type I, contiennent 6 à 8 mérozoïtes alors que les mérontes de type II ne contiennent que 4 mérozoïtes.

Les mérozoïtes ont la même morphologie que les sporozoïtes.

Les deux extrémités antérieure et postérieure sont arrondies.

Les macrogamontes

De forme sphérique à ovoïde et une taille comprise entre 4 et 6 μm .

Ils présentent une vacuole et un grand noyau en position central.

Un macrogamonte donne naissance à un seul macrogamète.

Les microgamontes

Ont une forme allongée avec une extrémité antérieure aplatie.

Ils renferment 14 à 16 microgamètes aflagellés.

Les stades du cycle intracellulaire apparaissent en coupe histologique sous forme de petits corps basophiles donnant à la bordure en brosse un aspect granuleux.

La cryptosporidiose

La cryptosporidiose est une maladie zoonotique cosmopolite causée par un protozoaire du genre *Cryptosporidium* (Chartier, 2001 a et b ; Ripert et Guyot 2003; Appelbee et *al.*, 2005).

Cette parasitose est responsable d'importantes pertes économiques en élevage de ruminants.

III. Épidémiologie de la maladie

Les enquêtes épidémiologiques sur la cryptosporidiose deviennent de plus en plus nombreuses dans le monde et confirment le caractère cosmopolite de l'infection.

1. Répartition géographique

L'infection a été rapportée dans 95 pays de tous les continents et sous toutes les latitudes à l'exception de l'Antarctique (Ripert et Guyot, 2003).

Elle est fréquente dans les pays sous-développés (Ripert et Guyot, 2003; Nahrevanian et Assmar, 2008) en raison des mauvaises conditions de vie associées à la qualité de l'eau, le manque d'hygiène et les mauvaises conditions d'habitation.

Toutefois, le *cryptosporidium* est parmi les 4 principaux agents responsables de diarrhée aiguë chez les jeunes enfants (Pape et *al.*, 1987; Fayer et *al.*, 2000; Tzipori & Ward, 2002).

Dans les pays développés, la maladie se manifeste sous la forme des épisodes épidémiques d'origine hydrique dus aux eaux de distribution publique.

(Ex : épidémie du Milwaukee aux USA en 1993 pendant laquelle 403 000 personnes ont été infectées, responsable de 112 décès.).

2. Réceptivité et sensibilité

La cryptosporidiose est une protozoose zoonotique qui touche tous les ruminants, cependant, le chevreau nouveau-né est le plus sensible à cette infection notamment par *C. parvum*, il peut se contaminer dès sa naissance.

Chez les jeunes âgés de cinq jours à trois semaines la maladie est plus commune et se manifeste par une diarrhée néonatale (CHARTIER 2002a ; DUBEY et *al.*, 1990).

Les signes cliniques sont beaucoup plus intenses chez le chevreau que chez le veau ou l'agneau (CHARTIER 2002a).

La morbidité de la cryptosporidiose dans les élevages caprins infectés est de 80% alors que la mortalité peut dépasser 50% (CHARTIER 2001a), toutefois une mortalité de 100% a déjà été décrite (DELAFOSSSE et *al.* 2003).

Chez le jeune ruminant, la relation entre la maladie et la qualité de l'immunité passive n'est pas prouvée.

La prise du colostrum n'empêche pas la survenue de la maladie, cependant, elle est à l'origine d'une faible excrétion fécale d'oocystes. (RADOSTIS et *al.*, 2000).

Chez l'homme, la sensibilité à l'infection est essentiellement fonction de l'état immunologique des individus contaminés, en outre la malnutrition peut contribuer à augmenter la durée de la diarrhée à cryptosporidies (Sallon et *al.*, 1988).

La cryptosporidiose est une maladie néonatale chez les animaux néanmoins, chez l'homme l'âge intervient moins.

Des études effectuées dans les pays sous-développés, montrent une plus grande sensibilité à la cryptosporidiose chez les jeunes enfants de moins de 2 ans (Alpert et *al.*, 1984, 1986 ; Addy et Aikens-Bekoe 1986, Hojlyng et *al.*, 1986, Pape et *al.*, 1987).

3. Source de contamination

La principale source de la cryptosporidiose est les oocystes sporulés directement infectants émis dans les fèces des animaux infectés présentant ou non des symptômes.

Les chevreaux peuvent être infectés par les fèces excrétés par les veaux et vice versa.

Les jeunes animaux malades jouent un rôle important de réservoir de parasite dont l'excrétion est évaluée à $3,6 \times 10^8$ oocystes par jour chez un chevreau malade contre $1,6 \times 10^5$ oocystes par jour chez une chèvre adulte autour de la mise bas qui joue un rôle de réservoir non négligeable de parasites en raison de l'excrétion résiduelle, qui s'intensifie autour du part (CHARTIER, 2002a ; NOORDENN et *al.*, 2002 ; CASTRO-HERMIDA et *al.*, 2005).

En outre, la contamination des chevreaux peut être due au léchage des mamelles, flancs ou périnée de la mère excrétrice (Barr, 1997 ; Derouin et *al.*, 2002).

L'environnement, l'eau et l'alimentation ainsi que les mouches et le matériel utilisé au contact des animaux malades peuvent assurer la transmission d'oocystes (MOORE et *al.*, 2003).

Pour certains auteurs, les rongeurs représentent également un réservoir non négligeable de parasite (MILLEMAN et *al.*, 2003 ; FAYER, 2004).

4. Mode de transmission et la dose infectante

La transmission est féco-oral, effectuée par l'ingestion d'oocystes sporulés directement infectants.

Elle peut se faire soit par

- **Contact direct** avec les fèces diarrhéiques des animaux malades ou de façon interhumaine qui est très fréquente, notamment en milieu citadin (un sujet infecté peut excréter plus de 100 oocystes / jour)

La cryptosporidiose est une zoonose avec transmission directe de l'animal à l'homme.

Si des contaminations à partir d'animaux de compagnie ont été décrites, elles restent rares.

Pour certains auteurs, les rongeurs représentent également un réservoir non négligeable (Milleman et *al.*, 2003, Fayer, 2004).

- soit indirectement par ingestion d'eau (infection d'origine hydrique) ou d'aliment contaminés, par contact avec le matériel, les locaux ... (Villeneuve, 2003).

Des oocystes de *Cryptosporidium spp* issus des déjections animales et humaines ont été retrouvés dans tous les types d'eaux de surface et souterraines.

En 2007, une étude a prouvé, que parmi 325 épidémies hydriques dues à des protozoaires ayant touché les pays industrialisés de 1920 à 2003, *Cryptosporidium spp.* était le micro-organisme responsable de plus de 50% des cas.

- Plus rarement, la transmission de la maladie se fait par **inhalation** (transmission aérienne) elle concerne la mise en suspension d'oocystes aérosolisés et leur inhalation cependant cette voie est surtout fréquente chez les Oiseaux.

La dose infectante minimale (DMI) chez l'homme, est très basse : en moyenne 132 oocystes chez le sujet immunocompétent, la maladie peut également apparaître après ingestion de 30 oocystes.

Chez le patient immunodéprimé, cette dose est estimée à 10 oocystes, il a même été décrit un cas survenu après l'ingestion d'un seul oocyste de *C. parvum* (Okhuysen et *al.*, 1999). Des infections expérimentales avec *C. parvum* chez des singes, des souris et des agneaux nouveau-nés ont été conduites par la même dose infectante (Blewett et *al.*, 1993).

Ces valeurs restent néanmoins à pondérer car il existe des différences de virulence entre les souches.

5. Prévalence de la cryptosporidiose

La prévalence de la cryptosporidiose représente le pourcentage des sujets infectés par *Cryptosporidium spp.* dans une population donnée à une période connue (Cole et al, 1998). Du fait de son caractère bénin chez les sujets immunocompétents et de l'existence des porteurs asymptomatiques la cryptosporidiose est sous-estimée, cependant elle peut être évaluée grâce aux études épidémiologiques des cas de gastro-entérites aiguës.

La prévalence de la cryptosporidiose chez les sujets immunocompétents est évaluée entre 1-3% dans les pays développés contre 3-20% dans les pays en développement (Tzipori, 1988 ; Current et Garcia 1991 b ; Ripert et Guyot, 2003), ceci peut être expliqué par les mauvaises conditions d'habitation (la présence d'animaux à proximité des habitations), la mauvaise qualité de l'eau, le manque d'hygiène, (Nichols dans Fayer et Xiao, 2007).

Bien que de nombreuses épidémies de cryptosporidiose ayant une origine hydrique aient été rapportées aussi bien dans les pays industrialisés que ceux en voie de développement (Fayer et al., 2000 ; Ramirez et al., 2004), d'autres, d'origine alimentaire, ont déjà été documentées (Smith et al., 2007 ; Robertson et Huang, 2012).

Chez les ruminants, La prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* peut varier en fonction de la population de départ, la géographie, du type d'élevage (bovins allaitants ou bovins laitiers) ou bien encore des conditions de vie, des techniques de détection et de l'âge des animaux : L'infection est beaucoup plus forte chez les très jeunes animaux (< de 3 semaines (diarrhées néonatales)) que chez les animaux âgés (Santín et al., 2004 ; Fayer et al., 2006; Kváč et al., 2006 ; Mendonça et al., 2007).

La prévalence de la cryptosporidiose est significativement plus élevée chez les animaux diarrhéiques par rapport à ceux n'ayant pas de diarrhée (Causapé et al., 1996). En outre, des études ont montré que l'affection couramment observée chez des animaux immunodéprimés infectés par des virus ou lorsqu'il y a une infection concomitante avec un autre agent intestinal (isosporose), ce qui majorent l'intensité de l'expression clinique (Willard et Bouley, 1999 ; Denholm et al., 2001).

La prévalence de la cryptosporidiose dans les élevages caprins varie suivant les études et les procédés utilisés pour la recherche du parasite. Une étude transversale a été réalisée en 2003 dans les deux sèvres (France), sur 879 chevreaux âgés de 5 à 30 jours provenant de 60 cheptels a rapporté un portage d'oocystes pour *C.*

parvum chez plus de 16% des chevreux (DELAFOSSSE et *al.*, 2003), cependant, plus de 53% des cheptels avaient au moins un animal positif (DELAFOSSSE et *al.*, 2003).

En Algérie, les données épidémiologiques disponibles sur la cryptosporidiose chez les caprins sont rares et très peu d'études ont été effectuées sur la cryptosporidiose caprine.

En 2011 Baroudi et *al.*, , ont montré une prévalence de 46.44% chez des chevreux âgés de 1à 3 mois dans la région d'Alger.

IV.Pathogénie

1. Pouvoir pathogène

L'infection de l'homme et des animaux se fait par ingestion des oocystes de *Cryptosporidium spp.* qui libèrent leurs sporozoïtes dans l'intestin de l'hôte, ces derniers vont envahir les entérocytes de l'iléon et du jéjunum mais parfois du caecum, et du côlon et rarement de l'estomac et du duodénum (Ripert et Guyot, 2003).

On peut observer certaines espèces de *Cryptosporidium* dans l'appareil respiratoire, vésicule biliaire et les canaux pancréatiques chez l'hôte immunodéprimé (Hawkins et *al.*, 1987 ; Lopez-Velez et *al.*, 1995 ; Vakil et *al.*, 1996; de Souza et *al.*, 2004).

La colonisation et la multiplication de *C. parvum* dans la bordure en brosse des entérocytes, provoquent une destruction des microvillosités de l'iléon qui est à l'origine d'une malabsorption (Chambon ,1990 ; Smith et Sherman, 1994 ; Chartier, 2002, Fayer ,2004), ainsi la production de prostaglandines au niveau de la muqueuse, expliquent la diarrhée et la perte de poids observée (Chambon ,1990 ; Smith et Sherman ,1994 ; Chartier ,2002 ; Fayer, 2004).

Du fait de l'abondance de la diarrhée chez certains sujets, l'existence d'une entérotoxine produite par le parasite est suspectée (Okhuysen et Chappell, 2002 ; Fayer ,2004).

Des études récentes effectuées sur des souris ont mis en évidence la capacité de *C. parvum* à induire des dysplasies intestinales (Certad et *al.*, 2012 ; Abdou et *al.*, 2013).

A l'heure actuelle, les facteurs de virulence de *Cryptosporidium spp* sont méconnus, cependant ceci n'empêche pas l'identification de certaines molécules incluses dans l'adhésion du parasite à la cellule hôte, ou des molécules responsables de l'invasion

de l'entérocyte, ainsi celles impliquées dans la protection du parasite contre le système immunitaire de l'hôte. Cette identification est effectuée grâce à des procédés immunologiques et moléculaires (Adams et *al.*, 1994 ; Cevallos et *al.*, 2000 ; Strong et *al.*, 2000 ; Bouzid et *al.*, 2013).

2. Pouvoir immunogène

Une réponse sérique d'IgG peut être observée chez les sujets infectés par *C. parvum*.

La réinfection des individus par cette même espèce parasitaire permet d'induire la même réponse sérique dans 33% des cas, cependant l'intensité de la diarrhée et la durée de l'infection restent similaires à la première infection, montrant qu'une primo-infection ne suffit pas à protéger de l'infection par *C. parvum* (Chappell et *al.*, 2006; Chalmers & Davies, 2010).

VI. Clinique

L'expression clinique de la Cryptosporidiose peut varier largement d'un individu à un autre, sous la dépendance du statut immunitaire de l'hôte, de son âge, de l'espèce de *Cryptosporidium spp*, et de la dose infectante (Fayer et *al.*, 2005 ; Fayer et *al.*, 2008).

La cryptosporidiose humaine

C. parvum et *C. hominis* sont les deux espèces les plus couramment retrouvées en mono-infection chez l'homme (Xiao et *al.*, 2004; Smith et *al.*, 2007).

Des cas infections multiples avec d'autres espèces de *Cryptosporidium spp* à savoir *C. andersoni*, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis*, *C. muris* et *C. suis* ont déjà été rapportées chez des patients atteints du SIDA (Cama et *al.*, 2006).

La cryptosporidiose peut être asymptomatique (porteurs sains) ou provoquer une gastro--entérite banale chez les individus immunocompétents.

Elle se traduit classiquement par une diarrhée abondante (jusqu'à 10 fois/ jour) et aqueuse, non sanglantes, non prurientes cependant du mucus peut être présent dans les selles (Chalmers et Davies, 2010), qui peut être accompagnée de crampes abdominales, de nausées, de vomissements, d'une perte de poids et de fièvre modérée (< 39°C), Il a été signalé que l'infection par *C. hominis* est plus souvent associée à des signes généraux, à type d'anorexie, d'asthénie, de myalgies, et de

céphalées. (Fayer, 2004 ; Guerrant dans Fayer et Xiao, 2007 ; Chalmers et Davies, 2010). Chez les individus immunocompétents, la diarrhée est spontanément résolutive (Ripert et Guyot, 2003 ; Guerrant dans Fayer et Xiao, 2007). Cependant, le patient peut continuer à excréter des oocystes plusieurs semaines après la fin des symptômes.

Chez les nouveau-nés et jeunes enfants (< 4 ans), la diarrhée dure plus longtemps et s'accompagne d'une déshydratation sévère engendrant des troubles de la croissance

Les enfants les plus touchés sont généralement ceux vivant dans des conditions hygiéniques défavorables (Fayer et Xiao, 2007) notamment dans les pays sous-développés.

Chez les individus immunodéficients, la durée et sévérité de la maladie dépend du niveau d'immunosuppression.

Les sujets ayant un taux de CD4 >200 mm³ ont la même évolution de la maladie que chez les immunocompétents car ils présentent une bonne immunité cellulaire.

Les individus présentant un faible taux de CD4 < 100 cellules /mm³ (Navin et *al.*, 1999 ; Guerrant dans Fayer et Xiao, 2007 ; Chalmers et Davies, 2010) développent la maladie.

Elle peut être beaucoup plus sévère, voire même fatale en raison des fortes diarrhées (en moyenne de 3,6 L / J, pouvant atteindre 17 L/ J), conduisant à une profonde déshydratation, et une perte de poids qui peut représenter 20 à 30% du poids du patient en quelques semaines (Guerrant dans Fayer et Xiao, 2007).

Des formes extra-intestinales de la maladie avec une dissémination de l'infection vers la vésicule biliaire, le pancréas, le foie et l'appareil respiratoire ont été décrites lors des cas d'immunosuppression profonde, avec des LT CD4 < 50 cellules/mm³, (Current et Garcia, 1991 a ; Hawkins et *al.*, 1987 ; Fayer, 2004 ; Chalmers et Davies, 2010).

Ce qui complique le pronostic vital avec apparition possible de cholécystite, cholangite sclérosante, pancréatite aiguës et chroniques, hépatite et infection de l'appareil respiratoire (Lopez-Velez et *al.*, 1995 ; Vakil et *al.*, 1996 ; de Souza et *al.*, 2004).

La restauration d'un statut immunitaire par l'utilisation de thérapies antirétrovirales permet une résolution de l'infection.

La Cryptosporidiose chez les ruminants

La cryptosporidiose du bétail est surveillée, non seulement parce que ces animaux ont été considérés comme source de contamination pour l'homme, mais également parce que l'infection par ce parasite entraîne d'importantes pertes économiques chez les ruminants nouveau-nés (en raison de la mortalité, la morbidité, les retards de croissance qu'elle provoque et le coût des traitements des animaux) (de Graaf et *al.*, 1999).

En fonction des espèces hôtes (bovins, caprins ou ovins) et de l'âge des animaux.

Plusieurs espèces de *Cryptosporidium spp* sont signalées.

De nombreuses études ont montré la forte prévalence de l'espèce zoonotique *C. parvum* chez les jeunes ruminants non sevrés (Santín et *al.*, 2004, 2008 ; Geurden et *al.*, 2008 a ; Quílez et *al.*, 2008 ; Mueller-Doblies et *al.*, 2008 ; Paraud et *al.*, 2009 ; Paoletti et *al.*, 2009 ; Xiao, 2010).

L'infection revêt une gravité particulière chez le chevreau. Elle est aujourd'hui la première cause de diarrhée néonatale isolée dans cette espèce. (Muñoz et *al.*, 1996). Lors d'épisodes cliniques, la morbidité peut atteindre 100% d'un lot et la mortalité 60% (Chartier et *al.*, 1999 ; Chartier, 2002).

Chez les ruminants, la symptomatologie de la maladie varie d'une absence de signes cliniques à une diarrhée très sévère.

La maladie se manifeste par une diarrhée aiguë, aqueuse, blanche à jaunâtre qui peut être muqueuse mais rarement sanglante chez les chevreaux moins de 3 semaine. Cette diarrhée dure habituellement de quelques jours à deux semaines, parfois plus, en raison des possibles auto-infections. Elle peut être constante ou intermittente associée souvent d'anorexie, apathie, déshydratation, perte de poids conduisant à des retards de croissance importants (Tzipori et *al.*, 1983 ; de Graaf et *al.*, 1999 a ; Chartier, 2002 ; Fayer, 2004 ; Santín et Trout, 2007).

Bien que l'amaigrissement est très prononcé, les animaux guéris développent souvent une croissance compensatrice, cependant d'autres restent des « non valeurs économiques ». (DUBEY et *al.* 1990, SMITH et SHERMAN 1994, CHARTIER 2002, FAYER 2004)

Les animaux adultes sevrés infectés par *Cryptosporidium spp* sont presque toujours asymptomatiques bien que des formes cliniques aient été décrites notamment chez des chèvres adultes (Johnson et *al.* 1999 ; CHARTIER 2002a)

VII. Lésions

Macroscopiquement, les lésions sont peu spécifiques avec présence parfois de signes d'entérite, et de congestion de la muqueuse. La lumière intestinale est envahie par une grande quantité de liquide.

De plus, des rares cas d'adénomégalie des nœuds lymphatiques mésentériques sont aussi décrites (Greene et *al.*, 1990).

L'examen histopathologique des intestins, montre des lésions de nécrose et d'inflammation modérée (Miller et *al.*, 2003), associée à un allongement des cryptes dans la partie proximale de l'intestin grêle avec hyperplasie cryptique dans le gros intestin (Heine et *al.*, 1984) et à une fusion des villosités intestinales (Wilson et *al.*, 1983 ; Willard et Bouley, 1999). Ces lésions intéressent l'intestin grêle, sans distinction entre ses différentes portions, duodénum, jéjunum ou l'iléon (Willard et Bouley, 1999). Le parasite va entraîner l'apparition d'un infiltrat de lymphocytes, plasmocytes et polynucléaires neutrophiles au niveau de la muqueuse associé à un certain degré d'une atrophie des villosités.

Toutefois, les auteurs n'ont pas mentionné d'altérations néoplasiques.

VIII. Diagnostic

1. Épidémiologique et clinique

Les données épidémiologiques et cliniques (chevreau jeune, diarrhée) appellent à une suspicion de cryptosporidiose.

L'apparition de diarrhées à allure enzootique plutôt sévères chez des chevreaux âgés de 5 à 20 jours, en milieu de période des mises bas avec morbidité et mortalité importante doit orienter le diagnostic vers la cryptosporidiose.

Particulièrement lorsque cette diarrhée est réfractaire au traitement habituel (LE GUILLOU 2002).

Néanmoins les symptômes rencontrés lors de la Cryptosporidiose ne permettent pas de poser un diagnostic de certitude sans confirmation par un diagnostic de laboratoire.

2. Différentiel

Chez les Ruminants, le diagnostic différentiel repose sur toutes les affections infectieuses ou non infectieuses à l'origine des gastro-entérites néonatales :

➤ Causes infectieuses

Plusieurs agents pathogènes quels que soient leurs origines virales, bactériennes ou parasitaires peuvent provoquer la diarrhée chez le chevreau :

- Des affections bactériennes : E.coli, Salmonella, Clostridium perfringens, Campylobacter...

Colibacilles :

La colibacillose proprement dite provoque une diarrhée abondante, liquide, jaunâtre et de l'hyperthermie, au cours des premiers jours de vie.

Cependant, la cryptosporidiose touche souvent des animaux un peu plus âgés.

Clostridium perfringens type B

C'est une toxi-infection qui se caractérise par des symptômes d'entérite hémorragique nécrotique avant l'âge de trois semaines.

Son évolution est toujours très rapide et conduit souvent à la mort.

Salmonella spp

Plusieurs caprins de tous les âges présentent de dysenterie avec mucus et moulages de fibrine, la diarrhée est verdâtre ou hémorragique

La salmonellose apparaît essentiellement en fin de période de mises bas. (MILLEMANN et al. 2003)

- Des affections virales : rotavirus, coronavirus, torovirus, astrovirus, calicivirus...

Provoquent de la diarrhée liquide au cours de la première semaine de vie, Il y a plusieurs malades

Les animaux guérissent spontanément en quelques jours, sauf en cas de surinfections.

- Des protozooses : *Giardia spp.*, *Eimeria spp.*...

Giardia duodenalis

La giardiose se manifeste par une diarrhée pâteuse, un amaigrissement et de l'abattement chez des animaux âgés de 5 à 10 semaines. (CASTRO-HERMIDA et *al.* 2005)

➤ **Causes non infectieuses**

- Alimentaires ou dues au stress

La conduite alimentaire semble jouer un rôle important

Le syndrome du chevreau mou, d'origine alimentaire et secondairement de colibacilles, se caractérise par une grande faiblesse chez des chevreaux de 8 à 10 jours, de la diarrhée peut éventuellement s'observer. (MILLEMANN et *al.* 2003).

3. Expérimental (de laboratoire)

A. Mise en évidence des oocystes de *Cryptosporidium spp*

Plusieurs méthodes existent afin de diagnostiquer l'infection cryptosporidienne. En effet, la mise en évidence de la forme de résistance qui est l'oocyste, peut se faire à l'aide de techniques de concentration, de coloration appliquée à des échantillons coproscopiques (Heine, Ziehl-Neelsen modifié) ou bien par marquage, avec des anticorps monoclonaux fluorescents (immunofluorescence : IF). Des antigènes peuvent être mis en évidence par des méthodes immuno enzymologiques (ELISA) qui représentent une alternative intéressante puisqu'elles permettent de tester un grand nombre d'échantillons (Smith dans Fayer et Xiao, 2007).

D'autre part, la mise en évidence du parasite peut se faire à l'aide de la biologie moléculaire et notamment par Polymerase Chain Reaction (PCR) ciblant un gène propre au genre *Cryptosporidium*. (Baillargeon, 2004).

La détection d'anticorps sériques anti-*Cryptosporidium* est possible mais fournit uniquement une information sur l'exposition de l'individu au parasite. En effet, les anticorps sont détectables dès lors que l'infection est patente et peuvent persister jusqu'à 12 mois après celle-ci (O'DONOGHUE, 1995).

a. Techniques de concentration

La concentration de l'échantillon est une étape préalable indispensable lorsqu'une faible concentration d'oocystes est présente. Différentes techniques de concentration sont utilisées, la flottation au chlorure de sodium saturé, la flottation au sucre, la flottation au sulfate de magnésium ou de zinc (O'DONOGHUE, 1995 ; WYATT et *al.*, 2010).

Parmi ces techniques, la flottation en solution de saccharose saturée (technique Sheather), est la plus utilisée. Il semble que ni la flottation avec la solution de sulfate de zinc, ou avec la solution sucrée ne permet de déterminer la viabilité des oocystes.

Il existe également des techniques de concentration par sédimentation dans la formaline-acétate d'éthyle (FAE) ou dans la formaline-éther (FE) qui est utilisées dans le cas fèces avec un taux élevé de lipides et qui nécessitent de plus petites quantités de matières fécales que les techniques de flottation (Bukhari et Smith, 1995; Baillargeon, 2004)

Il est possible de combiner une méthode de sédimentation avec une méthode de flottation afin d'optimiser les chances d'obtenir un haut taux de recouvrement (Bukhari et Smith, 1995; Baillargeon, 2004).

Il est évident que ces techniques de concentration présentent un intérêt lors de la recherche du parasite dans des échantillons provenant de l'environnement (eau, matières fécales...) (Smith dans Fayer et Xiao, 2007 ; Kar et *al.*, 2011). Une étude récente a montré en comparant différents kits d'extraction d'ADN que les résultats obtenus en PCR q étaient meilleurs sur des échantillons concentrés que sur des échantillons de matières fécales contenant des oocystes non concentrés (Elwin et *al.*, 2012 b). Les techniques de concentration sont en effet connues pour éliminer les graisses et autres inhibiteurs de PCR, initialement présents dans les matières fécales.

b. Techniques de coloration

De nombreuses techniques de coloration sont disponibles.

Les colorations au bleu de méthylène-safranine, Heine ; Kinyoun, Ziehl-Neelsen modifiée et à la carbofuchsine-DMSO (Henriksen et Pohlenz 1981 ; Heine, 1982 ; Ma et Soave, 1983 ; Garcia et *al.*, 1983 ; Heuschele et *al.*, 1986 ; Tyzzer, 1910, 1912 ; Fayer et Xiao, 2007). ; Des fluorochromes, tels que l'auramine-rhodamine et l'auramine carbofuchsine, peuvent également être utilisés, ils sont très sensibles mais demeurent coûteux (FAYER et UNGAR, 1986 ; O'DONOGHUE, 1995). Il existe

également des colorations dites « négatives », comme le vert de malachite, la merbromine ou la nigrosine, qui colorent le fond, les bactéries et les levures mais pas les oocystes.

Dans de nombreux laboratoires, la technique de choix reste la coloration de Ziehl Neelsen modifiée (O'DONOGHUE, 1995).

➤ Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée (Z N M)

Cette coloration est une variante de la technique de Ziehl-Neelsen utilisée en bactériologie basée sur les propriétés de coloration alcoolo-acido-résistante de leur membrane (Baillargeon, 2004).

Elle se fait sur de simples frottis fécaux, obtenus directement ou après une technique de flottation.

Cette coloration par la fushine de Ziehl et le vert de malachite permet de visualiser les oocystes en rouge ou rose foncé sur un fond vert (ou bleu si la contre-coloration a été effectuée au bleu de méthylène) (Casemore et *al.*, 1985). Cette méthode est considérée comme la technique de coloration de référence (Chartier et *al.*, 2002 ; Fayer et Xiao, 2007). Elle est couramment utilisée dans les techniques de diagnostic puisqu'elle permet plus facilement de repérer, de reconnaître la morphologie et de compter les oocystes (Baillargeon, 2004).

L'inconvénient de cette technique est qu'il est possible de confondre les oocystes avec des levures, des spores de champignons ou des bactéries (Casemore, 1991).

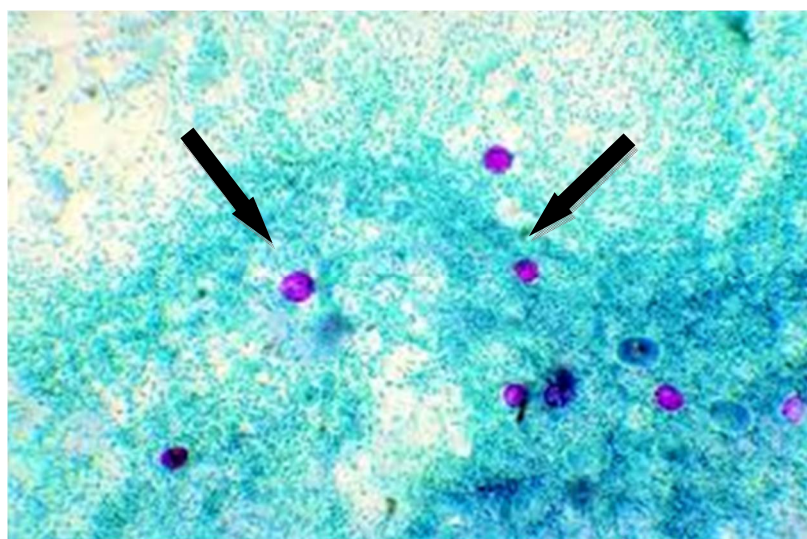


Figure2 : identification de *Cryptosporidium* révélée par la technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (Uberlândia, 2013)

c. Méthodes immunologiques

Différentes approches pour la détection immunologique des oocystes de cryptosporidies ont été décrites :

L'immunofluorescence, l'ELISA, l'immunochromatographie.

➤ Immunofluorescence directe

C'est une technique quantitative qui permet en plus de pouvoir visualiser les oocystes, les compter.

Des kits commerciaux utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface de l'oocyste couplés à un fluorophore (l'isothiocyanate de fluorescéine : FITC) sont largement utilisés (Fayer et Xiao, 2007). Une excitation UV utilisant un système de filtre FITC permet la visualisation des oocystes de cryptosporidies qui sont ronds ou légèrement ovoïdes et qui apparaissent vert.

Les kits commerciaux varient mais des témoins positifs/négatifs sont normalement inclus car il est important de toujours se référer au témoin positif pour s'assurer que les dimensions, la forme et la couleur de l'oocyste soient compatibles avec ceux du témoin positif.

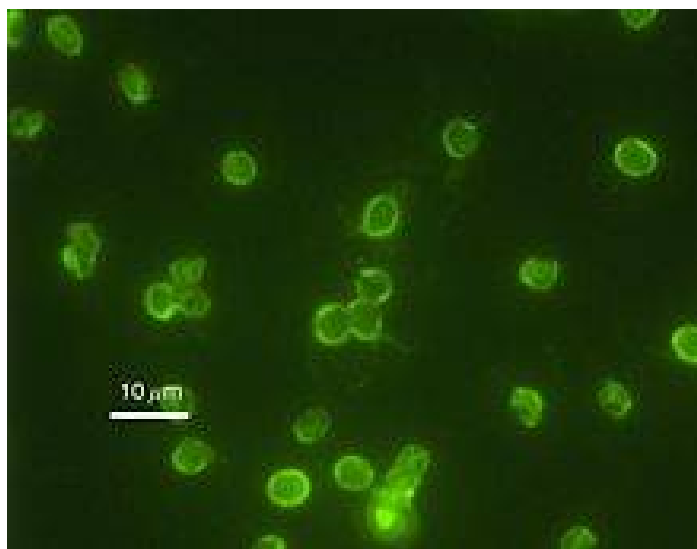


Figure 3: Oocystes de *Cryptosporidium spp* (éléments verts) observés en immunofluorescence (X400) (Anses Laboratoire de Niort, 2014)

➤ **ELISA**

Il s'agit de copro-antigène car dans ce cas, ce sont les antigènes de *Cryptosporidium spp* qui sont recherchés dans les fèces (Garcia et Shimizu, 1997 ; Johnston et *al.*, 2003 ; Fayer et Xiao, 2007).

Les copro-antigènes de cryptosporidies sont détectés et révélés par un mélange d'anticorps monoclonaux et polyclonaux.

Les kits commerciaux renferment tous les réactifs nécessaires à la réalisation de l'analyse et les instructions du fabricant (Fayer et Xiao, 2007).

Cette technique ne permet pas la quantification des oocystes (Chartier et *al.*, 2002).

➤ **Immunochromatographique**

C'est est une technique qualitative, voire semi-quantitative (Chartier et *al.*, 2013).

Des kits ont été mis au point pour détecter *Cryptosporidium spp*. Il s'agit de bandelettes sur lesquelles sont fixés des anticorps dirigés contre des antigènes solubles de *Cryptosporidium spp*.

Ces derniers, présents dans les matières fécales, migrent sur la membrane où sont fixés les anticorps. La liaison antigène-anticorps est révélée par une bande de couleur (Fayer et Xiao, 2007).

➤ **Avantage et inconvénients**

Différentes études sur la sensibilité et la spécificité de ces techniques ont été réalisées.

Les deux techniques de détection IF et ELISA, présentaient une spécificité élevée, comprise entre 96 et 100% (IF) et 98 et 100% (ELISAs), et une sensibilité comprise entre 98.5 et 100% (IF) et 94 et 97% (ELISAs), pour la détection d'oocystes de *Cryptosporidium spp*. (Jonhston et *al.* (2003))

Des études ont comparé quatre techniques immunologiques largement utilisées dans le diagnostic de la cryptosporidiose chez le veau (2 tests ELISA, IF et un kit IC). Les résultats ont rapporté que la technique d'IC était moins sensible (87%) et moins spécifique (91%) que les autres méthodes immunologiques (IF et ELISA) (Geurden et *al.*, 2008 b).

Les techniques immunologiques présentent généralement une plus grande spécificité que les techniques de coloration dans la détection de *Cryptosporidium spp* mais sont aussi moins rapides et plus coûteuses.

B. Biologie moléculaire

Les méthodes moléculaires, comme la PCR quantitative présentent une alternative à la détection du parasite.

La PCR quantitative ou PCR temps réel est la méthode la plus sensible qui permet d'identifier les animaux dans les stades les plus précoces de la maladie (DE WAELE et *al.*, 2010).

D'un point de vue épidémiologique, l'identification des espèces et sous types de *Cryptosporidium spp* n'est possible que par les techniques de biologie moléculaire (XIAO, 2010).

L'utilisation de ces méthodes trouve un intérêt en santé publique puisqu'elles permettent d'identifier les différentes espèces et génotypes de *Cryptosporidium* présents tant chez les animaux que dans les autres sources de parasites à l'origine d'une contamination humaine (XIAO, 2010).

IX. Méthode de lutte

1. Traitement

1.1. Traitements spécifiques

L'éradication du parasite dans l'organisme pose un important problème tant en santé humaine que vétérinaire. Ceci peut s'expliquer par la position qu'occupe le parasite dans les cellules hôtes (intracellulaire mais extracytoplasmique), Cette place le protège de l'action de très nombreuses molécules et explique en partie la résistance de celui-ci aux traitements disponibles sur le marché (Cacciò et Pozio, 2006, Stockdale, Spencer et Blagburn, 2007).

L'efficacité d'environ 200 molécules a été testée vis-à-vis de *Cryptosporidium spp* toutes espèces hôtes confondues et jusqu'à présent, la plupart se sont révélées être inefficaces (Rossignol, 2010 ; Shahiduzzaman et Dauschies, 2012).

Quelques substances peuvent réduire la multiplication parasitaire mais à des doses toxiques.

Chez l'homme deux substances ont été reconnus comme étant les plus efficaces

Il s'agit de parmomycine (de la famille des aminosides) et de nitazoxanide.

Chez l'animal il n'existe pas un traitement réellement efficace mais certaines molécules telles lactate d'halofuginone et sulfate de parmomycine peuvent réduire la mortalité dans un élevage jusqu'à 50%

1.2. Traitement symptomatique

En l'absence de traitement spécifique efficace, un traitement symptomatique de la diarrhée s'impose et qui consiste à mettre en place

- ❖ Une fluidothérapie intraveineuse, rétablissement de l'équilibre électrolytique et apport nutritionnel sont essentiels dans les formes bruyantes de la cryptosporidiose.
- ❖ L'utilisation de topiques intestinaux est recommandée afin de protéger la muqueuse intestinale. Le charbon active possède un fort pouvoir adsorbant, il est parfois conseillé (Chambon, 1990).
- ❖ Une antibiothérapie de couverture pour prévenir les surinfections, cependant certains auteurs conseillent de ne recourir aux antibiotiques qu'en cas de co-infections bactériennes.

Les antibiotiques agissent en effet sur la flore intestinale normale ce qui peut réduire la résistance aux cryptosporidies (Dubey et al. ,1990).

2. Prophylaxie

2.1. Sanitaire

Le contrôle de la cryptosporidiose est essentiellement prophylactique, avant que les animaux ne soient cliniquement atteints.

Les mesures d'hygiène sont essentielles pour minimiser le risque d'apparition de la cryptosporidiose en élevage et réduire la contamination de l'environnement par les animaux.

En effet, les principales mesures à respecter, dans le but de préserver un environnement le moins contaminé possible, est

- ✓ Retrait immédiat des déjections.
- ✓ Isolement des animaux malades.
- ✓ Traitement des animaux malades et en particulier ceux présentant un syndrome diarrhéique.
- ✓ Nettoyage et désinfection des locaux contaminés.

Les désinfectants de choix ont la capacité d'inactiver des ookystes infectieux tels que l'ammoniac (entre 5 et 10%) pendant 120 minutes et avec un assez court temps d'exposition (30 minutes) à 50% (Quilez et al, 2005) et le formol les produits à base de formol (10%).

Le respect de ces règles peut réduire de façon importante l'incidence d'un épisode de cryptosporidiose (Chartier, 2002).

La maîtrise hygiénique n'étant pas simple à adopter en raison de la grande résistance des oocystes dans l'environnement et des forts niveaux d'excrétion des jeunes, le recours à l'emploi de médicaments coûteux est souvent nécessaire pour limiter les pertes par mortalité ou par retard de croissance.

2.2.Médicale

Vaccination

A l'heure actuelle il n'existe aucun vaccin contre la cryptosporidiose clinique mais une étude réalisée chez les caprins, testant l'immunisation des mères avec un antigène de surface (des oocystes et sporozoïtes) de *C. parvum* a présenté des résultats encourageants (Sagodira et *al.*, 1999).

Il a été montré que les nouveau-nés recevant du colostrum des mères vaccinées ont excrété moins d'oocystes et n'ont pas développé de signes cliniques. (Sagodira et *al.*, 1999).

Les résultats peuvent être différents, en conditions naturelles, du fait que la concentration en anticorps dans le colostrum décroît de manière très rapide dans les premières 24 heures. De plus, dans les filières laitières (veaux, chevreaux), les animaux peuvent recevoir un mélange de colostrum moins riche en anticorps du fait d'être mis à l'allaitement artificiel rapidement après la naissance.

CONTEXTE EXPERIMENTAL

Objectif

La cryptosporidiose est une parasitose qui affecte plusieurs espèces animales.

Les caprins, et particulièrement les chevreaux, sont considérés comme l'espèce la plus sensible, avec des fréquences le plus souvent élevées et une mortalité pouvant atteindre 80% (Chartier, 1999).

Cette maladie a été jusqu'à ce jour très peu étudiée en Algérie chez l'espèce caprine.

Le présent travail a pour but d'évaluer la prévalence de cette parasitose chez les caprins dans la région de Bouira et de déterminer les facteurs de risque susceptibles de favoriser l'infection par *Cryptosporidium spp.*

L'étude s'appuie sur un échantillonnage de selles de caprins.

Chaque prélèvement de fèces a été soumis à deux tests de détection pour *Cryptosporidium spp.* à savoir la coloration de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz et la détection des antigènes de cryptosporidies par copro-ELISA

I. Cadre de l'étude

1. Description de la région étudiée

La wilaya de Bouira rassemble 45 communes et 12 daïra, elle est située dans la région de Kabylie, au Centre Nord du pays au sud-est d'Alger.

Elle s'étend sur une superficie de 4454 km².

Elle est bordée par les chaînes montagneuses du Djurdjura et des Bibans, et délimitée :

Au nord par les deux wilayas de Boumerdes et de Tizi-Ouzou ;

À l'est par les wilayas de Bejaia et de Bordj bouarreridj ;

Au sud par la wilaya de M'sila

À l'ouest par les wilayas de Médéa et de Blida.

Le relief de la région est accidenté, il est composé de vallées et de ravins.

La wilaya de Bouira jouit d'un climat méditerranéen caractérisé par un été chaud et sec qui s'étale du mois de juin au mois de septembre et un hiver froid et pluvieux allant du mois d'octobre au mois de Mai. La pluviométrie est favorable ; elle est de 660 mm/an au nord et de 400 mm/an dans la partie sud. Les températures varient entre 20 et 39 °C de mai à septembre et de 0 à 12 °C de janvier à mars.

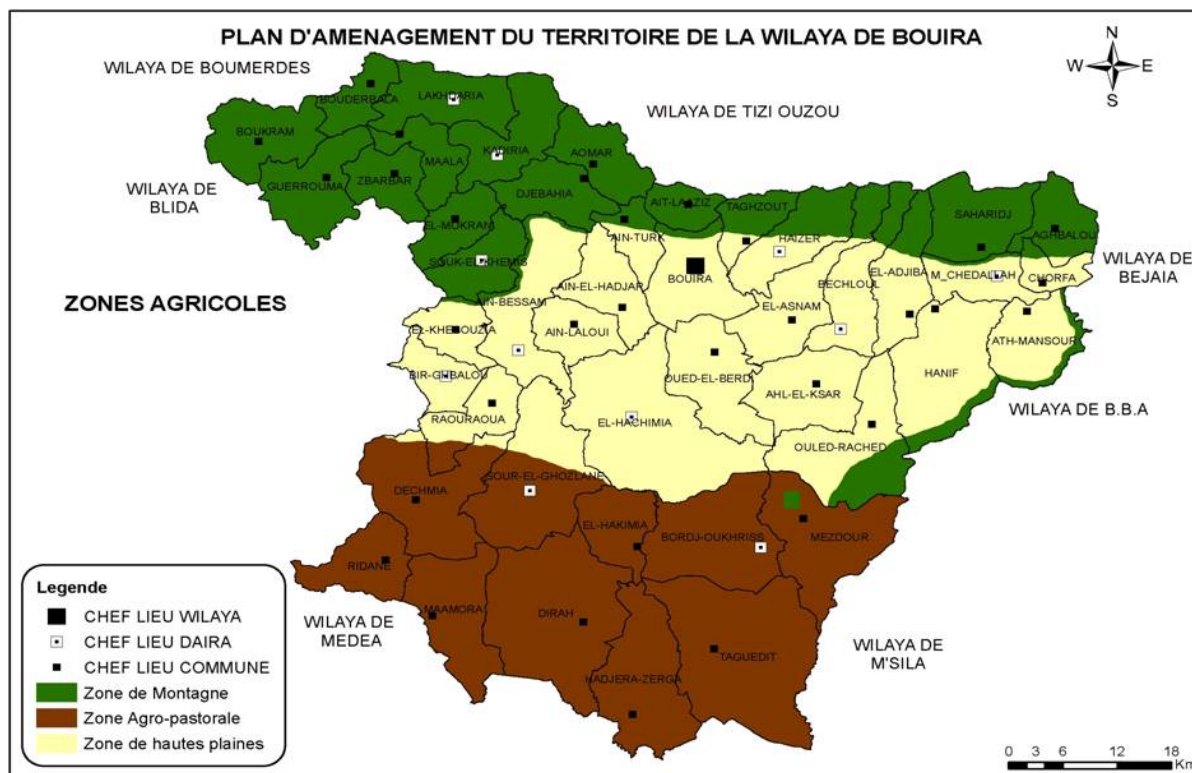


Figure 4 : Limites géographiques de la wilaya de Bouira

2. Description de l'élevage caprin prélevé

La région étudiée dispose de 4132 élevages caprins détenant 29 000 têtes (DSA, 2016)

Avec des élevages non déclarés qui ne bénéficient pas des programmes de développement par les pouvoirs publics.

La collecte des informations sur la localisation des élevages a été réalisée grâce à des contacts directs avec les subdivisions agricoles et les vétérinaires de la région.

Il est confirmé que l'élevage caprin dans cette région de montagne est de type extensif.

La race Arbia est la plus dominante, elle est présente dans 77.19 % des élevages enquêtés, caractérisée par une taille basse avec des longues oreilles pendantes et de poils longs, élevée principalement pour la viande à une production laitière faible de 1,5 litre par jour.

Cette production est destinée à la consommation familiale.

La race Saanen est retrouvée dans 22.81% dans les élevages prélevés.

Dans le cadre de notre étude, vingt-sept (27) élevages répartis sur cinq (5) communes à savoir : El Adjiba, O. Rached, Taguedit, Ain Laloui et Dechmia tirées au sort ont participé à cette étude, regroupant un nombre total de 171 caprins dont leur répartition géographique est représentée dans la carte ci-après

La collecte de fèces s'est déroulée du mois de septembre 2016 au mois de janvier 2017.



Figure 5 : Localisation géographique de territoires visités dans la wilaya de Bouira



Le tableau ci-après reprend le nombre des fermes prélevées par commune

Tableau 3 : Nombre d'élevages visités repartis sur les cinq communes

Communes		Nombre d'élevages prélevés	Nombre d'animaux prélevés
El Adjiba	01	1	05
O. Rached	02	7	46
Taguedit	03	10	65
Ain Laloui	04	1	04
Dechmia	05	8	51
Total		27	171

II. Matériel et méthodes

A. Animaux

1. Critère d'inclusion et d'exclusion

Les animaux prélevés dans le cadre de l'étude sont des animaux symptomatiques (présentant un syndrome diarrhéique) ou asymptomatiques (statut sain).

La race Arbia est essentiellement la plus présente dans les élevages visités.

Les femelles sont les plus présentes dans les élevages enquêtés.

L'échantillon comprenait 143 femelles et 28 mâles.

L'âge des caprins prélevés a été renseigné lors de l'échantillonnage, dans le but d'identifier d'éventuelles relations entre l'infection par *Cryptosporidium spp* et l'âge.

La population de 171 caprins qui ont fait l'objet de l'étude se compose de 72 animal âgés de moins de 4 mois ce qui représentent un taux de 42.10%, 54 âgés entre 4mois et 7mois correspondant à un taux de 31.58% et 45 animal plus de 7 mois représentant un taux de 26.32%.

Les tranches d'âge choisies dans ces élevages sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4: Les tranches d'âge retrouvées dans les élevages visités

Commune \ Âge	[15j -04mois [	[04mois-07mois [	[07mois- 24 mois]
El Adjiba	03	01	01
O. Rached	19	15	12
Taguedit	27	21	17
Ain Laloui	02	01	01
Dechmia	21	16	14
Total	72	54	45

Le graphique ci-dessous représente les tranches d'âges des animaux qui ont fait l'objet de l'étude.

Proportion en fonction de la tranche d'âge

■ [15j-04mois[■ [04màis-07mois[■ [07mois-24mois]

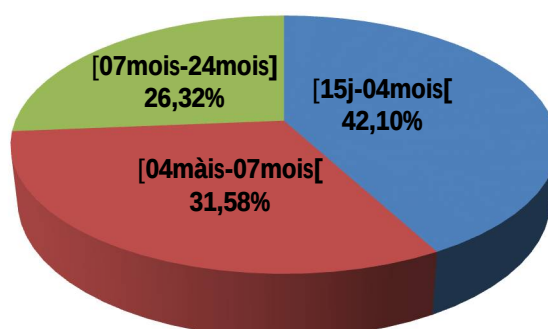


Figure 6 : Répartition des animaux en fonction de l'âge.

Les animaux malades ou présentant une symptomatologie autre qu'un syndrome diarrhéique sont exclus de l'étude.

Les femelles gestantes ou ayant récemment mis bas ont été incluses dans l'étude

2. Renseignements sur les élevages

Chaque élevage visé dans le cadre de cette étude a fait l'objet d'une enquête épidémiologique descriptive au moyen d'un questionnaire adressé aux éleveurs des fermes prélevées portant essentiellement sur les conditions d'élevage et les mesures d'hygiène.

Les éleveurs concernés par l'étude ont renseigné le questionnaire pour les informations suivantes (voir annexe 04) :

- ❖ L'âge des animaux concernés.
- ❖ La race et le sexe des animaux prélevés.
- ❖ Type de supplémentation alimentaire distribuée aux animaux.
- ❖ L'origine de l'eau distribuée aux animaux.
- ❖ Modalités de nettoyage et de désinfection.

les données collectées sur le terrain ont été enregistrées dans une base de données conçue avec le logiciel Microsoft Excel.

a. Conduite d'élevage

Les conditions d'élevage jouent un rôle très important dans l'apparition et la dissémination de la cryptosporidiose, telles que le mélange d'âges et d'espèces animales différentes (ovins, veaux), l'origine de l'eau distribuée aux animaux mais surtout les modalités de nettoyage et de désinfection.

Dans la majorité des élevages visités, il a été observé que les animaux sont logés dans des bâtiments sous forme de simples hangars en dur ou sous forme de bâtiments simples en bois. L'étable moderne n'est pas présente.

Généralement, les bâtiments ont un aspect très sale ce qui reflète une mauvaise hygiène et le non respect des mesures prophylactiques et de propreté.

Presque dans plus de 81% des élevages enquêtés le changement de la litière associé à un nettoyage est pratiqué de façon irrégulière.

Aucun élevage inclus dans cette étude n'utilise de produit de désinfection auquel les coccidies et cryptosporidies sont sensibles

Les aires de couchage sont glissantes en raison de l'insuffisance et même parfois de l'inexistence de litière sur le sol.

L'élevage caprin dans ces régions est de type extensif.

L'alimentation du troupeau est basée essentiellement sur le pâturage, auquel les éleveurs ajoutent une complémentation généralement du grignon d'olive, ou des drèches de brasserie.

L'eau de robinet est distribuée aux animaux à volonté. Dans la totalité des élevages, les récipients contenant l'eau ne sont pas soumis à un nettoyage régulier.

Les animaux malades présentant un syndrome autre que la diarrhée sont exclus de l'étude, seul trois cas de gestation ont été rapportés.

b. Matériels Utilisés

Les fèces sont considérées comme des matières à risque potentielles. En effet, elles peuvent renfermer des agents de zoonoses majeures. C'est pourquoi, on a effectué le prélèvement tout en respectant les consignes de sécurité.

Il est recommandé de porter des gants, et de procéder à une désinfection soigneuse des mains après manipulation. Le matériel utilisé sera de préférence à usage unique, jeté immédiatement après usage. S'il devait être réutilisé (verrerie...), il faut le nettoyer et le désinfecter immédiatement après usage pour prévenir le risque de contamination mais aussi pour éviter les faux positifs lors de manipulations ultérieures.

1. Matériel utilisé pour la réalisation des prélèvements

- ❖ Pots en plastique stériles hermétiquement fermé pour les prélèvements des matières fécales.
- ❖ Etiquettes autocollantes pour inscrire les renseignements.
- ❖ Paires de gants.
- ❖ Curette pour la récupération des matières fécales.

2. Matériel utilisé pour la coproscopie

1) Technique d'enrichissement : technique de Ritchie simplifiée

- ❖ Verre à pied conique.
- ❖ Agitateur en métal
- ❖ Lames porte-objets
- ❖ Lamelles 22x22 mm
- ❖ Portoirs
- ❖ Pissette
- ❖ Pipette Pasteur
- ❖ Tubes coniques en plastique avec bouchon en caoutchouc
- ❖ Centrifugeuse
- ❖ Microscope optique

2) Coloration de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz

- ❖ Lames
- ❖ Bacs à coloration
- ❖ Porte lame
- ❖ Minuterie
- ❖ Microscope optique
- ❖ Eau de robinet

3. Matériel utilisé pour le test ELISA

Composition de la trousse :

1. Deux microplaques de 96 puits sensibilisées (12 ×8)
2. Solution de lavage concentrée (20x)
3. Tampon de dilution (5x)
4. Conjugué
5. Antigène de contrôle
6. Solution de révélation (TMB mono-composant)
7. Solution d'arrêt
8. Contrôle Positif

Équipements requis

1. Eau distillée
2. Cylindre gradué
3. Béchers
4. Tube à essai
5. Portoir pour tubes
6. Pipette automatique
7. Lecteur de microplaque

B. Méthode de prélèvement et d'analyse

I. Méthode de prélèvement

Les matières fécales ont été recueillies dès leurs émissions, ou après stimulation de la défécation

Les échantillons ont été récoltés dans des pots stériles à usage unique, et fermés hermétiquement et étiquetés.

Chaque prélèvement a été identifié par un numéro sur une étiquette.

La numérotation des échantillons s'échelonne 1 à 171

Les selles ont été conservées dans du bichromate de potassium à 2,5% à +4°C jusqu'à leur analyse parasitologique.

II. Méthodes utilisées

a) Choix de la méthode

Pour la réalisation de ce travail et pour la recherche des cryptosporidies, deux techniques ont été utilisées.

Il s'agit de la technique de coloration de Ziehl – Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz et la méthode copro- ELISA.

Ces deux techniques sont connues pour leur spécificité et leur sensibilité (Bussieras et Chermette, 1991)

1) Technique de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley

C'est une technique polyvalente réalisée systématiquement, pour chaque prélèvement diarrhéique ou non.

Principe

C'est une méthode diphasique (physico-chimique), qui met en jeu la balance hydrophilelipophile du parasite. Elle découle de celle de Telemann (1908) qui diluait les selles dans un mélange égal d'éther et d'acide chlorhydrique.

2) Technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz

C'est la technique de coloration de référence utilisée pour l'identification spécifique des cryptosporidies.

Elle met en évidence le caractère acido-alcool-résistance en prenant compte la difficulté de pénétration des colorants.

Elle comporte trois phases :

- ✓ Application d'un colorant énergique.
- ✓ Décoloration par un acide puis à l'alcool
- ✓ Recoloration, de contraste

3) Test ELISA en sandwich

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits sont sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique des oocystes de *Cryptosporidium*.

Les lignes B, D, F et H sont sensibilisées avec un anticorps monoclonal non spécifique du parasite.

Les échantillons de matières fécales à tester sont, dilués dans le tampon de dilution distribués dans les cupules et incubées durant 1h.

Un conjugué anti oocystes de *Cryptosporidium* couplé à la peroxydase est ajouté après l'incubation et le lavage de la préparation.

Après d'une seconde incubation et d'un second lavage on ajoute la solution de révélation incolore (TMB)

En cas de présence de *Cryptosporidium* dans l'échantillon une coloration bleue apparaît qui devient jaune après l'application de la solution d'arrêt.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la teneur en oocyste de l'échantillon.

La lecture est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm.

4) Analyses statistiques

Les prévalences calculées ont été estimées à 95% d'intervalle de confiance. La prévalence des caprins positifs à *Cryptosporidium spp* en fonction de différents facteurs de risque a été évaluée en utilisant un test du χ^2 , ou un test exact de Fisher lorsque les conditions du Chi2 (χ^2) n'étaient pas remplies (les effectifs calculés doivent être supérieur à 5).

L'obtention d'une différence statistiquement significative est acceptée lorsque la p value calculée est inférieure à 0,05 ($p < 0,05$).

Les résultats obtenus par les deux méthodes diagnostiques ont été évalués par un test de Mc Nemar

Le degré d'agrément entre les méthodes a été calculé via le coefficient de Kappa afin d'évaluer l'accord entre chacune des méthodes de détection.

Le test de Kappa est considéré comme significatif lorsque la valeur κ est proche de 1

Le coefficient κ est toujours compris entre -1 et 1 (accord maximal).

Généralement, on utilise l'échelle suivante (Selon Landis et Koch) pour interpréter la valeur κ obtenue :

- ✓ < 0 Grand désaccord
- ✓ 0.00 – 0.20 Accord très faible
- ✓ 0.21 – 0.40 Accord faible
- ✓ 0.41 – 0.60 Accord moyen
- ✓ 0.61 – 0.80 Accord satisfaisant
- ✓ 0.81 – 1.00 Accord excellent

Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel XLSTAT.

III. Résultats

1. Prévalence de *Cryptosporidium spp*

Pour étudier la prévalence des infections par *cryptosporidium spp*, nous avons utilisé deux techniques différentes : la coloration de Ziehl Neelsen qui est une technique de diagnostic direct permettant la mise en évidence des oocystes de *Cryptosporidium* et le test ELISA en sandwich qui est une méthode de diagnostic immuno enzymatique utilisée pour la détection des copro-antigènes de cryptosporidies.

a. Prévalence de *Cryptosporidium spp* par la technique de Ziehl Neelsen

L'étude a été réalisée sur 171 caprins âgés entre 15 j et 24 mois. Les lames ont subi trois lectures.

Les méthodes utilisées (Technique de Ritchie simplifiée et la technique de Ziehl-Neelsen modifiée) ont permis de mettre en évidence la présence de *Cryptosporidium spp* dans 62 échantillons correspondant à une prévalence est de 36.26 % (IC95% [29.06% – 43.46%])

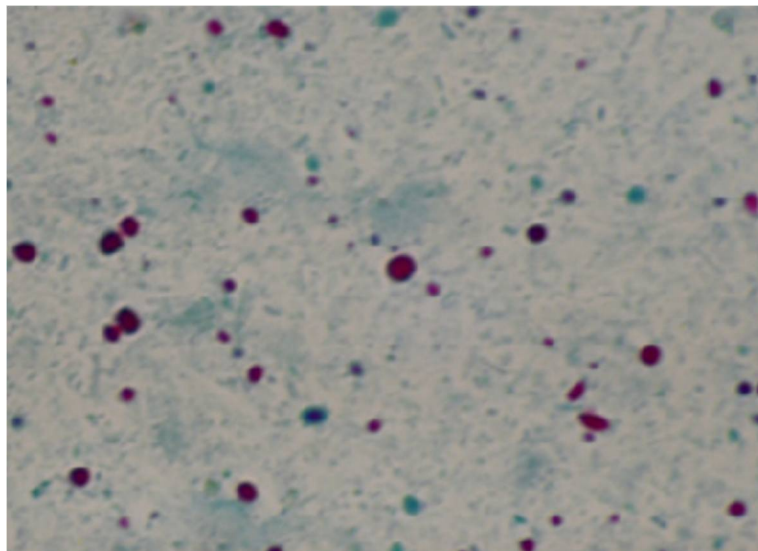


Figure 7 : Mise en évidence des oocystes de *Cryptosporidium spp* par coloration de Ziehl Neelsen modifiée

La figure ci-après représente la prévalence de la cryptosporidiose caprine dans les régions visitées.

Prévalence de *Cryptosporidium spp* par coloration de Ziehl Neelsen modifié

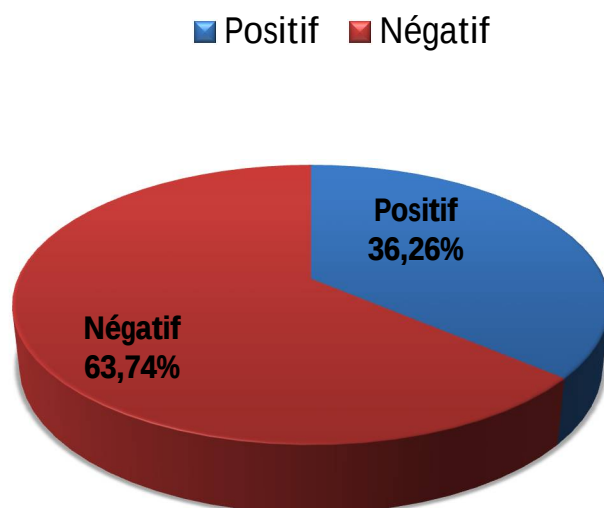


Figure 8 : prévalence de *Cryptosporidium spp* par la technique de Ziehl Neelsen modifiée.

b. Prévalence de *Cryptosporidium spp* par le test copro-ELISA

Au total, 171 échantillons de matière fécale de caprins ont été analysés.

Les résultats ont révélé que 65 caprins étaient positifs pour *Cryptosporidium spp*, correspondant à une prévalence globale de 38 % (IC95% [30.73% – 45.27%]).

La prévalence est représentée dans la figure ci-dessous :

Prévalence de *Cryptosporidium spp* par copro-ELISA

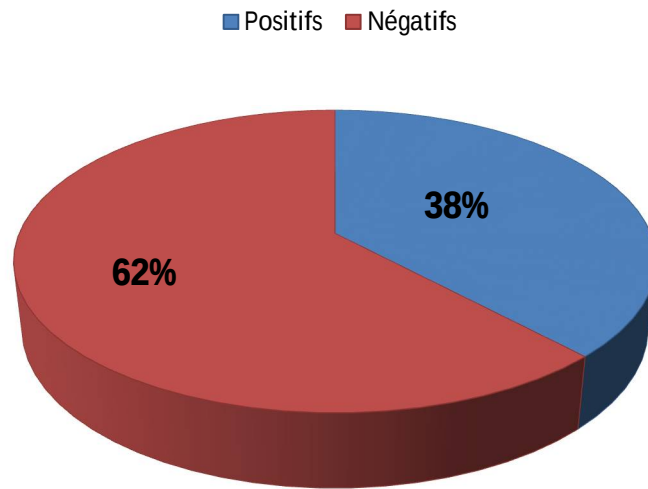


Figure 9 : Prévalence de *Cryptosporidium spp* par le test copro-ELISA

2. Analyse des facteurs de risque liés à l'infection par *Cryptosporidium spp*

Cette analyse établie sur les résultats de l'étude de la prévalence de *Cryptosporidium spp* par le test copro-ELISA, elle nous a permis d'identifier les facteurs qui semblent augmenter le risque de l'infection par *cryptosporidium spp.* :

- Il n'y a pas de différence statistiquement significative dans la prévalence vis-à-vis de *Cryptosporidium spp.* entre les deux sexes ($p > 0,05$) ; en effet, les mâles et les femelles semblent être infectés de façon identique.
- Aucune relation significative n'a été mise en évidence entre l'infection par *Cryptosporidium spp.* et la race des caprins.
- En revanche, une différence statistiquement significative a été observée en fonction de l'âge des animaux ($p < 0,05$). En effet, le taux de positivité semble augmenter avec l'âge ($P=0.001$).

Les jeunes âgés de moins de 4 mois ont montré une prévalence de 68,06%, cette dernière a été de 22, 22% chez les animaux avec une tranche d'âge

comprise entre 4 et 7 mois et de 8,89% chez les caprins âgés de plus de 7 mois.

Or, on constate que la proportion des caprins infectés par *Cryptosporidium spp.* diminue avec l'âge.

- Dans la plupart des élevages visités, les mesures d'hygiène étaient mauvaises ce qui favorisent l'infection par *cryptosporidium.spp.* En effet, la prévalence a varié de façon statistiquement significative en fonction de l'état d'hygiène de l'élevage ($p < 0,01$). Plus l'état d'hygiène de l'élevage est mauvais, plus la prévalence est élevée.

Les résultats obtenus de l'analyse statistique des facteurs de risque supposés liés à l'infection par *cryptosporidium.Spp* sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau 5 : Les paramètres de l'analyse statistique de facteurs de risque

Variable	n	Prévalence % (IC95%)	P value	Significati on
Sexe			0.31	Non significatif
Femelles	143	36.36 (28.48-44.24)		
Mâles	28	46.43 (27.51-66.13)		
Race			0.55	Non significatif
Arbia	132	36.36 (28.15-44.57)		
Saanen	39	43.59 (27.81-60.38)		
Âge			0.001	Significatif

15j-4mois	72	68.06 (57.3- 78.82)		
4mois-7mois	54	22.22 (11.13 -33.31)		
Plus de 7mois	45	8.89 (2.48- 21.22)		
État d'hygiène			0.011	Significatif
Moyen	52	21.15 (10.06- 32.24)		
Mauvais	119	45.37 (36.43- 54.31)		

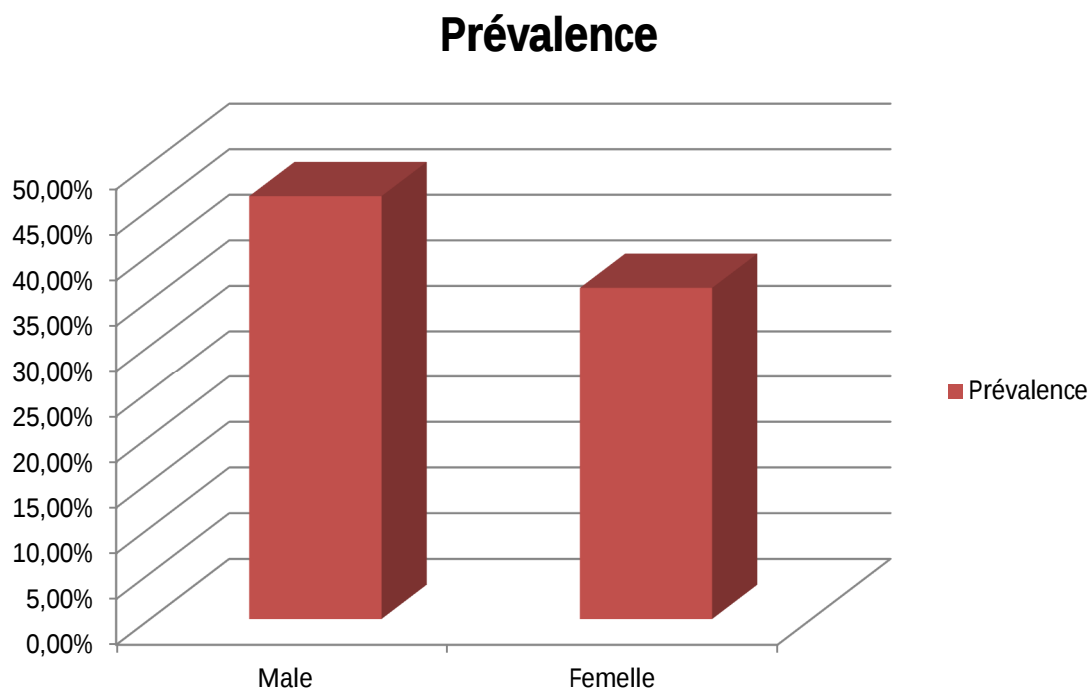


Figure 10 : Prévalence de *Cryptosporidium* spp en fonction du sexe de l'animal

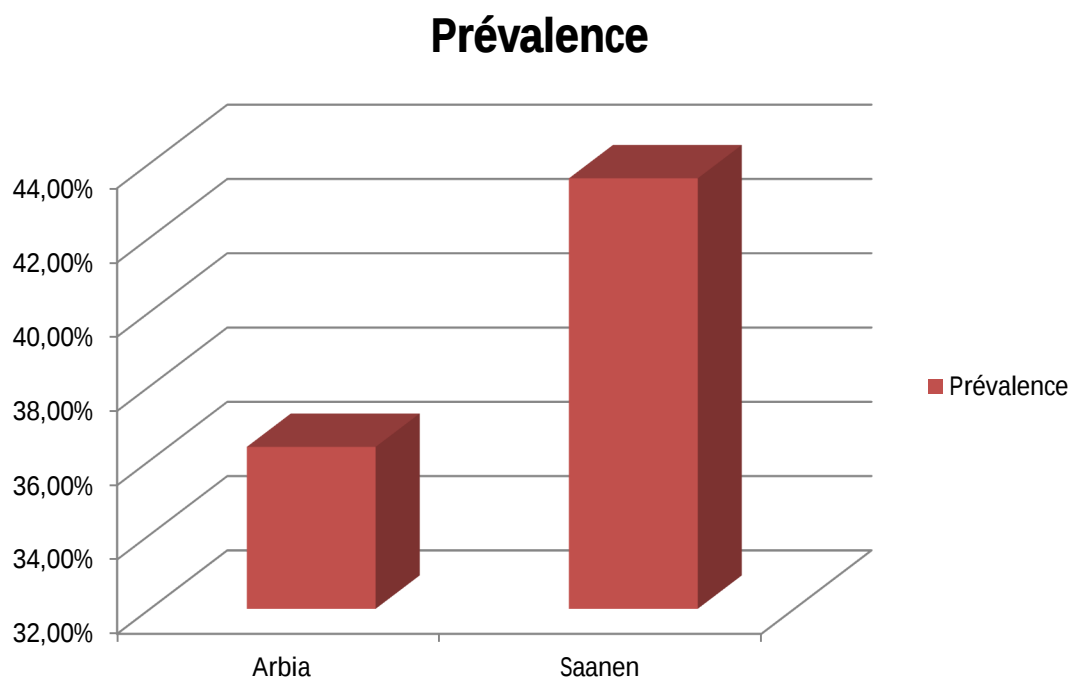


Figure 11 : Prévalence de *Cryptosporidium spp* en fonction de la race

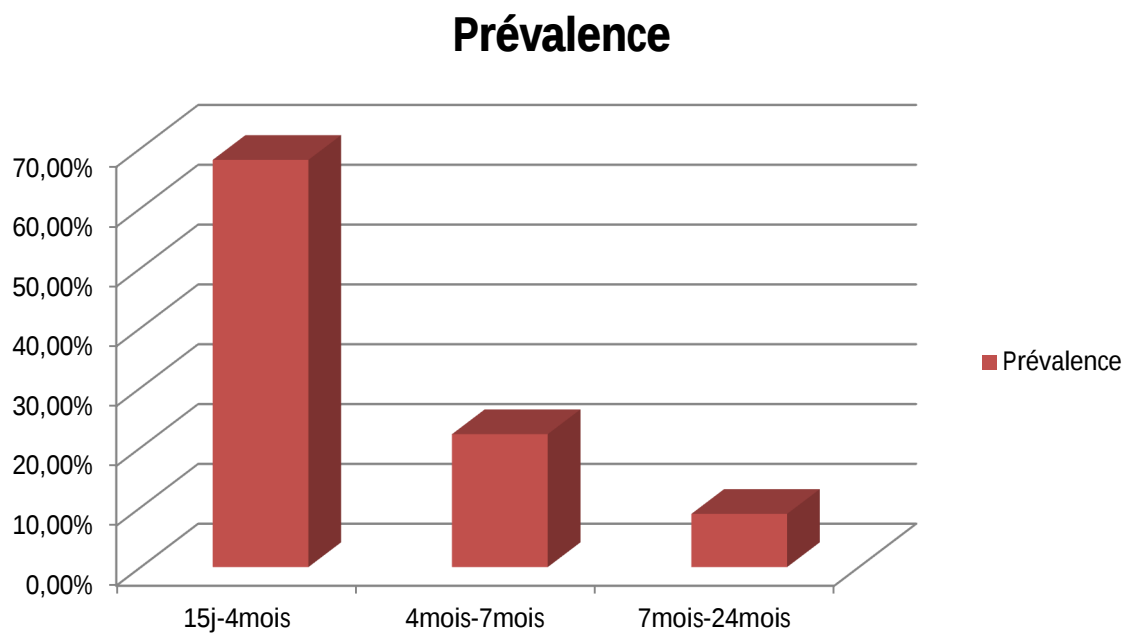


Figure 12 : Prévalence de *Cryptosporidium spp* en fonction de l'âge

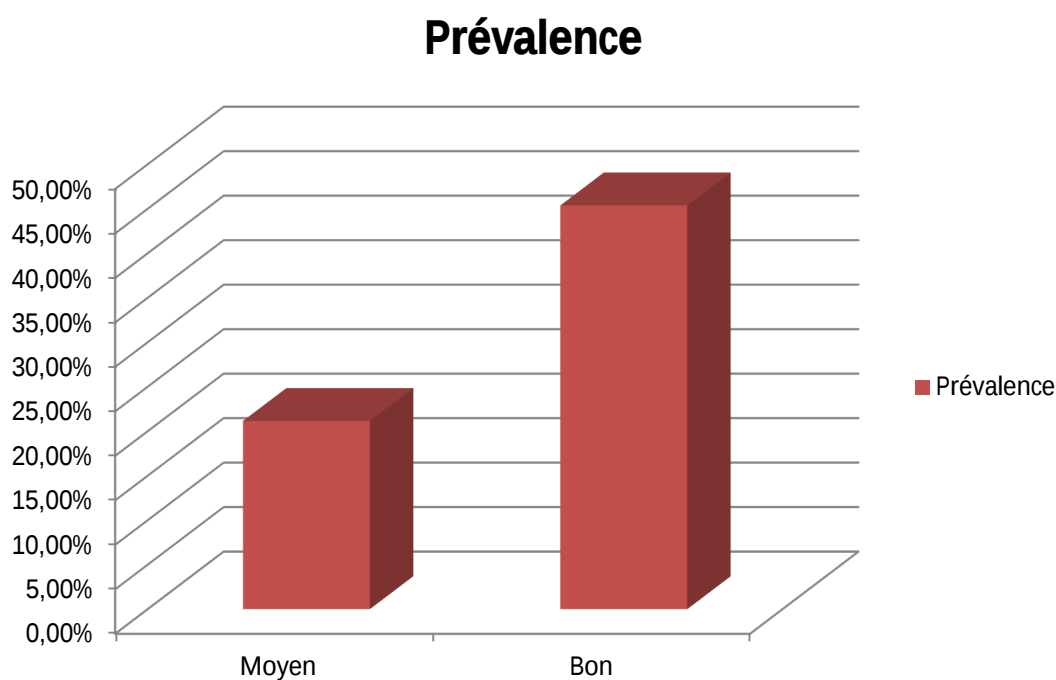


Figure 13 : Prévalence de *Cryptosporidium spp* selon l'état d'hygiène

III. Comparaison des deux méthodes (coloration de ziehl Neelsen modifié et copro-ELISA) dans le diagnostic de *Cryptosporidium spp*

Dans la présente étude, deux méthodes ont été désignées pour la détection de *Cryptosporidium spp* dans les matières fécales des caprins.

Ces deux méthodes de détection ont été comparées entre elles par analyse statistique via l'utilisation du test de McNemar et du calcul du coefficient de kappa de cohen.

Le test copro- ELISA a été considéré comme le test de référence.

Le tableau suivant reprend avec détail les résultats de la comparaison des deux méthodes

Tableau 6 : Comparaison des deux méthodes (coloration ZNM et le test copro-ELISA)

		Test copro-ELISA		
		Positif	Négatif	Total
Coloration de Ziehl Neelsen Modifiée	Positif	59	03	62
	Négatif	06	103	109
	Total	65	106	171

Le tableau suivant met en évidence les paramètres calculés pour évaluer la performance du test ZNM comparé au test Copro-ELISA.

Tableau 7 : Paramètres de comparaison des deux techniques

Critères	Valeurs
Sensibilité	90,77% [86,38% - 95,11%]
Spécificité	97,17% [94,68 - 99,66]
Exactitude relative	94,74% [91,40 - 98,08]
Coefficient Kappa	0,887
Test de McNemar	0,20
Taux de faux positif	2,83% [0,34 – 5,32]
Taux de faux négatif	9,23% [4,89 - 13,57]
Valeur prédictive positive	0.95
Valeur prédictive négative	0.94

Pour la méthode de Ziehl Neelsen modifiée, la sensibilité et la spécificité calculées en utilisant le test copro-ELISA comme test de référence, ont montré des valeurs de 90,77% et 97,17% respectivement (tableau 7).

Sur base de ces résultats, on constate que si on prend en compte le coefficient kappa de cohen ($k=0,88$), nous observons une bonne concordance entre les deux tests utilisés.

La valeur de kappa est très proche de 1 ce qui signifie un accord presque parfait (Selon Landis et Koch)

Par ailleurs, le test de Mc Nemar ($p=0,2$) n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les deux tests.

Une valeur prédictive positive de 0,95 signifie que les animaux ont 95% de risque d'être malades quand ils sont positifs au test de dépistage ZNM.

Une valeur prédictive négative de 0,94 signifie que les animaux ont 94% de chance de ne pas être atteint de la cryptosporidiose quand le test de dépistage de ZNM est négatif.

IV. Discussion

1. Analyse critique

a. Protocole

❖ Échantillonnage

Les études de prévalence vis-à-vis de *Cryptosporidium spp* chez le caprin décrites dans la littérature montrent des échantillonnages de tailles diverses.

Les populations étudiées peuvent être de taille très grande, comme dans l'étude de Delafosse et al (2003) durant laquelle 879 caprins ont été collectés.

Elles peuvent être de taille plus ou moins faible telle les 41 caprins utilisés dans l'étude d'Akinkuotu et al (2014).

La présente étude possède un effectif de 171 caprins, issus de 27 élevages différents cette taille est proche de celle utilisée dans l'étude de Baroudi et al (2011) effectuée dans la région d'Alger où il a prélevé 211 échantillons de caprins, Nous considérons que l'échantillon prélevé est assez représentatif de la population caprine de la région de Bouira, ce qui permet de donner un aperçu plus ou moins réel sur la prévalence de *Cryptosporidium spp* chez cette espèce animale.

Dans la littérature, certaines études consacrées à la prévalence de *Cryptosporidium spp* ont effectué des prélèvements répétés, c'est dans ce sens que l'étude de Sanz et al (2009) s'est déroulée : deux prélèvements de selles ont été réalisés pour chaque animal afin d'évaluer la prévalence de *Cryptosporidium spp* durant une période de sept mois.

La contribution des élevages à cette étude est liée à la volonté des éleveurs, les prétextes de refus ou d'acceptation sont parfois liés à la manière de gestion des

élevages, d'où une proportion non négligeable de la population qui ne peut être étudiée ce qui crée un certain biais de sélection. De là, la valeur de l'échantillon testé est discutable.

Vu que la période prépatente de *Cryptosporidium spp* est comprise entre 2 à 14 jours (Kirkpatrick et Dubey 1987), et d'autre part, sachant que la durée d'excrétion de ce parasite est intermittente (Lloyd et Smith 1997), il aurait été souhaitable de réaliser 2 prélèvements par animal à 15 jours d'intervalle. Dans notre étude on s'est contenté d'un seul prélèvement en raison de la réticence de la majorité des éleveurs d'une part, et de la durée limitée de l'étude d'autre part.

❖ **Choix de la méthode de détection de *Cryptosporidium spp***

Dans cette étude, nous avons utilisé deux tests de diagnostic. La première méthode utilisée est la méthode classique qui permet la recherche des oocystes de *Cryptosporidium spp* dans les fèces des animaux. Elle a été choisie pour sa facilité d'utilisation et pour sa rapidité dans l'exécution et dans l'obtention du résultat.

En effet, la technique de coloration de Ziehl Neelsen (ZNM) modifiée est une technique simple et rapide à réaliser Elle permet en outre une lecture facile, elle est un outil avantageux et moins coûteux.

L'inconvénient de cette technique est sa mise en œuvre fastidieuse lorsqu'un grand nombre d'échantillon doit être analysé. Son interprétation demeure en grande partie subjective.

En outre, il est possible de confondre les oocystes avec des artefacts (taches de colorants) ou avec d'autres micro-organismes (des levures notamment) ce qui augmente le taux de faux positifs.

On retiendra que la coloration de ZNM n'est pas complètement spécifique des cryptosporidies mais colore également *Cyclospora Spp*. (Bellagra, 1998)

La sensibilité de la coloration de ZNM varie de 75% à 100% pour une spécificité de 95%. (Garcia et al. , 2000 ; Johnston et al., 2003 ; Chalmers et al., 2011 ; Khurana et al., 2012)

Dans une étude comparative réalisée au Royaume-Uni en 2011 par Chalmers et al., la coloration de Ziehl Neelsen modifiée présente une sensibilité assez modérée, elle a été évaluée à 75,7%.

La deuxième méthode utilisée dans cette étude est le test copro-ELISA.

Il s'agit d'une technique simple à réaliser avec une sensibilité et une spécificité accrues de 94 et 97% et 98 à 100% respectivement (Jonhston et *al.*, 2003).

Par ailleurs, ce test est adaptable à de grandes séries (permet d'analyser un grand nombre d'échantillon en peu de temps).

En revanche il est coûteux, en plus les erreurs liées à la manipulation sont amplifiées par la réaction enzymatique (JACOBSON et *al.*, 1982)

b. Étude des facteurs de risque liés à la prévalence vis-à-vis de *Cryptosporidium spp*

❖ Sexe

Dans la présente étude on ne met pas en évidence de lien entre l'infection par *Cryptosporidium spp* et le sexe de l'animal ce qui est compatible avec ce qui a été rapporté dans la littérature (Venu et *al.*, 2013)

❖ Race

La prévalence de *cryptosporidium spp* n'a pas varié de façon significative en fonction de la race du caprin, ceci est compatible avec les études d'autres auteurs (Romero-Salas et *al.*, 2016).

❖ Âge

Dans notre étude nous avons pu mettre en évidence une relation entre l'âge des animaux et l'infection par *Cryptosporidium spp*

L'analyse statistique a montré que l'infection par *Cryptosporidium spp* était plus prévalente chez les animaux de moins de 4 mois.

Durant cette étude, la plupart des animaux excréteurs du parasite avaient moins de 4 mois.

En effet, plus de 68% des animaux dont l'âge est moins de 4mois ont excrété le parasite dans leurs fèces

Ces résultats sont similaires à ceux décrit dans la littérature montrant que les jeunes caprins étant les plus excréteurs (Santín et Trout dans Fayer et Xiao, 2007 ; Castro-Hermida et *al.*, 2007 a et b; Geurden et *al.*, 2008 a ; Paraud et *al.*, 2009).

En outre, dans cette étude on a rapporté une prévalence de plus de 22% chez les

caprins sevrés de moins de 7 mois ce qui est conforme à une étude réalisée en France par Rieux (2013) qui a observé une prévalence de 28% chez des caprins sevrés âgés moins de 6 mois.

Concernant les chèvres adultes, les données disponibles dans la littérature sont moins nombreuses.

Une étude réalisée au Sri-Lanka a montré que la prévalence chez les chèvres adultes dont l'âge est plus d'un an pourrait atteindre 25% (Noordeen et *al.*, 2000).

Une autre étude réalisée par Castro et *al.* (2007 a et b) en Espagne, a rapporté une prévalence d'infection chez les chèvres adultes de l'ordre de 7.7 à 9%.

Lors de cette étude une prévalence de 8.88% a été décrite chez les chèvres adultes, ces données sont également en accord avec les quelques études décrites dans la littérature.

❖ Conditions d'hygiène

La prévalence de *cryptosporidium spp* dans les élevages a varié selon l'état d'hygiène. Plus l'état d'hygiène de l'élevage est bon plus la prévalence de la cryptosporidiose diminue.

Presque dans tous les élevages visités les mesures d'hygiène étaient mauvaises favorisant ainsi l'infection par *cryptosporidium spp*.

.

V. Conclusion et perspectives

La cryptosporidiose caprine est une protozoose à répartition mondiale.

Le protozoaire est présent chez les caprins, avec une fréquence importante (peut arriver jusqu'à 43%).

Notre étude a mis en évidence la présence de cryptosporidies au sein des élevages caprins visités, ce qui a permis d'estimer la prévalence dans la région de Bouira.

Nous avons confirmé la forte prévalence (68%) de *Cryptosporidium spp* chez les jeunes caprins âgés de moins de 4mois.

L'infection débute très tôt et évolue en diminuant rapidement avec l'âge des animaux.

En conclusion, notre travail a montré que la méthode de coloration ZNM a présenté une bonne performance pour le diagnostic de l'infection par *Cryptosporidium spp*, ce qui permet de la recommander à l'état actuel de nos connaissances comme un outil suffisant et efficace dans le diagnostic de cette infection.

Il est important de réaliser d'autres études sur ce parasite chez le caprin afin de rechercher d'autres éléments qui restent encore méconnus tels que l'association de ce parasite avec d'autres entéropathogènes.

Il serait très intéressant de réaliser d'autres études épidémiologiques dans diverses régions du pays, afin d'acquérir des connaissances plus approfondies sur cette parasitose.

Des méthodes de biologie moléculaire identifiant exactement les espèces impliquées au début de l'infection ont une importance particulière dans la détermination du risque zoonotique de la cryptosporidiose caprine.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- ABE, N., SAWANO, Y., YAMADA, K., KIMATA, I., ISEKI, M., 2002, Cryptosporidium infection in dogs in Osaka, Japan. Veterinary Parasitology pp108, 185-193.
- BAILLARGEON, J., 2004, Étude sur la contamination du colostrum bovin par des ookystes de Cryptosporidium parvum. Mémoire de maîtrise. Université de Montréal.. BARR F. (1997) Cryptosporidiosis. Small Anim. Pract., vol 38 (7) : pp 319-320.
- 7. BARTA R.J. and ANDREW THOMPSON R.C. (2006) What is Cryptosporidium ? Reappraising its biology and phylogenetic affinities. Trends in parasitology, vol 22(10) : pp 463-468.
- 8. BLEWETT D.A., WRIGHT S.E., CASEMORE D.P., BOOTH .E., JONE C.E. (1993) Infective dose size studies on Cryptosporidium parvum using gnotobiotic lambs. Water science and technology, vol 27 : pp 61-64.
- 10. BUGG R.J., ROBERTSON I.D., ELLIOT A.D., THOMSON C.A. (1999) Gastrointestinal parasites of urban dogs in Perth, Western Australia. Vet. J., vol 157 : pp 295-301.
- 11. BUKHARI, Z., SMITH, H. V., 1995, Effect of three concentration techniques on viability of Cryptosporidium parvum oocysts recovered from bovine feces. Journal of Microbiology vol 33, 10: pp 2592-2595.
- BUSSIERAS J. et CHERMETTE R. (1991) Parasitologie vétérinaire, parasitologie générale. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie. P 75 .
- 13. CARRENO R.A. , MATRIN D.S. , BARTA J.R. cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitology Research, 1999, vol 85, pp. 899-904.
- CHAMBON F (1990) la cryptosporidiose du chevreau enquête et essai thérapeutique , Thes. Med Vet., Nantes p145
- 16. CHALMERS, R. M., DAVIES, A. P., 2010, Minireview: Clinical cryptosporidiosis. Experimental Parasitology vol 124, pp 138–146.
- 17. CHARTIER C., (2002a), La cryptosporidiose des petits ruminants, Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine, 118-122.
- 18. CHARTIER C. (2002b) La coccidiose des petits ruminants, Le point vétérinaire Pathologie ovine et caprine, 112-117
- CIRAK V.Y. et BAUER C. (2004) Comparison of conventional coproscopical methods and commercial coproantigen ELISA kits for the detection of Giardia and Cryptosporidium infections in dogs and cats. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr., vol 117 : pp 410-413. 21. COLE, D.J., COHEN, N.D., SNOWDEN, K., SMITH, R. - Prevalence and risk factors

for fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in horses.-Journal of the American Veterinary Medical Association, 1998, 213, 9, pp 1296-1302.

- CORDELL R.L., ADDISS D.G. Cryptosporidiosis in child care settings: a review of the literature and recommendations for prevention and control. *Pediatric Infectious Disease journal*, 1994, vol. 13, pp. 310-317.
- DEROUIN F., ELIASZEWICZ M., POUILLOT R., ROZE S. (2002) Rapport sur les « Infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau » : « Evaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium* sp. » 26. DUBEY J.P., SPEER C.A., FAYER R., (1990), *Cryptosporidiosis of man and animals*, Boston : Raton et Arbor, p199.
- EL-HOHARY A.H., ABDEL-LATIF A.M.(1998) Zoonotic importance of *Cryptosporidiosis* among some animals at Gharbia Province in Egypt. *Indian J. Anim. Sci.*, vol 68 : pp 305-307. 30. FARTHING M.J. Clinical aspects of human cryptosporidiosis. *Contributions Microbiology*, 2000, vol. 6, pp. 50-74. 31. FAYER R., Trout J.M., Nerad T. Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Eukaryot Microbiology*, 1996, vol. 43, p 64S .
- FAYER R. *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 1997.
- FAYER R., Graczyk T.k., Lewis E.J., Trout J.M., Farley C.A. Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Apply and Environmental Microbiology*, 1998a, vol. 64, pp. 1070-1074.
- FAYER R., Trout J.M., Jenkins M.C. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 1998b, vol. 84, pp. 1165-1169.
- FAYER, R., Morgan, U., Upton, S.J., 2000. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol* vol 30, pp 1305-1322.
- FAYER, R., Trout, J.M., Xiao, L., Morgan, U.M., Lai, A.A., Dubey, J.P., 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J Parasitol* vol 87, pp 1415-1422. 37. FAYER, R., 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol* vol 126, pp 37-56.
- FAYER, R., Santin, M., Trout, J.M., Greiner, E., 2006. Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Vet Parasitol* vol 135, pp 105-112.
- FAYER R., XIAO L. 2008, *Cryptosporidium and Cryptosporidiosis*.
- FRANZ P(200) *cryptosporidiosis and microsporidiosis*, 1.
- FUKUSHIMA K., HELMAN R.G. (1984) *Cryptosporidiosis* in a pup with distemper. *Vet. Pathol.*, vol 21 : pp 247-248.

- GATEI W., SUPUTTAMONGKOL Y., WAYWA D., ASHFORD R.W., BAILEY J.W., GREENVILL J. et al. (2002) Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Ann.Trop.Med.Parasitol*,vol 96 :pp 797-802.
- GERALDINE BLANCHARD, B , PARAGON M l'alimentation des chiens, 2008.
- GRIFFITHS, J.K. .- Human cryptosporidiosis : epidemiology, transmission, clinical disease, treatment, and diagnosis.- *Advances in Parasitology*, 1998, Vol 40,pp 37- 85
- HARP J.A., GOFF J.P., (1998), Strategies for the control of *C. parvum* infection in calves, *Journal of Dairy Science*,vol 81, pp289-294.
- HENRIKSEN et POHLENZ (1981) Staining of *Cryptosporidia* by a modified ZiehlNielsen technique. *Acta.Vet.Scand.* vol 22(3-4) :pp 594-596.
- JOHNSTON S.P., BALLARD M.M., BEACH M.J., CAUSER L., WILKINS P.P. (2003) Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, vol 41(2) : pp 623-626.
- KAUSHIK, K., KHURANA, S., WANCHU, A., MALLA, N., 2008, Evaluation of staining techniques, antigen detection and nested PCR for the diagnosis of cryptosporidiosis in HIV seropositive and seronegative patients. *Acta Tropica* vol 107,: pp 1-7.
- KIRKPATRICK C.E., DUBEY J.P.(1987) Enteric coccidial infections. *Isospora*, *Sarcocystis*, *Cryptosporidium*, *Besnoitia*, and *Hammondia*. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, vol 17(6) : pp1405-1420.
- KOCH K.L., SHANKEY T.V., WEINSTEIN G.S., DYE R.E., ABT A.B., CURRENT W.L. et al. (1983) *Cryptosporidiosis* in a patient with hemophilia, common variable hypogammaglobulinemia and the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.*, vol 99 : pp 337-339.
- LINDSAY, D.S., UPTON, S.J., OWENS, D.S., MORGAN, U.M., MEAD, J.R., BLAGBURN, B.L. .- *Cryptosporidium andersoni* n. Sp. (Apicomplexa : *Cryptosporiidae*) from cattle, *Bos Taurus*.- *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2000, vol 47,pp 91-95.
- LINDSAY, D.S., ZAJAC A. M., (2004) *Cryptosporidium* infections in cats and dogs. *Compend . cont . Educ. Pract .Vet .* vol 26 (11) : pp 864-874.
- MAC KENZIE, W. R., HOXIE, N. J., PROCTOR, M. E., GRADUS, M. S., BLAIR, K. A., PETERSON, D. E., KAZMIERCZAK, J. J., ADDISS, D. G., FOX, K. R., ROSE, J. B., DAVIS, J. P., 1994, A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *The New England Journal of Medicine* vol 331, pp 161-167.

- MATTEWS J., (1991), Diseases of the goat, Oxford : Butterworth-Heinemann, p 310 . 68. MILLEMANN Y., ADJOU K., MAILLARD R., POLACK B., CHARTIER C., (2003), Les diarrhees neonatales des agneaux et des chevreaux, Le point vétérinaire n°233, pp 22-29.
- MORGAN, U.M., XIAO, L., FAYER, R., LAL, A.A., THOMPSON, R.C.A. .- Variation in *Cryptosporidium* : towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology*, 1999, vol 29, pp 1733-1751.
- MOORE D.A., ATWILL E.R., KIRK J.H., BRAHMBHATT D., ALONSO L.H., HOU L., SINGER M.D., MILLER T.D., (2003), Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, VOL 223, PP 839-845.
- MTAMBO M.M., NASH A.S., BLEWETT D.A., WRIGHT S. (1992) Comparison of staining and concentration techniques for detection of *Cryptosporidium* oocysts in cat faecal specimens. *Vet. Parasitol.*, vol 45 : pp 49-57.
- NAHREVANIAN, H., ASSMAR, M., 2008. Cryptosporidiosis in immunocompromised patients in the Islamic Republic of Iran. *J Microbiol Immunol Infect* vol 41, pp 74-77. 76. O'DONOGHUE, P. .- *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in Man and Animals.- *International Journal for Parasitology*, 1995, vol 25, 2 , pp139-195.
- OKHUYSEN PC, CHAPPELL CL, CRABB JH, STERLING C.R., DUPONT H.L. (1999) Virulence of three distinct *C. parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.*, vol 180 :pp1275-1281.
- PEETERS, J. E., MAZAS, E. A., MASSCHELEIN, W. J., VILLACORTA MARTIEST de MATURANA, I., DEBACKER, E., 1989, Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* vol 55, 6: pp 1519-1522.
- PIENIAZEK N.J., BORNAY-LLINARES F.J., SLEMENDA S.B., DA SILVA A.J., MOURA J.N., ARROWOOD M.J. et al. (1999) New *Cryptosporidium* genotypes in HIVinfected persons. *Emerg.Infect.Dis.*,vol 5 : pp 444-449.
- QUILEZ, J., SANCHEZ-ACEDO, C., AVENDANO, C., DEL CACHO, E., LOPEZBERNARD, F., 2005, Efficacy of two peroxygen-based disinfectants for inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* vol 71, 5: pp 2479-2483.
- RADOSTIS O., GAY C., BLOOD D., HINCHCLIFF K., (2000), *Cryptosporidiosis*, *Veterinary medicine* vol 9th ed. PP 1310-1313.
- RAMIREZ, N.E., WARD, L.A., SREEVATSAN, S., 2004. A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and

animals. *Microbes Infect* vol 6, pp 773-785. 85. RINALDI, L., MAURELLI, M. P., MUSELLA, V., VENEZIANO, V., CARBONE, S., DI SARNO, A., PAONE, M., CRINGOLI, G., 2008, *Giardia* and *Cryptosporidium* in canine faecal samples contaminating an urban area. *Research in Veterinary Science* vol 84, 3: pp 413-415.

- RIPERT, C., GUYOT, K., 2003. Cryptosporidiose. In: *Epidémiologie des maladies parasitaires* Vol. 3, pp. 269-297.
- SANTIN, M., TROUT, J.M., XIAO, L., ZHOU, L., GREINER, E., FAYER, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet Parasitol* vol 122, pp 103-117.
- SANTIN, M., TROUT, J.M., FAYER, R., 2008. A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol* vol 155, pp 1523.
- SISK D. B, GOSSER H. S, STYER E. L, BRANCH L. O. (1984) intestinal cryptosporidiosis in two pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol 184(7) : pp 835-836.
- SLAPETA, J., 2009, Centenary of the genus *Cryptosporidium*: from morphological to molecular species identification (Chapter 4). In: *Giardia and Cryptosporidium: From molecules to disease*, M. G. Ortega-Pierres, S. Caccio, R. Fayer, T. Mank, H. Smith, R. C. A. Thompson (Eds.), CAB International, pp 31-50.
- Slavin, D., 1955, *Cryptosporidium meleagridis* sp. nov. *Journal of Comparative Pathology* vol 65, 3: pp 262–266. 92. SMITH C.M., SHERMAN D.M., (1994), *Goat medicine*, Philadelphie : Lea et Febiger, p 620. 93. TAYLOR D- 2006 ; chiens : partique
- TUMWINE, J. K., KEKITIINWA, A., BAKEERA-KITAKA, S., NDEEZI, G., DOWNING, R., FENG, X., AKIYOSHI, D. E., TZIPORI, S., 2005, cryptosporidiosis and microsporidiosis in Ugandan children with persistent diarrhea with and without concurrent infection with the immunodeficiency virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol 73, 5: pp 921-925.
- TURNWALD G.H., BARTA O., TAYLOR W., KREEGER J., COLEMAN S.U., POURCIAU S.S. (1988) Cryptosporidiosis associated with immunosuppression attributable to distemper in a pup. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol 192 : pp 79-81.
- TYZZER E.E. (1907) A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse, in Certad, G., 2008 de la caractérisation génétique et phénotypique de *Cryptosporidium* (Alveolata : Apicomplexa) à la mise en évidence du rôle de *C. parvum* dans l'induction de néoplasie digestive, pp 19-21

- TYZZER, E. E., 1912, *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse, in Certad, G., 2008 de la caractérisation génétique et phénotypique de *Cryptosporidium* (Alveolata : Apicomplexa) à la mise en évidence du rôle de *C. parvum* dans l'induction de néoplasie digestive, pp 19-30
- TZIPORI, S., CAMPBELL, I., 1981, Prevalence of *Cryptosporidium* antibodies in 10 animal species. *Journal of Clinical Microbiology* vol 14, 4: pp 455-456.
- TZIPORI, S., GRIFFITHS, J.K. - Natural history and biology of *Cryptosporidium parvum*.- *Advances in Parasitology*, 1998, vol 40, pp 5-36.
- VILLENEUVE A ,2003 zoonoses parasitaires vol 29 , pp 30-31
- WILSON R.B., HOLSCHER M.A., LYLE S.J. (1983) *Cryptosporidiosis* in a pup *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, vol 183 : pp 1005-1006.
- XIAO L., BERN C., LIMOR J., SULAIMAN I., ROBERTS J., CHECKLEY W., CABRERA L., GILMAN R.H., LAL A.A. (2001) Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J. Infect. Dis.*, vol 183(3) :pp 492-497.
- XIAO L., CAMA V.A., CABRERA L., ORTEGA Y., PEARSON J., GILMAN R.H. (2007) Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among Children and a Dog in a household. *J.Clin.Microbiol.* vol 45(6) : pp2014-2016
- YENS R ORTEGA , 2006 foodborne parasites p 58

ANNEXES

ANNEXE 01

1) Technique de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley

Réactifs :

- ❖ Eau formolée à 10%
- Ether diéthylique

Mode opératoire

- Dans un verre à pied conique déposer quelques grammes des selles (3 à 5 g) à l'aide d'un agitateur en verre
- Diluer progressivement un volume de selles dans 2 à 3 volumes d'eau formolée à 10%.
- Agiter à l'aide d'une baguette en verre jusqu'à l'obtention d'une dilution homogène
- Laisser décanter quelques minutes (1 à 2 minutes), pour éliminer les gros débris fécaux
- Aspirer une partie de surnageant à l'aide d'une pipette pasteur, et verser dans un tube conique à centrifuger équivalent à 2/3 du volume total à émulsionner
- Ajouter de l'éther dans la proportion de 1/3 pour 2/3 de liquide
- Boucher le tube avec un bouchon, tout en prenant soin de laisser un espace vide pour le liquide d'environ 1 cm, pour permettre l'émulsion
- Agiter le tube vigoureusement à la main par retournements successifs pendant 30 secondes à une minute, en laissant précautionneusement le gaz s'échapper de temps en temps (aérosols de selles).
- Peser les tubes pour équilibrer avant la centrifugation
- Centrifuger à 2500 tours/ minutes pendant 5 minutes

Après centrifugation, le contenu du tube se répartie en 4 couches **disposées**

de haut en bas :

- Une couche éthérée chargée en graisses.
- Une couche épaisse sous forme d'anneau constituée de gros débris.

- Une couche aqueuse.
- Un culot dans lequel se sont concentrés les éléments parasitaires.
- éliminer les trois couches supérieures par retournement brusque pour garder le culot.

Lecture

- Prélever une goutte du culot à l'aide d'une pipette Pasteur (après homogénéisation) puis procéder à un examen direct de ce culot
- Déposer la goutte sur une lame
- Mettre une goutte de lugol et mélanger
- Couvrir d'une lamelle
- Examiner à l'objectif X 10 puis X 40 pour la recherche des œufs d'helminthes, de *Cryptosporidium* et / ou éventuellement de kystes de protozoaires.

ANNEXE 2

2) Technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz

Réactifs :

- ❖ Méthanol pur
- ❖ Fuchsine phéniquée de Ziehl modifiée.
- ❖ Acide sulfurique à 2%
- ❖ Vert malachite à 5%

Mode opératoire

- ❖ Confection d'un frottis fécal :

Ce frottis est réalisé à partir du culot de centrifugation de la méthode de Ritchie simplifiée déjà décrite. Celui ci doit être mince et adhérent à la lame

- ✓ A l'aide d'une pipette pasteur, on prélève 1 à 2 gouttes du culot de centrifugation, après une légère homogénéisation.
 - ✓ Sur deux lames bien dégraissées et numérotées par grattage à l'aide d'un aimant de préférence, pour une bonne reconnaissance ultérieure
 - ✓ Déposer la goutte à l'une des extrémités de la lame,
 - ✓ La mettre en contact avec le bord d'une autre lame ; la goutte diffuse sur le bord de la lame par capillarité, ensuite l'étaler sur toute la longueur de la lame.
 - ✓ La réalisation d'un bon frottis, celui-ci doit être mince et non épais.
 - ✓ Laisser sécher à l'air jusqu'à une nuit.
- ❖ Fixation, coloration du frottis :
 - ✓ Fixer le frottis au méthanol pendant 5 minutes.
 - ✓ Laisser sécher à l'air ou par agitation
 - ✓ Colorer dans une solution de fuchsine phéniquée pendant 60 minutes.
 - ✓ Rincer à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de fuchsine
 - ✓ Différencier avec une solution d'acide sulfurique à 2 % pendant 20 secondes.
(Pour décolorer et éliminer les débris et les autres micro-organismes)
 - ✓ Rincer à l'eau du robinet pour

- ✓ Contre colorer avec une solution de vert malachite à éliminer l'excès d'acide 5% pendant 5 minutes.

NB : les matières fécales sont colorées en bleu-vert sauf les cryptosporidies qui gardent la coloration rouge.

- ✓ Rincer à l'eau du robinet.
- ✓ Laisser sécher à l'air ou par agitation.

La lecture se fait au microscope aux grossissements (objectifs X40 et X100 - avec une goutte d'huile à immersion). Cette technique permet de visualiser nettement les oocystes de *Cryptosporidium*, qui sont colorés en rouge vif ou rose sur un fond vert.



Tubes coniques



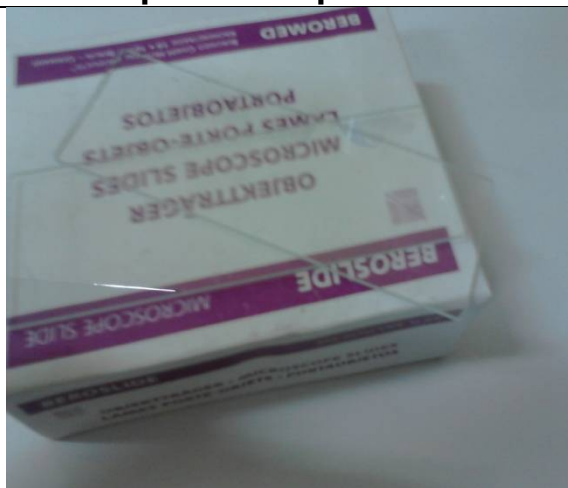
Pot stérile



Verre à pied conique



Lamelles



Lame porte objets



Microscope optique

ANNEXE 3

3) Technique ELISA en sandwich

Préparation de solution de lavage:

- 1 flacon de 100 ml de solution de lavage concentrée 20 fois.
- La solution cristallise spontanément à froid.
- En cas d'utilisation partielle de la solution, amener le flacon à 21°C +/- 3°C de façon à ce que tous les cristaux disparaissent
- Bien mélanger la solution et en prélever le volume nécessaire.
- Diluer 20 fois le tampon dans de l'eau distillée ou déminéralisée.

Mode opératoire

- 1- Tous les constituants doivent être ramenés à 21°C +/- 3°C avant utilisation.
- 2- Retirer la microplaque de son emballage.
- 3- Diluer au demi les matières fécales dans le tampon de dilution (tube à essai).
- 4- Distribuer les échantillons dilués à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante : échantillon 1 : puits A1-B1, échantillon 2 : puits C1-D1, etc... Procéder de la même manière pour le contrôle positif – 100 µl/puits (ex. G1-H1).
- 5- Couvrir et incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure.
- 6- Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée. Pour ce faire, éliminer le contenu de la microplaque en la retournant vigoureusement au-dessus d'un récipient contenant un agent inactivant. Egoutter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. Ajouter 300 µl de la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus du récipient de confinement. Répéter deux fois toute l'opération en évitant tout particulièrement la formation de bulles dans les cupules.
- 7- Distribuer le conjugué à raison de 100 µl par puits. Couvrir et incuber 1 heure à 21°C +/- 3°C.
- 8- Laver la plaque comme décrit au point 6.
- 9- Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits.

Incuber 10 minutes à 21°C +/- 3°C sans couvrir et à l'obscurité.

10- Distribuer 50 µl de solution d'arrêt par puits. La couleur passe de bleu à jaune.

11- Enregistrer les densités optiques à l'aide d'un spectrophotomètre pour plaques en utilisant un filtre de 450 nm.

Validation

Le test est valide si :

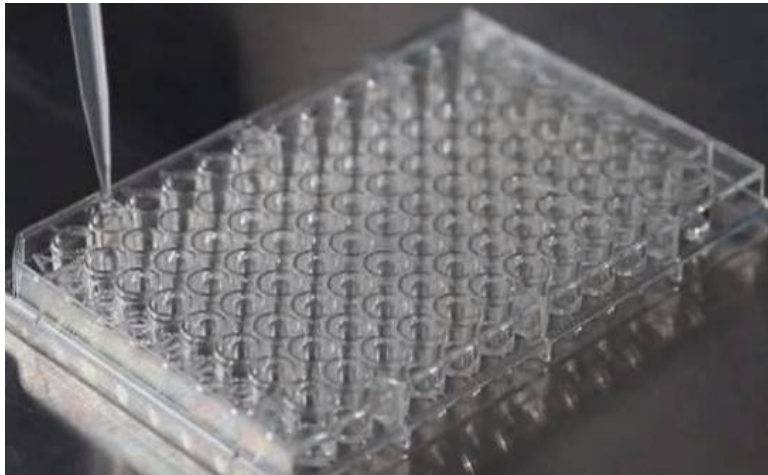
La référence positive fournit une différence de densité optique (DOP) en dix minutes supérieure 1,139 (DOP>1,139)

Interprétation des résultats

Calculer pour chaque échantillon

$$\text{Val(eur)} = \frac{\text{Delta DO éch} \times 100}{\text{Delta DO pos}}$$

Positif si Val(eur) > 7,00 %



microplaques de 96 puits



Lecteur ELISA

ANNEXE 4

Questionnaire concernant l'étude de la prévalence de <i>Cryptosporidium</i> chez les caprins dans la région de Bouira
--

Zone d'étude :

Numéro d'élevage :

Renseignements sur les animaux

Effectif total :

Nombre d'animaux prélevés:

Races:

Sexe :

Age :

Présence de diarrhée : Oui ☐ Non ☐

Si oui :

Aspect de diarrhée :

Fréquence de diarrhée :

Durée de diarrhée :

Type d'aliments distribués aux animaux :

Hygiène d'élevages :

Rythme de retrait des excréments :

Rythme de nettoyage et / ou de désinfection :

[illegible]

