

**UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Institut des Sciences Vétérinaires**

**THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité : Sciences Vétérinaires**

**LA CRYPTOSPORIDIOSE BOVINE : GENOTYPAGE DE  
*CRYPTOSPORIDIUM Sp* PAR LA METHODE PCR  
(POLYMERASE CHAIN REACTION)**

**Par :**

**Nadia OUAKLI**

Devant le Jury composé de :

A.BERBAR	Professeur, U.BLIDA 1	Président
N. SAHRAOUI	Professeur, U.BLIDA 1	Examinatrice
K. AIT OUDHIA	Professeur, ENSV ALGER	Examinatrice
F.GHALMI	Professeur, ENSV ALGER	Examinatrice
R. KAIDI	Professeur, U.BLIDA 1	Promoteur
D.KHELAF	Professeur, ENSV ALGER	CO. Promoteur

**BLIDA, Février 2019**

## RESUME

Les gastro-entérites affectent près de 20 % des veaux, laitiers comme allaitants, au cours de leurs trois premiers mois de vie. Les diarrhées engendrées représentent une des premières causes de mortalité du veau, en particulier lors du premier mois de vie. Elles représentent dans la plupart des pays du monde la première cause de morbidité et de mortalité chez le veau nouveau-né. Un total de 460 échantillons fécaux prélevés au hasard sur des bovins âgés de deux jours à 5 ans; dans 10 exploitations de type allaitant situées dans les wilaya de Ain Defla, Blida, Sétif et Tizi Ouzou durant une période allant de 2015 à 2016. Chaque échantillon identifié macroscopiquement pour déterminer la consistance, la présence ou non de mucus et de sang.

Les 460 prélèvements fécaux analysés par la technique de concentration de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley (1970) suivie par la coloration de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz, 240 échantillons révélés positifs avec un taux de 52,2 %. Sur les 240 prélèvements analysés par le test ELISA, 38 échantillons révélés positifs avec un taux de 15,83 %, dont 30 échantillons de nature diarrhéique et 8 de nature non diarrhéique ; avec une variation dans les différents élevages Blida 4,69 % (3/61), Ain Defla 5 % (3/57), Tizi Ouzou 25 % (25/75) et Sétif 43.75 % (7/9). Durant notre étude, les veaux pré-sevrés (âgés de moins d'un mois) présentaient généralement une diarrhée, alors que les animaux plus âgés étaient porteurs de parasites, mais leurs matières fécales étaient de nature non diarrhéique.

L'identification des espèces et sous-génotypes de *Cryptosporidium* dans les échantillons confirmés par PCR et des analyses séquentielles de l'ARN ribosomal de petite sous-unité (SSU ARNr) et des gènes de la glycoprotéine 60kDa (GP60) des parasites. L'analyse de séquence des 29 isolats générés sur les loci SSU ARNr a confirmé la présence de quatre espèces de *Cryptosporidium*, notamment *C. parvum* (72,4 %), *C. bovis* (13,8 %), *C. andersoni* (3,4 %) et *C. ryanae* (3,4 %). Deux autres isolats (7,0 %) n'ont pu être identifiés qu'au niveau du genre. Les 8 des 21 isolats attribués à *C. parvum* identifiés comme étant le sous-génotype IlaA16G2R1 au locus GP60. Nous avons constaté que *C. parvum*

infectait des veaux au pré-sevrage, alors que *C. ryanae* et *C. andersoni* sont détectés que chez les animaux avec des échantillons non diarrhéiques.

Mots clés : *Cryptosporidium*, Bovins, coloration Ziehl Neelson modifiée, ELISA, Génotypage GP60.

## الملخص

إن التهاب المعدة و الأمعاء يؤثر على ما يقارب 20 من العجول في الأشهر الثلاثة الأولى من الحياة , يعد الإسهال أحد الأسباب الرئيسية لوفاة العجل خاصة خلال الشهر الأول من الحياة.

تم جمع 460 عينة من البراز عشوائيا للأبقار تتراوح أعمارها من يومين إلى 5 سنوات، في 10 مزارع من نوع المروضات تقع في ولايات عين الدفلى، البلدية، تيزي وزو ،سطيف من فترة تتراوح ما بين 2015 إلى 2016 كل عينة محددة بالعين المجردة لتحديد المتانة (Consistance) ووجود أو عدم وجود المخاط أو الدم .

إن 460 عينة البراز المحللة عبر تقنية تركيز Ritchie مبسطة تليها تلوين من قبل Ziehl Neelson أعطتنا 240 عينة أثبتت ايجابية مع معدل 52,2 % .

من 240 عينة المحللة عن طريق اختبار ELISA أعطتنا 38 عينة أثبتت ايجابية مع معدل 15.83 % .منها 30 عينة من المتانة (Consistance) الإسهال و 8 عينات من غير الإسهال مع تنوع في مختلف المزارع :

البلدية 4.69 % (61/3), عين الدفلى 5 % (57/3), تيزي وزو 25 % (75/25) وسطيف 43.75 % (9/7) من خلال دراستنا, العجول المفطومة ( عمرها أقل من شهر واحد) عادة ما يكون الإسهال, في حين أن الحيوانات الأكبر سنا كانوا حاملين للطفيليات , مع عينات البراز ذات طبيعة غير الإسهال.

تحديد الأنواع و الأنماط الجينية الفرعية في العينات المؤكدة من طرف , التحليلات المتسلسلة PCR للوحدات الفرعية الصغيرة و الجينات.

من 38 عينة للتحليل التسلسلي , 29 عينة, 72,4 % C.parvum , 13,8 % C.bovis , 3,4 % C.andersoni و 3,4 % C.ryanae كما وجدنا إثنين من العينات ما يعادل 7% لم نستطع التعرف عليها على مستوى النوع.

من 29 عينة 21 عينة تنتمي إلى صنف C.parvum نمط وراثي ( IIaA16G2R1 ) .

الكلمات المفتاحية : العجول ( bovin ) , Cryptosporidium , Ziehl Neelson , ELISA , نمط وراثي (genotype).

## ABSTRACT

Gastroenteritis affects nearly 20% of calves, both dairy and lactating, during their first three months of life. Diarrhoea caused is one of the leading causes of calf mortality, especially in the first month of life. They represent in most countries of the world the leading cause of morbidity and mortality in newborn calves.

A total of 460 faecal samples collected randomly from cattle aged between two days and 5 years; from 10 farms of the suckling-type located in the provinces of Ain Defla, Blida, Sétif and Tizi Ouzou during a period from 2015 to 2016.

Each sample were macroscopically identified to determine the consistency, presence or not of mucus and blood. The 460 faecal samples analysed by the simplified Ritchie concentration technique by Allen and Ridney (1970) followed by the Ziehl Neelsen stain modified by Henriksen and Pohlenz, 240 samples tested positive with a rate of 52.2%.

The 240 samples analysed by the ELISA test, 38 were positive with a rate of 15.83%, with 30 diarrhoea and 8 non-diarrhoea samples; variation with the various farms : Blida 4.69% (3/61), Ain Defla 5% (3/57), Tizi Ouzou 25% (25/75) and Sétif 43.75% (7/9).

During our study, pre-weaned calves (less than one month old) generally presented with diarrhoea, while older animals carried parasites, but their faeces were not diarrhoea. The identification of *Cryptosporidium* species and sub-genotypes in confirmed samples was conducted by PCR and sequence analyses of the small subunit ribosomal RNA (*ssu* rRNA) and the 60kDa glycoprotein (*gp60*) genes of the parasite. Sequence analysis the 29 isolates generated at the *ssu* rRNA loci confirmed the presence of four *Cryptosporidium* species including *C. parvum* (72.4%), *C. bovis* (13.8%), *C. andersoni*, (3.4%), and *C. ryanae*(3.4%). Two additional isolates (7.0%) could only be identified at the genus level. Eight out of the 21 isolates assigned to *C. parvum* were identified as sub-genotype IIaA16G2R1 at the *gp60* locus. *C. parvum* was almost exclusively found infecting pre-weaned calves, whereas *C. ryanae* and *C. andersoni* were only detected in asymptomatic animals.

**Keywords:** *Cryptosporidium* Calves Neonatal Algeria Epidemiology Genotyping GP60- ELISA

## REMERCIEMENTS

Je remercie ALLAH le tout puissant qui m'a inspiré qui m'a guidé dans le bon chemin et de m'avoir donné la santé et m'avoir permis d'arriver au jour d'aujourd'hui.

Mes remerciements vont à :

Monsieur BERBAR. A Professeur à l'université Blida 1 qui malgré ses occupations a bien voulu présider ce jury.

Madame SAHRAOUI N Professeur à l'université Blida 1 qui nous a fait le grand honneur d'accepter de juger ce travail.

Madame AIT OUDHIA K Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire El Harrach Alger qui nous a fait l'honneur de bien vouloir apporter ses compétences à notre jury.

Madame GHALMI F Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire El Harrach Alger qui nous a fait l'honneur de bien vouloir apporter ses compétences à notre jury.

Professeur KAIDI .R, mon promoteur pour ce travail pour lequel il n'a cessé de m'épauler et de me prodiguer conseils et encouragements, merci Monsieur

Professeur KHELAF .D mon co-promoteur pour tous les efforts qu'il a bien voulu fournir pour la réalisation de ce travail et les conseils judicieux. Qu'il trouve ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Monsieur BESSAAD M A Chargé de cours à l'université de Blida 1 pour son aide pour la partie Biologie moléculaire mes sincères remerciements.

Madame DJELATA N pour son soutien, sa présence et son aide un grand merci

Madame BETTAHAR S pour sa présence, son soutien et son aide un grand merci

Monsieur AIT BELKACEM A pour son soutien et son aide un grand merci

Monsieur DJOUDI .M pour son soutien et son aide un grand merci.

Monsieur MENOUERI N. Professeur à l'université Blida 1, pour son soutien et sa confiance, merci

Monsieur YAHIMI A Maitre de Conférence à l'université BLIDA 1 pour son soutien et son aide, un grand merci

Enfin, je tiens à remercier Samir, Ali , les Collègues de l'Institut vétérinaire, les responsables des laboratoires, le personnel de département clinique et préclinique

## DEDICACES

Au feu mon père, qui j'en suis sûr aurait été très fier de sa fille, tu seras toujours dans mes pensées et dans mon cœur, ALLAH t'accueille en son vaste paradis.

À ma très chère mère à qui je dois tout, elle m'a toujours aidé et encouragé tout au long de mes études, ton amour, ta bonté, ta générosité extrême ainsi que ton soutien sont sans limites, tu es et tu seras toujours pour moi le symbole de l'honnêteté, de gentillesse, de la serviabilité et de la simplicité. Que Dieu tout puissant, te protège et t'assure une bonne santé et longue vie.

À mes frères et mes sœurs qui m'ont entouré de leur affection.

À mes beaux frères et belles sœurs

À mes neveux et nièces

À toute ma famille

À mes amies Sou, Hayet, Karima Mekademi, Djamila Kabbour, Karima Bounaas

À toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire et tant d'autres qui voudront bien m'excuser si je les ai oublié.

## TABLE DES MATIERES

RESUME

الملخص

ABSTRACT

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ILLUSTRATIONS

**INTRODUCTION**

1

**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **CHAPITRE 1 INTESTINS DU VEAU**

4

1.1. Rappels Anatomo-physiologique	4
1.2. Phénomènes d'échanges au niveau de la villosité intestinale	4
1.3. Physiologie digestive : absorption intestinale	5
1.3.1. Entérocytes	5
1.3.2. Cellules des cryptes	6
1.2. Diarrhées néonatales du nouveau-né	7
1.2.1. Définition	7
1.2.2. Mécanismes impliqués dans les phénomènes diarrhéiques	8
1.2.3. Etiologie des diarrhées néonatales du veau	9
1.2.3.1. Les diarrhées néonatales non parasitaires du veau	10
1.2.3.1.1. Les diarrhées d'origine bactérienne	10
1.2.3.1.2. Diarrhée d'origine virale	12
1.2.3.2. Les diarrhées néonatales parasitaires du veau	14

### **CHAPITRE 2 CRYPTOSPORIDIES**

18

2-1-Etiologie	18
2.1.1. Découverte du parasite	18
2.1.2. Systématique	18
2.1.3. Espèces de cryptosporidies	21
2.1.3.1. La notion d'espèce	21
2.1.3.2. Les différentes espèces de <i>Cryptosporidium</i> et leurs hôtes	21
2.1.3.2.1. Bovins	22
2.1.3.2.2. Humains	22
2.1.3.2.3. Autres animaux domestiques	23
2.1.3.2.4. Animaux de la faune	23
2.1.3.3. Espèces affectant les Ruminants	26
2.1.4. Biologie du parasite	27
2.1.4.1. Cycle évolutif	27

2.1.4.2. Déroulement du cycle	30
2.1.5. Transmission du <i>Cryptosporidium</i>	36
2.1.5.1. Excrétion des oocystes chez les veaux	36
2.1.5.2. Résistance des oocystes de <i>Cryptosporidium sp</i> dans l'environnement	37
2.1.6. Pouvoir pathogène du parasite	38
2.1.7. Résistance dans l'eau	38
2.1.8. Résistance hors de l'eau	39
2.1.9. Résistance aux procédés de désinfection	40
2.1.10. Transport mécanique dans le sol et par les hôtes	40
2.1.11. La cryptosporidiose bovine	40
2.1.11.1. Les bovins adultes	40
2.1.11.2. Signes cliniques chez le veau	42
2.1.12. Pathogénie et lésions	44
2.1.13. Le statut immunitaire	45
2.2.14. Réponse immunitaire à l'infection à <i>Cryptosporidium</i>	46
2.2.15. Critères de sensibilité du veau non sevré	49
2.2.16. Immunité et colostrum	50

### **CHAPITRE 3 EPIDEMIOLOGIE**

<b>3.1. Répartition géographique et prévalence de la cryptosporidiose</b>	<b>51</b>
3.2. Epidémiologie de la cryptosporidiose chez les ruminants	51
3.3. Répartition géographique et prévalence de la maladie	52
3.4. Espèces présentes	52
3.5. Sources du parasite	54
3.5.1. Les jeunes animaux du troupeau	54
3.5.2. Les mères	54
3.5.3. Les animaux sauvages et les rongeurs	55
3.6. Modes de transmission	55
3.7. Critères de sensibilité de l'hôte	56
3.7.1. L'espèce	56
3.7.2. La race	56
3.7.3. L'âge	57
3.7.4. Le statut immunitaire	57
3.8. Facteurs de risque	58
3.8.1. La saison	58
3.8.2. La densité animale	58
3.8.3. La conduite d'élevage	58
3.8.4. Le rôle de l'épandage du fumier	59
3.8.5. Alimentation	59
3.8.6. Type de sol et nettoyage	60
3.8.7. Les vecteurs externes inanimés	60
3.8.8. Les vecteurs externes animés	61

<b>CHAPITRE 4</b>		
<b>DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE</b>		62
4.1. Techniques coprologiques		62
4.1. Méthodes microscopiques		62
4.1.2. Techniques de concentration (enrichissement)		63
4.1.3. Méthodes de détection et de quantification des oocystes		64
4.1.4. Techniques de coloration		65
4.1.5. Mesure des oocystes		67
4.1.6. Techniques d'immuno-détection		67
4.1.7. Test d'agglutination au latex		69

<b>CHAPITRE 5</b>		
<b>LA BIOLOGIE MOLECULAIRE ET LA PHYLOGENIE</b>		70
5.1. Diagnostic moléculaire		70
5.1.1. Introduction		70
5.1.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)		70
5.1.3. Les acteurs de la PCR		71
5.1.4. Migration électrophorétique et révélation		73
5.1.5. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)		74
5.1.6. Séquençage		74
5.2. La phylogénie moléculaire		74

<b>CHAPITRE 6</b>		
<b>TRAITEMENT ET PREVENTION</b>		77
6.1. Traitement symptomatique		77
6.1.1. Correction des troubles hydro-électrolytiques		77
6.1.2. Protection de la muqueuse intestinale		77
6.1.3. Prévention des surinfections		77
6.2. Traitement thérapeutique		77
6.3. Prophylaxie sanitaire		78
6.4. Importance		78
6.5. Vaccination		79

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

<b>CHAPITRE 07</b>		
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>		80
7.1. Introduction		80
7.2. Enquête auprès des vétérinaires privés		82
7.2.1. Introduction		82
7.2.2. Matériel et méthodes		82
7.2.3. Résultats		84
7.2.3.1. Enquête sur la fréquence de rencontre des diarrhées néonatales des veaux		84
7.2.3.2. Enquête sur les origines des diarrhées néonatales des veaux		85
7.2.3.3. Enquête sur les mortalités liées aux diarrhées néonatales des veaux		86
7.2.3.4. Enquête sur le recours au diagnostic de laboratoire		87

7.2.3.5. Enquête sur l'utilisation de vaccin anti diarrhéique avant le vêlage	88
7.2.3.6. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales en fonction de l'âge	89
7.2.3.7. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales en fonction du sexe	90
7-2-3-8. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales selon la saison	91
7.2.3.9. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales selon l'état d'hygiène des étables.	92
7.2.3.10. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales en fonction des modalités de distribution de colostrum	93
7.2.4. Discussion	94
7.2.5. Conclusion	99
7.3. Etude microscopique et le test ELISA	100
7.3.1. Introduction	100
7.3.2. Matériel & Méthodes	100
7.3.2.1. Matériel	100
7.3.2.2. Méthodes	103
7.3.2.3. Analyses des données	109
7.3.2.4. Résultats	110
7.3.2.4.1. Prévalence de Cryptosporidium sp. par microscopie	110
7.3.2.4.2. Prévalence de Cryptosporidium par la technique ELISA	111
7.3.2.4.3. Distribution selon la consistance et l'âge	112
7.3.2.4.4. Résultats du test ELISA en fonction de la consistance	113
7.3.2.4.5. Résultats du test ELISA et la saison	114
7.3.2.4.6. Résultats positif du test ELISA en fonction du sexe	115
7.3.2.4.7. Corrélation entre consistance, ELISA négatif et âge	116
7.3.2.4.8. Corrélation entre échantillons diarrhéiques, ELISA positifs & ELISA négatif	117
7.3.2.4.9. Corrélation entre l'âge et la consistance dans les régions d'étude	118
7.3.2.5. Discussion	119
7.4. Diagnostic moléculaire	125
7.4.1. Introduction	125
7.4.2. Matériel & Méthodes	125
7.4.3. Analyses de données	128
7.4.4. Résultats	129
7.5. La phylogénie moléculaire	134
7.6. Discussion	137
CONCLUSION	140
RECOMMANDATIONS	142
APPENDICE A	
APPENDICE B	
APPENDICE C	
APPENDICE D	
APPENDICE E	
APPENDICE F	

APPENDICE G  
APPENDICE H  
**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## LISTE DES TABLEAUX

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 2.1 : Classification taxonomique de <i>Cryptosporidium</i> sp	20
Tableau 2.2 : Espèces de cryptosporidies recensées chez les Mammifères	24
Tableau 2.3 : Les différents stades évolutifs de <i>Cryptosporidium</i> sp	32
Tableau 4.1 : Taille des oocystes de <i>Cryptosporidium</i> Sp en fonction de l'espèce observée	63

### PARTIE EXPERIMENTALE

Tableau 7.1 : Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> sp. par microscopie	110
Tableau 7.2 : Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> par la technique ELISA	111
Tableau 7.3 : Distribution selon la consistance et l'âge	112
Tableau 7.4 : Résultats du test ELISA en fonction de la consistance	113
Tableau 7.5 : Résultats du test ELISA et Saison	114
Tableau 7.6: Résultats du test ELISA et le sexe	115
Tableau 7.7 : Corrélation entre Consistance , ELISA négatif et Age	116
Tableau 7.8 : Corrélation entre échantillons diarrhéiques, ELISA positifs & ELISA négatif.	117
Tableau 7.9 : Corrélation entre l'âge et la consistance dans les régions d'étude	118
Tableau 7.10 : Répartition des espèces et sous-génotypes de <i>Cryptosporidium</i> (n=29) selon l'âge, la consistance des fèces	131
Tableau 7.11 : Diversité, fréquence et principales caractéristiques moléculaires des isolats de <i>Cryptosporidium</i> au locus ssu ARNr chez les bovins.	133

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure 1.1 : Mécanismes physiologiques d'absorption et de sécrétion au niveau de la muqueuse intestinale 7
- Figure 1.2 : Représentation schématique des agents infectieux non parasitaires responsables de diarrhée en fonction de l'âge du veau 14
- Figure 1.3 : Mécanismes d'action de *Cryptosporidium parvum* au niveau de l'épithélium intestinal 16
- Figure 1.4 : Des villosités intestinales saines (à gauche) et des dommages intestinaux causés par une infection à *Cryptosporidium parvum* (à droite) chez un veau 17
- Figure 2.1 : Cycle biologique de *Cryptosporidium* 28
- Figure 2.2 : Schéma représentatif du cycle biologique du *Cryptosporidium parvum* 29
- Figure 2.3 : Invasion parasitaire dans les cellules hôtes. Les images illustrent un sporozoïte de *Cryptosporidium* envahissant les cellules épithéliales de l'hôte (à gauche) et un trophozoïte de *Cryptosporidium* dans la vacuole parasitophore (à droite) 29
- Figure 2.4 : A , B : Meronte I et mérozoïtes I. C,D : Développement de meronte I avec mérozoïtes internes de type I. (C,D) ; (E,F,G) : mérontes I matures au stade de mérozoïte I excystation. H : Mérozoïtes libres de type I présentant des régions apicales bien définies (flèche) à 6 h de culture. (H) Mérozoïte de type I envahissant les cellules hôtes 6 h après l'inoculation 31
- Figure 2.5 : Modèle de la structure en 4 couches de la paroi d'un oocyste de *C.parvum* 35
- Figure 2.6 : Les espèces de *Cryptosporidium* trouvées chez les bovins 41
- Figure 2.7 : Diagramme simplifié montrant les étapes et interactions les plus importantes dans la réponse immunitaire acquise contre l'infection à *Cryptosporidium* 48
- Figure 5.1 : Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR 71

Figure 5.2: Principe de la réaction de PCR	73
--	----

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

Figure 7.1 : Fréquence des diarrhées néonatales selon les vétérinaires	84
Figure 7.2 : Origine des diarrhées néonatales	85
Figure 7.3 : Mortalités liées aux diarrhées néonatales du veau	86
Figure 7.4 : Recours au diagnostic de laboratoire	87
Figure 7.5 : Utilisation de vaccin anti-diarrhéique avant vêlage	88
Figure 7.6 : Fréquence des diarrhées néonatales en fonction de l'âge	89
Figure 7.7 : Fréquence des diarrhées néonatales en fonction du sexe	90
Figure 7.8 : Fréquence des diarrhées néonatales selon la saison	91
Figure 7.9 : Fréquence des diarrhées néonatales selon l'état d'hygiène des étables	92
Figure 7.10 : Fréquence des diarrhées néonatales en fonction des modalités de distribution de colostrum	93
Figure 7.11 : Carte montrant la situation et la répartition géographique des exploitations laitières	101
Figure 7.12 : <i>Cryptosporidium</i> après coloration de Ziehl Neelsen modifiée (photo personnelle)	106
Figure 7.13: Fréquence de la distribution selon la consistance et l'âge	112
Figure 7.14 : Prévalence du parasite selon test ELISA et Consistance	113
Figure 7.15 : Fréquence entre ELISA et Saison	114
Figure 7.16: Comparaison entre ELISA et Sexe	115
Figure 7.17 : Corrélation entre ELISA négatif, ED et END et l'âge	116
Figure 7.18 : Corrélation entre échantillons diarrhéique & ELISA positif & ELISA négatif & l'âge	117
Figure 7.19 : Révélation des produits PCR suite à l'amplification par PCR	129
Figure 7. 20 : Relations évolutives entre les sous-génotypes <i>C.parvum</i> du locus GP60 déduit par une analyse Neighbor-Joining.	135

## INTRODUCTION

Les premiers jours qui suivent la naissance représentent une période critique dans la vie des animaux. Le veau se trouve dès la naissance dans un environnement hostile ; il est vulnérable aux infections vu que sa défense immunitaire est immature.

Parmi les affections touchant les animaux jusqu'à 4 semaines d'âge, les diarrhées néonatales représentent la principale cause de morbidité et de mortalité chez les jeunes veaux. Selon les élevages, elles peuvent affecter 10 à 80% des effectifs.[1] Une simple modification alimentaire ou un stress (allotement) peuvent provoquer l'apparition de la diarrhée. Parallèlement des virus, des bactéries ou des parasites peuvent également en être responsables [1]

Selon Bendali et al [2] ; Scott et al [3], la diarrhée néonatale est une maladie multifactorielle complexe affectée par les caractéristiques intrinsèques du veau, son statut nutritionnel et immunologique, la gestion du troupeau, l'environnement et divers agents infectieux.

La cryptosporidiose est une pathologie causée par le *Cryptosporidium* un parasite protozoaire cosmopolite dont le nom en grec signifie « spores cachées », c'est un parasite qui possède une distribution mondiale, ce sont des organismes unicellulaires eucaryotes capables d'infecter le système digestif des animaux domestiques et sauvages (mammifères, oiseaux, poissons, reptiles et amphibiens [4] ;[5] causant des maladies gastro-intestinales asymptomatiques ou légères à sévères.[6] ;[7] ;[8].

L'absence de traitement ainsi que le manque d'efficacité des désinfectants font que *Cryptosporidium* est un microorganisme occasionnant des pertes économiques importantes au sein du cheptel. [9]

Des études menées dans des pays industrialisés ont montré la présence de quatre espèces principales de *Cryptosporidium* qui affectent généralement les bovins laitiers, notamment *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni*. [10] ;[11] ;[12] ;[13].

Le diagnostic de laboratoire est donc obligatoire pour identifier ce protozoaire. Il est basé principalement sur la coprologie.[14].

En Afrique, des études récentes ont montré que la cryptosporidiose est un problème de santé particulièrement important qui se classe au deuxième rang, après le *Rotavirus*, parmi les agents étiologiques de diarrhée modérée à sévère chez les très jeunes enfants.[15]

De nombreuses études réalisées dans les pays africains pour estimer le risque de cryptosporidiose chez l'homme et l'animal, décrire les espèces et génotypes en circulation et élucider les voies de transmission.[16] ;[17].

En Algérie, des études ont montré la présence d'infections à *Cryptosporidium* dans 0,1% à 30% des populations humaines étudiées en 2013 par Benouis et al [18] ; et durant la même année par Hamaidi-Chergui et al.[19] et cela bien qu'aucune donnée moléculaire provenant d'isolats humains n'est actuellement disponible en Algérie.

Des études effectuées en 2016 par Hocine et al [20] ; en 2017 par Benhouda et al [21] ; Baroudi et al [22] sur la cryptosporidiose bovine, des taux enregistrés variant de 19% à 84%.

La cryptosporidiose représente le type de pathologie pour lequel la résolution de la problématique est nécessairement préventive.

En outre, nous connaissons mal la part de l'agriculture et des animaux comme source de contamination de l'eau par *Cryptosporidium* en milieu agricole en Algérie.

Malgré la bonne connaissance de la cryptosporidiose qui ne cesse d'évoluer et les chiffres d'augmenter chez l'homme et l'animal, ceci pourrait être due à la méconnaissance du génotype circulant. Il nous est apparu opportun de réaliser cette thèse et devant le besoin d'approfondir nos connaissances sur la cryptosporidiose. Nous nous sommes tracés les objectifs suivants :

-Une enquête menée auprès des vétérinaires privés des différentes régions de l'Algérie pour connaître la conduite à tenir face aux diarrhées néonatales des veaux.

-Face aux données récoltées durant notre enquête et en partant de ces orientations un deuxième objectif est de déterminer la prévalence de *Cryptosporidium sp* dans les différents élevages bovins situés au Centre, Ouest et Est de l'Algérie en utilisant la technique de référence, la coloration de Ziehl Neelson modifiée, le test ELISA pour le diagnostic antigénique de *Cryptosporidium* et le génotypage de *Cryptosporidium* par la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction).

## CHAPITRE 1 INTESTINS DU VEAU

### 1.1. Rappels Anatomo-physiologique

Chez le veau, la digestion se déroule dans l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle se compose de plusieurs sections : le duodénum qui constitue la première section de l'intestin grêle, prend naissance au niveau de la caillette et est prolongé par le jéjunum et l'iléon. L'iléon abouti quant à lui au niveau du caecum, qui forme avec le colon et le rectum les trois sections du gros intestin.[23] La paroi de l'intestin grêle se compose de 4 couches concentriques. De la lumière intestinale vers l'extérieur de l'organe on distingue : la muqueuse, composée d'un épithélium simple et cylindrique, du chorion à l'origine des villosités, et de la musculaire de la muqueuse. L'épithélium cylindrique de l'intestin grêle est composé de plusieurs types cellulaires : d'entérocytes matures, pourvus d'une bordure en brosse appelée microvillosité en leur pôle apical, de cellules caliciformes, sécrétant du mucus, et de cellules neuroendocrines.

### 1.2. Phénomènes d'échanges au niveau de la villosité intestinale

Les villosités intestinales permettent l'absorption d'eau, d'hexoses, d'acides aminés d'ions chlorures et de sodium. La sécrétion d'ion chlorure  $\text{Cl}^-$ , d'ion bicarbonate  $\text{HCO}_3^-$  et d'eau se déroule à la base des villosités au niveau des cryptes. L'équilibre est stable lorsque l'absorption d'eau est supérieure à la quantité d'eau excrétée. Lorsque la quantité d'eau sécrétée est supérieure à la quantité d'eau absorbée, le déséquilibre résultant entraîne un phénomène diarrhéique et une déshydratation néfaste pour la santé du veau. [24]

### 1.3. Physiologie digestive : absorption intestinale

L'absorption intestinale est assurée essentiellement par l'intestin grêle. Sa capacité d'absorption est notamment liée à sa structure qui lui confère une surface considérable. La paroi de l'intestin grêle est pourvue de villosités, replis de la muqueuse intestinale séparés par des cryptes. Ces villosités sont-elles mêmes composées d'entérocytes dont le pôle apical forme les microvillosités.

#### 1.3.1. Entérocytes

Les entérocytes ont à la fois une fonction de digestion et une fonction d'absorption. Sur leur membrane apicale se trouvent des enzymes digestives (disaccharidases et peptidases) capables de réduire les nutriments en glucides, acides aminés et peptides assimilables [25]. Au niveau de l'intestin proximal (duodénum et jéjunum), il existe des transporteurs spécifiques sur la membrane apicale permettant le transport couplé du sodium avec un acide aminé, un peptide ou un hexose. Sur la membrane baso-latérale, une pompe adénosine triphosphatase sodium - potassium (Na/K ATPase) autorise la sortie de trois ions sodiques ( $\text{Na}^+$ ) contre l'entrée de deux ions potassiques ( $\text{K}^+$ ). Ce Transport actif permet de maintenir une faible concentration en sodium dans la cellule et donc la création d'un gradient sodique. Le différentiel de concentration et de potentiel électrique établi attire le sodium dans la cellule. Celui-ci pénètre par transport couplé, emmenant avec lui les acides aminés, hexoses, etc. L'eau et les petites molécules passent par diffusion passive grâce aux gradients électrochimiques ainsi créés. L'intégrité des complexes jonctionnels est une condition essentielle au maintien de ces gradients. L'absorption de l'eau est maximale dans la partie proximale de l'intestin grêle en raison de l'importance des espaces intercellulaires et du diamètre des pores jéjunaux qui est deux fois plus grand que celui des pores iléaux [25].

Au niveau de l'intestin distal (iléon et colon), l'entrée d'un ion  $\text{Na}^+$  est couplée à la sortie d'un ion Hydrogène ( $\text{H}^+$ ) et l'entrée d'un ion chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) à la sortie d'un ion Bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ). Ce transport actif est qualifié d'électroneutre. Il est

favorisé par la présence de la pompe Na/K ATPase maintenant une faible concentration intracellulaire en sodium et régulé par le pH de la cellule. La sortie des ions H<sup>+</sup> vers la lumière intestinale, alcalinise la cellule ce qui active la sortie du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et augmente donc la quantité d'ions H<sup>+</sup> dans la cellule. L'échange Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> est ainsi entretenu, permettant l'absorption du sodium. Ce transport est sensible à la concentration intracellulaire en calcium et est donc sous contrôle du système neuro-endocrinien. Lorsque la concentration en calcium augmente, après activation de la calmoduline, l'absorption du sodium et du chlore diminue. Dans le colon distal, le sodium pénètre dans la cellule via un canal sodique sensible à l'aldostérone. La présence d'aldostérone augmente le nombre de canaux sur la membrane.[25] ;[26]

### 1.3.2. Cellules des cryptes :

Les cellules des cryptes sont des cellules immatures qui ne possèdent qu'une faible capacité d'absorption et aucune capacité de digestion. Elles sont à l'origine de la régénération des cellules des villosités. Elles acquièrent ces deux fonctions (régénération et absorption) seulement après leur migration. Elles sont néanmoins responsables d'une sécrétion basale voire d'une hypersécrétion lorsqu'elles sont pleinement activées. Grâce au complexe CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein), un transporteur actif, on observe la sortie d'un ion Cl<sup>-</sup> et d'un ion HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> vers le milieu intestinal, ce qui déclenche de façon passive le passage d'eau dans le même sens. [25] ; [26]. Les différents mécanismes exposés sont présentés dans la (figure1.1).

En temps normal, lorsque l'absorption villositaire dépasse la sécrétion cryptale, une absorption nette des fluides est observée. Toutefois, ce rapport peut s'inverser entraînant alors un phénomène de diarrhée [24].

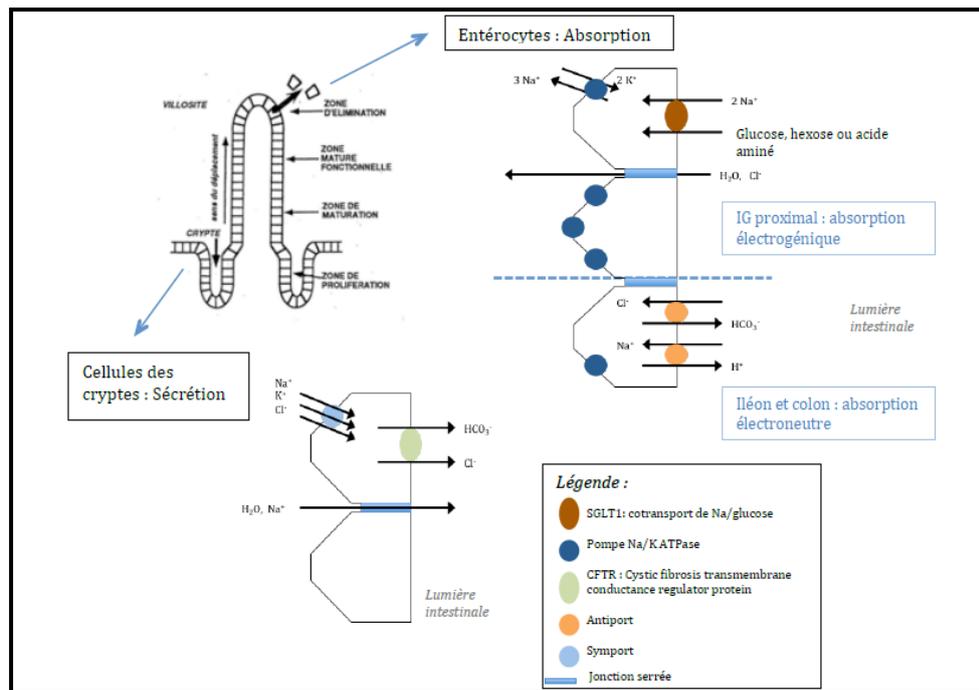


Figure1.1: Mécanismes physiologiques d'absorption et de sécrétion au niveau de la muqueuse intestinale. [26]

## 1.2. Diarrhées néonatales du nouveau-né

### 1.2.1. Définition

La diarrhée est caractérisée par un ramollissement des fèces et une fréquence d'émission trop élevée. Elle fait suite à un déséquilibre entre absorption et sécrétion d'eau au niveau de l'intestin grêle. Les diarrhées des veaux âgés de 2 jours à 3 mois sont souvent dues à plusieurs causes agissant en même temps. Elles sont très souvent une pathologie de groupe. Elles peuvent avoir des conséquences graves : maladie, retards de croissance, mortalité, pertes économiques. Certains germes sont transmissibles à l'homme.

Legrand C [27] atteste que les causes de diarrhées sont multiples : La plupart du temps elles sont d'origine infectieuse mais peuvent parfois être d'origine nutritionnelle.

Par ailleurs, Les diarrhées néonatales sont des maladies infectieuses déclenchées par la contamination des intestins, par un ou plusieurs microbes. La contamination

se fait essentiellement par voie orale à partir de litières contaminées, quelques fois les agents infectieux peuvent contaminer le tube digestif par voie sanguine, depuis un nombril infecté par exemple. [27]

Les diarrhées des veaux peuvent être un fléau au sein des élevages allaitants et avoir une incidence économique très importante due à la mortalité et aux soins que demandent les veaux sans garantie de survie.

Une diarrhée sur un veau peut rapidement devenir une épidémie difficilement contrôlable et engendrer des retards de croissance difficile à rattraper. [27]

### 1.2.2. Mécanismes impliqués dans les phénomènes diarrhéiques

On distingue trois mécanismes pouvant-être à l'origine d'un phénomène diarrhéique : la diarrhée par sécrétion, la diarrhée par maldigestion-malabsorption et la diarrhée d'origine inflammatoire.

#### A. Diarrhée sécrétoire

La diarrhée sécrétoire est provoquée par les entérotoxines produites par certaines bactéries, notamment les *Escherichia coli* entérotoxigènes. Ils produisent une toxine thermostable, STa qui se fixe sur les récepteurs membranaires à la guanylate cyclase présents à la surface des entérocytes et des glandes de Lieberkühn. Cette fixation provoque l'activation de la guanylate cyclase et la production d'un second messager intracellulaire, la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), provoquant une augmentation de la sécrétion de chlorures Cl<sup>-</sup> dans les cellules glandulaires et l'inhibition de l'absorption de sodium Na<sup>+</sup>. Cela stoppe l'absorption d'eau, de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et de Cl<sup>-</sup> vers les entérocytes et conduit à une accumulation liquidienne dans la lumière intestinale sans provoquer de lésion cellulaire [28]. Le débit de filtration glomérulaire diminue pour pallier la déshydratation et préserver l'eau conduisant à une insuffisance pré-rénale et l'accumulation de déchets toxiques dans le sang, notamment l'urée.

## B. Diarrhée par maldigestion-malabsorption

Elle est caractéristique des infections virales à *Rotavirus* et *Coronavirus* ainsi que les cryptosporidies. Elle est caractérisée par une altération de la capacité d'absorption des nutriments et de l'eau. Lors de Rotavirose, les virus colonisent le sommet des villosités constituant la bordure en brosse des entérocytes dans l'intestin grêle. Cela aboutit à la dégénérescence des entérocytes et à leur remplacement par des cellules cuboïdes, peu différenciées, dépourvues de l'attirail enzymatique nécessaire pour assurer la fonction digestive. Le lactose n'est plus digéré et l'eau, les ions et les autres nutriments ne sont plus absorbés [29]. [30].

La physiopathologie des agents précédemment cités repose sur l'atrophie villositaire des entérocytes et l'hyperplasie glandulaire. La sévérité de la diarrhée est directement dépendante de l'étendue des lésions intestinales. L'initiation de fermentations microbiennes coliques des glucides non absorbés dans l'intestin grêle, à l'origine de la production d'acide lactique à fort pouvoir osmotique aggrave la diarrhée. Cette diarrhée est aggravée par l'installation progressive d'une hypomotilité intestinale.

## C. Diarrhée d'origine inflammatoire

Elle est la conséquence directe de l'inflammation très fréquemment engendrée par les différents agents infectieux. Du plus au moins inflammatoire, on trouve les salmonelles qui engendrent une nécrose des entérocytes et une exsudation plasmatique conséquente puis les virus et les cryptosporidies. La production de médiateurs de l'inflammation, d'amines vasoactives et de prostaglandines conduit à l'hypersécrétion d'ions et d'eau dans la lumière intestinale. [29]. [30].

### 1.2.3. Etiologie des diarrhées néonatales du veau

L'étiologie du syndrome diarrhéique est parfois difficile à déterminer à la vue de l'association fréquente de divers agents causals.

Les agents infectieux sont régulièrement incriminés lors de syndrome diarrhéique, on en distingue deux types : d'un côté les agents non parasitaires tels que les bactéries et les virus, et de l'autre les parasites proprement dits.

### 1.2.3.1. Les diarrhées néonatales non parasitaires du veau

#### 1.2.3.1.1. Les diarrhées d'origine bactérienne

Lors de la naissance, le tube digestif du veau est totalement stérile. Il est colonisé par une flore bactérienne dans les 24 heures qui succèdent la mise-bas.

Deux bactéries sont principalement impliquées lors de GENN : les colibacilles et les salmonelles (Figure 1.2).

#### A. Colibacillose

Elle est provoquée par *Escherichia coli*, bactérie aéro-anaérobie facultative Gram négative présente abondamment dans les intestins, qu'elle colonise dans les huit premières heures de vie. Ainsi dans l'iléon d'un veau sain, on dénombre  $10^6$  UFC/ml de contenu alors que chez un veau atteint de colibacillose, on retrouvera  $10^9$  à  $10^{10}$  UFC/ml de contenu. On distingue 3 groupes d'*E. coli* classés selon les facteurs de pathogénicité qu'ils portent : on parle de pathotypes [30].

#### A.1. *Escherichia coli* entérotoxigènes (ECET) :

Ils possèdent 2 types de facteurs de pathogénicité majeurs : une adhésine permettant l'attachement à la muqueuse intestinale (fimbriae : F5 anciennement K99, F41, FY ou non fimbriaire : CS31A) et une entérotoxine thermostable (STa et STb) ou thermolabile (LT) stimulant la sécrétion des cellules des cryptes. Les ECET entraînent l'apparition brutale d'une diarrhée aqueuse de couleur jaune paille, profuse associée à une déshydratation sévère, aboutissant rapidement à un choc hypovolémique voire la mort en 48 à 72 heures. Ils touchent principalement des veaux âgés de moins de 5 jours (figure 1.2). La colibacillose à ECET est très fréquente [31]

Enfin, les *E. coli* CS31A ont été supposés responsables de la pathogénie du syndrome de la gastro-entérite paralysante.

A-2- *Escherichia coli* entéropathogènes (ECEP) et *Escherichia coli* vérotoxino-gènes (ECVT) (anciennement *Escherichia coli* entérohémorragiques (ECEH)

Ces 2 pathotypes d'*E. coli* provoquent chez des veaux âgés de 8 à 21 jours une diarrhée mucoïde, parfois hémorragique associée à du ténésme et des signes généraux graves lors d'atteinte sévère (apparition d'une anémie). La pathogénicité des ECVT leur est conférée par des vérotoxines VT1 et 2.

### A.3. *Escherichia coli* nécrotoxino-gènes (ECNT)

Ils provoquent soit une entérite mucoïde avec un fort abattement, soit une colite hémorragique. Cette souche est aussi impliquée dans des phénomènes septicémiques associés à des hémorragies multifocales.

La mort est souvent la conséquence d'une défaillance cardiaque résultant du déséquilibre potassique dans le myocarde [32]

### B. Salmonellose

Les 2 sérovars habituellement rencontrés de cette bactérie Gram négative : *S. Typhimurium* et *S. Dublin* sont entéroinvasifs. Cependant, le premier est retrouvé dans 65% des cas confirmés de salmonellose chez le veau de moins de 2 mois et engendre la forme clinique la plus sévère. *S. Dublin* est plus communément impliquée chez les entérites des jeunes adultes. L'infection se traduit sous 3 formes chez le veau : [32]

- Une forme septicémique, touchant des veaux âgés de moins de 3 jours qui meurent brutalement des suites d'un collapsus sans diarrhée. Si l'évolution de la maladie est plus longue, elle peut se traduire par des atteintes articulaire, méningée ou pulmonaire.

- Une forme entéritique caractérisée par de l'abattement, de la fièvre (41°C), de la déshydratation et une diarrhée aqueuse à mucoïde d'odeur fétide contenant parfois des débris fibrineux et du sang.

Des différences sont observées selon le sérovar impliqué : ainsi, *S. Typhimurium* se caractérise par une diarrhée jaune à brune contenant parfois du sang et des lambeaux de muqueuse. Cette forme est mortelle dans 60% des cas. Les animaux survivants sont par la suite cachectiques et peinent à regagner du poids.

- Une forme respiratoire engendrant des symptômes de bronchopneumonie (qu'on ne peut pas distinguer des autres bronchopneumonies infectieuses enzootiques) [32]

On rappellera également que *Clostridium perfringens* peut entraîner l'apparition de diarrhée chez le veau de 5 à 15 jours et provoquer la mort très rapidement même si cet agent n'est pas considéré comme majeur dans l'apparition des GENN. La clostridiose se caractérise par une diarrhée mucoïde souvent associée à de l'abattement, une distension et une douleur abdominale [31].

#### 1.2.3.1.2. Diarrhée d'origine virale :

Les diarrhées d'origine virale concernent essentiellement les veaux âgés de 5 à 15 jours. La sévérité de la symptomatologie ainsi que les taux de morbidité et mortalité associés aux diarrhées virales sont très variables selon l'agent incriminé.

#### C.1. Coronavirus

Le Coronavirus bovin appartient au groupe antigénique 2 de la famille des *Coronaviridae*. C'est un virus de forme sphérique dit en «couronne» et à ARN monocaténaire. Il est à l'origine de diarrhée néonatale chez les jeunes veaux âgés de 5 jours à 1 mois, et est similaire au Coronavirus responsable de la dysenterie hivernale chez les bovins adultes. L'infection par le Coronavirus bovin chez le jeune veau provoque une entérite muco-hémorragique plutôt sévère, s'accompagnant d'un syndrome fébrile et d'une déshydratation majeure.

Le veau atteint présente généralement une diarrhée jaune à verdâtre présentant des traces de mucus ou de sang. La diarrhée au Coronavirus est de gravité sévère chez le veau et peut entraîner son décès. [33] ; [34]. (figure 1.2)

## C.2. Rotavirus

Les Rotavirus sont des virus appartenant à la famille des Reoviridae. Ils sont d'allure sphérique, nus, et contiennent un ARN bicaténaire protégé d'une double capsidie protéique. Parmi les sept sérogroupes existants (noté de A à G), seuls les sérogroupes A, B et C ont été retrouvés chez l'espèce bovine.

Les souches isolées chez le veau lors de diarrhées néonatales appartiennent essentiellement au séro groupe A. Les sérotypes courants du groupe A sont G6, G10, et P5 et P11. Le Rotavirus bovin peut infecter les bovins de tous âges. Il entraîne des diarrhées bénignes chez les veaux âgés de 5 jours à 2 semaines. [33] ;[35] ;[36].

L'infection au *Rotavirus* se manifeste par une diarrhée transitoire, aqueuse, de couleur jaune à blanchâtre chez le veau. La phase clinique dure en général 24 à 72 heures, et s'accompagne généralement d'un syndrome fébrile et de déshydratation. Le *Rotavirus* bovin a un fort taux de morbidité, conféré par sa capacité de résistance dans le milieu extérieur, mais reste rarement létal pour le veau. [33] ;[34]

## C.3.Virus de diarrhée virale Bovine(BVD)

Le virus de la BVD appartient à la famille des Flaviviridae, c'est un petit virus enveloppé à ARN monocaténaire. Il existe deux génotypes du virus de la BVD : Le génotype 1 regroupant 16 sous-génotypes et essentiellement présent en Europe, et le génotype 2, regroupant quant à lui 4 sous-génotypes. Le Virus de la BVD cause occasionnellement de la diarrhée et une thrombocytopenie chez le jeune veau. Cependant son rôle dans les diarrhées néonatales est très controversé à l'heure actuelle;[33] ;[37]

## C.4.Torovirus bovin

Le Torovirus bovin est un virus de la famille des Coronaviridae. Il est à l'origine de diarrhées bénignes à modérées chez des veaux de moins de 3 semaines. [38]

Les agents infectieux non parasitaires sont nombreux et infectent les veaux non sevrés à différents stades de leur croissance.

La figure 1.2 reprend les principaux agents infectieux non parasitaires et leur fenêtre d'infection préférentielle chez le veau non sevré.

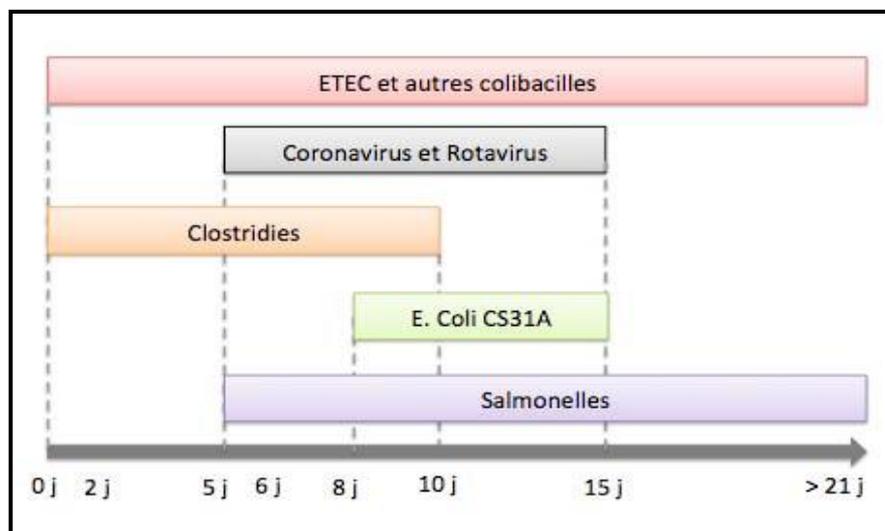


Figure 1. 2 : Représentation schématique des agents infectieux non parasitaires responsables de diarrhée en fonction de l'âge du veau. [39]

### 1.2.3.2. Les diarrhées néonatales parasitaires du veau.

L'origine parasitaire lors de diarrhée néonatale chez le veau est bien souvent sous- estimée, alors que plusieurs espèces parasitaires sont régulièrement incriminées à différents moments de la vie du jeune veau non sevré. Parmi celles-ci, *Cryptosporidium Sp* se détache par sa prévalence, devant les coccidies et les giardias.[39]

#### A. La giardiose à *Giardia duodenalis*

*Giardia duodenalis* est un protozoaire flagellé à caractère zoonotique. C'est un parasite à répartition mondiale dont la prévalence est souvent sous-estimée chez les bovins. Il existe plusieurs assemblages de *Giardia duodenalis* (noté de A à G)

possédant chacun une spécificité d'espèce. Chez les bovins les assemblages les plus fréquemment isolés sont l'assemblage E, qui est spécifique des bovins, et l'assemblage A pourvu d'un caractère zoonotique. *Giardia duodenalis* est isolé chez des bovins de tout âge, et peut-être à l'origine d'un simple portage asymptomatique ou d'une giardiose clinique variant de l'amaigrissement chronique à un syndrome de maldigestion sévère. Les veaux peuvent-être infectés dès les deux premières semaines de vie via l'ingestion de kystes présents dans le milieu environnant. Lors de giardiose clinique entraîne une diarrhée mucoïde et de l'abattement chez les veaux. Des retards de croissance sont également observés suite à une giardiose clinique ou lors de portage chronique.

Chez les très jeunes veaux, *Giardia duodenalis* est détecté le plus souvent en association avec d'autres agents de diarrhée néonatale (*C.parvum* et les *Rotavirus* principalement).[33] ;[40] ;[41].

#### B .La Cryptosporidiose à *Cryptosporidium parvum* :

La cryptosporidiose est essentiellement provoquée par *C.parvum* [42]. Elle touche les veaux à partir de 4 jours et se traduit par une diarrhée et une déshydratation plus ou moins marquées. Les signes cliniques peuvent durer plusieurs semaines et conduire à des retards de croissance importants.

Une fois, les oocystes ingérés sont exposés aux acides gastriques et sels biliaires, ce qui permet la libération des sporozoïtes. Ceux-ci envahissent les entérocytes avec une localisation préférentielle au niveau de l'iléon mais peuvent coloniser la totalité de l'intestin, de la caillette et le colon. Le sporozoïte s'intègre aux cellules en créant une invagination de la membrane apicale, ce qui lui permet de rester extracytoplasmique tout en étant intracellulaire. Selon Wyatt et al [43] expliquent que le parasite entraîne une destruction de l'épithélium intestinal avec pertes d'entérocytes et rétraction des villosités. Il semblerait que le parasite intervienne sur les phénomènes d'apoptose, mais le mécanisme mis en jeu est encore inconnu. D'autre part, Mele et al [44] ont montré que l'apoptose est modulée, inhibée ou favorisée en fonction du stade de développement du parasite, suggérant que celui-ci pourrait interagir et réguler l'expression des gènes de l'hôte. Par ailleurs, Foster DM et Smith GW [45] expliquent que les conséquences

de ces phénomènes sont une perte de surface d'absorption et une diminution du nombre de transporteurs conduisant à une diarrhée par malabsorption. De plus, Blikslager et al [46] ont montré que les cellules de cryptes sont en partie capables de compenser ces pertes grâce à un co-transporteur Na/glutamine. Cette étude montre également qu'en présence d'un inhibiteur des prostaglandines, l'absorption de sodium est favorisée. Cette constatation suggère l'existence d'un phénomène inflammatoire intervenant dans la diarrhée à *C. parvum*. Les prostaglandines PGE2 et PGI2 sont retrouvées à des concentrations élevées dans les tissus infectés. PGE2 activerait la sécrétion de  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  et inhiberait l'absorption de NaCl par un mécanisme calcium dépendant impliquant l'AMPc [47]. De plus PGE2 active les macrophages, eux-mêmes producteurs de PGE2 et PGI2. PGI2 agirait via le système nerveux entérique, provoquant la sécrétion d'acétylcholine (Ach) et de VIP. Ces deux molécules activent la même voie calcium dépendante que PGE2 [45]. Ces mécanismes sont présentés dans la figure 1.3.

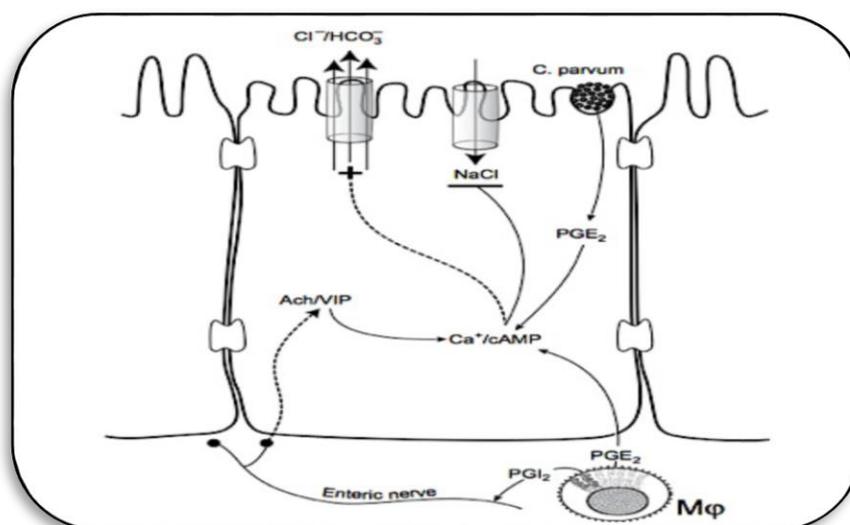


Figure 1.3 : Mécanismes d'action de *Cryptosporidium parvum* au niveau de l'épithélium intestinal. [45]

Légende:

Suite à l'infection par *C. parvum*, PGE2 est sécrétée et les macrophages sont activés. Ces macrophages activés sécrètent PGI2 et PGE2. PGI2 active le système nerveux entérique ce qui provoque la libération de Ach et VIP. Ach, VIP et PGE2 sont responsables d'une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui active la sécrétion de  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Cl}^-$  et diminue l'absorption de NaCl. Ach= acétylcholine; Mφ=

macrophages activés; PG= prostaglandines; VIP= polypeptide intestinal vaso-actif; Enteric nerve = système nerveux entérique.

La diarrhée causée par *C. parvum* peut se manifester de deux façons : la diarrhée par malabsorption qui est causée par une perte d'entérocytes et affaiblissement des villosités (figure 1.4) qui réduit la surface intestinale, ce qui entraîne une diminution de l'absorption d'eau et de nutriments [48] ;[49]. La diarrhée sécrétoire survient lorsque la sécrétion intestinale augmente. Certains organismes infectieux produisent des toxines qui stimulent la sécrétion intestinale en envahissant les cellules épithéliales de l'hôte [50]

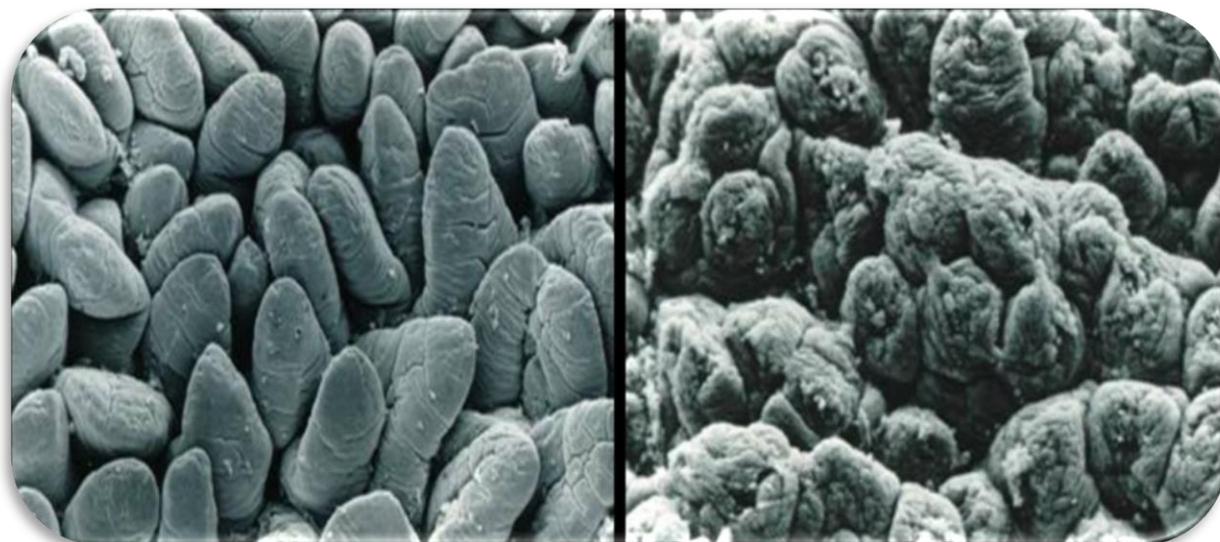


Figure 1.4 : Des villosités intestinales saines (à gauche) et des dommages intestinaux causés par une infection à *Cryptosporidium parvum* (à droite) chez un veau. [48]

## CHAPITRE 2 CRYPTOSPORIDIES

### 2.1. Etiologie

#### 2.1.1. Découverte du parasite

Le genre *Cryptosporidium* fut décrit pour la première fois en 1907 par [51] suite à l'observation du parasite dans les glandes gastriques d'une souris de laboratoire. Le parasite nouvellement découvert fut ainsi nommé *C. muris*. En 1912, Tyzzer mit en évidence chez la souris une autre espèce du même genre localisée dans l'intestin grêle et de plus petite taille qu'il nomma *C. parvum* [52] ;[53] ;[54]

En 1955, la survenue de diarrhée aiguë chez des dindes permit à Slavin de décrire une nouvelle espèce, *C. meleagridis*. Dans les vingt années qui suivirent, le genre *Cryptosporidium* fut retrouvé dans les intestins de veaux diarrhéiques confirmant ainsi l'importance pathogénique du parasite [54] ;[55] . Dès lors, des recherches permirent la découverte de nouvelles espèces du genre *Cryptosporidium* et leur pathogénicité.

Avec la découverte des premiers cas humains de cryptosporidiose en 1976 et le développement du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) que le monde médical s'est dirigé vers le parasite, son pouvoir pathogène et son opportunisme [49] ;[55];[56];[57]. En 1993, suite à l'épidémie de Milwaukee dans le Wisconsin (États-Unis) qui a touché plus de 400 000 personnes, que la cryptosporidiose a été reconnue comme un problème de santé publique [54]. Enfin les techniques de biologie moléculaire dans les années 1990 ont permis une meilleure connaissance sur la taxonomie du genre *Cryptosporidium* ainsi que l'identification des espèces [58].

#### 2.1.2. Systématique

La Taxonomie du genre *Cryptosporidium* et la nomenclature des espèces connaissent de nombreux remaniements de par la publication de nouvelles données moléculaires quasi mensuelles.[54]. L'avènement des outils moléculaires

dans la caractérisation et l'analyse phylogénétique de *Cryptosporidium sp* a changé la compréhension de la taxonomie du genre *Cryptosporidium*, laquelle met en avant la biologie, l'épidémiologie et l'importance sanitaire de chaque espèce de cryptosporidies [54] ;[58]

Historiquement, le genre *Cryptosporidium* appartient au phylum des *Apicomplexa*, et plus précisément à la classe des *Sporozoa*, sous-classe des *Coccidia*, à l'ordre des *Eucoccidia* et à la famille des *Cryptosporidiidés*.

Cette classification historique a longtemps apparenté le genre *Cryptosporidium* aux coccidies, de par leur cycle biologique et la similarité de leurs caractères morphologiques. En dépit des similitudes morphologiques, les données moléculaires actuelles montrent que *Cryptosporidium sp* est plus proche des grégarines que des coccidies. [59] ; [60]

Plus de 20 *Cryptosporidium sp* et génotypes ont été signalés chez l'homme, bien que *C.parvum* et *C. hominis* restent les plus communs [58] ; [61];[62]

*C.parvum* et *C.hominis* sont responsables de la majorité des infections chez l'homme, bien que dans certains pays, *C.meleagridis* soit aussi présent que *C. parvum* chez les populations humaines [58].

Les grégarines (phylum Apicomplexa; classe Gregarinomorpha) constituent un groupe très large, diversifié, unicellulaires qui infectent principalement les intestins et autres espaces extracellulaires d'invertébrés et de vertébrés inférieurs (principalement les arthropodes, les mollusques et les annélides), qui sont abondants dans les sources d'eau naturelles [63] ;[64] ;[65]

La transmission de grégarines à de nouveaux hôtes se fait généralement par ingestion orale d'oocystes dans les milieux aquatiques et terrestres.

Le cycle de vie des grégarines est constitué uniquement de gamétogonie et de sporogonie et seules quelques espèces présentent une mérogonie.

La classification taxonomique de *Cryptosporidium sp*. telle qu'elle est admise à l'heure actuelle est présentée dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Classification taxonomique de *Cryptosporidium* sp. (Adapté selon O'Donoghue PJ [55] ; Leconte M [66])

Classification	Nom	Caractéristiques
Hyper-royaume	Eucaryote	- Cellule dont le contenu est divisé en zones ayant des fonctions définies
Royaume	Protiste	- Eucaryote unicellulaire
Superphylum	Alveolata	- Présence d'alvéoles (systèmes d'espaces péribasaux sous-membranaires)
Phylum	Apicomplexa	- Toutes les espèces sont des parasites - Présence d'un complexe apical
Classe	Sporozoasida	- Reproduction sexuée et asexuée - Production d'oocystes
Sous-classe	Coccidiasina	- Cycle de développement faisant intervenir les stades schizogonie, gamétogonie et sporogonie - Présence de gamontes de petite taille
Ordre	Eucoccidiorida	- Présence des stades mérogonie et schizogonie
Sous-ordre	Eimeriorina	- Développement indépendant des macrogamètes et des microgamètes - Zygote non mobile
Famille	Cryptosporidiidae	- Oocystes contenant 4 sporozoïtes nus - Stades endogènes comportant un organelle d'attachement - Cycle de développement monoxène
Genre	<i>Cryptosporidium</i>	- Développement intracellulaire mais extracytoplasmique - Microgamètes non flagellés - Très grande prolifération - Oocystes atypiques possibles - Absence de spécificité pour certaines espèces

### 2.1.3. Espèces de cryptosporidies

#### 2.1.3.1. La notion d'espèce

À l'heure actuelle, 31 espèces ont été décrites chez différents hôtes [61] ;[67], [68] ;[69] [70] ;[71] . Avec le développement des outils moléculaires, plus de 60 génotypes de *Cryptosporidium* ont été recensés dans la littérature scientifique et en attente d'être reconnus comme des espèces à part entière par l'International Code for Zoological Nomenclature (ICZN) [8] ;[12] ;[72].

Autrefois, la reconnaissance des espèces était basée sur des critères morphologiques tant au niveau du parasite que de ses oocystes, aujourd'hui ils apparaissent insuffisants [12] ;[54].

Pour être acceptées comme des espèces en tant que telles, celles-ci doivent satisfaire à plusieurs critères :

- Des critères morphologiques concernant la taille, la forme et la structure des différents stades de développement et notamment de l'oocyste ;
- Des critères biologiques : le site de prédilection de l'infection, la durée des périodes pré-patentes et patentes, l'intensité de l'excrétion des oocystes, le degré du pouvoir infectieux et des précisions (espèce, âge, statut immunitaire) sur les hôtes infectés naturellement et expérimentalement ;
- Des critères génétiques : des différences dans la séquence nucléotidique de gènes bien connus, codant pour de l'ARNr ou des protéines structurales et/ou fonctionnelles, l'homogénéité des isolats issus d'une même espèce lors de l'analyse phylogénétique, l'absence de recombinaison entre deux espèces supposées différentes. [54]
- Des critères biochimiques peuvent également être retenus pour différencier les espèces mais ceux-ci requièrent des méthodes coûteuses et difficiles à mettre en place [12].

#### 2.1.3.2. Les différentes espèces de *Cryptosporidium* et leurs hôtes

De nombreuses espèces furent décrites en se basant principalement sur l'animal hôte comme critère d'identification [73]. De nouvelles technologies en biologie

moléculaire apparurent à la fin du 20<sup>e</sup> siècle comme la « Polymerase Chain Reaction » ou PCR ce qui permit la différenciation en plusieurs souches distinctes [6] ; [74] ;[75].

En 2007, 14 espèces de *Cryptosporidium* étaient identifiées et répertoriées sur la base de la spécificité d'hôte, du site d'infection, de la morphologie de l'oocyste et de la biologie moléculaire : *C. parvum*, *C. muris*, *C. hominis*, *C. wrairi*, *C. suis*, *C. bovis*, *C. felis* et *C. canis* chez les mammifères, *C. meleagridis*, *C. baileyi* et *C. galli* chez les oiseaux, *C. serpentis* et *C. saurophilum* chez les reptiles ainsi que *C. molnari* chez les poissons.[6] ; [9] ;[75] ; [76] ;[77].

#### 2.1.3.2.1. Bovins

Les espèces les plus fréquemment observées chez les bovins sont *C.parvum* dans le petit intestin (anciennement type 2) et *C.andersoni* dans la caillette [78] ;[79] *C.andersoni* n'est pas reconnue comme étant transmissible à l'homme mais l'espèce serait responsable d'un aspect chronique de la maladie chez des bovins plus âgés. [80]

En 1987, Anderson [81] a identifié une souche de *Cryptosporidium* dans les glandes de l'abomasum de certains bouvillons. L'analyse moléculaire a permis de distinguer *C.parvum* de *C.muris*, *C.felis* a été identifiée par caractérisation génétique chez des vaches de différentes régions [82];[83]. La biologie moléculaire a permis également d'identifier deux génotypes différents des espèces précédemment citées ; *C. bovine* (génotype B) et *C. deer-like* [84].

Fayer et ses collaborateurs ont pu montrer en 2005 le statut d'espèce de *C. bovine* (génotype B) qu'ils ont nommée *C. bovis* [76].

#### 2.1.3.2.2. Humains

*Cryptosporidium hominis* (anciennement *C.parvum* type 1) est la plus communément rencontrée chez l'humain (responsable de près de 97% des cas de cryptosporidiose [77];[85]. *C.parvum* (anciennement type 2) se retrouve aussi

chez l'humain et chez plusieurs autres mammifères. L'abondance de ces deux espèces de *Cryptosporidium* semble varier selon la région étudiée.

#### 2.1.3.2.3. Autres animaux domestiques

Les ovins et caprins sont souvent infectés par *C.parvum*. Les ovins seraient aussi infectés par d'autres espèces ou génotypes retrouvés chez les bovins (*C.bovis*, *C. hominis* et *C. muris*) alors que pour les caprins, *C. muris* a déjà été identifiée [74]. Selon Kvac et al [86] ont montré que les ovins ne sont peut-être pas sensibles à *C.muris* (aucune excrétion durant 56 jours post-infection, pas de signe de diarrhée et absence du parasite au niveau de l'abomasum. Une autre étude effectuée par Ryan et al [80] sur les moutons en Australie qui ont trouvé un seul échantillon positif à *C.muris*. Durant ce même projet, les chercheurs ont constaté que *C. parvum* et *C. hominis* étaient rarement isolées chez les ovins en Australie (génotype des cervidés étant le plus commun) ce qui remet en question le rôle réel des petits ruminants pour le maintien et la transmission zoonotique de la cryptosporidiose.

Les oiseaux domestiques sont susceptibles à l'infection par *C.meleagridis*. Il s'agit de la seule espèce connue de *Cryptosporidium* capable d'infecter des mammifères et des oiseaux [87].

#### 2.1.3.2.4. Animaux de la faune

Les principales espèces rencontrées chez les rongeurs sont *C.parvum*, *C.muris* et *C. génotype souris* [88] ;[85]. Une transmission de *C. muris* entre bovin et souris est soupçonnée mais n'a pu être confirmée par caractérisation génétique [89] mais une souche particulière de *C. muris* a été retrouvée chez la souris par Satoh et al [90].

Les espèces de *Cryptosporidium* ne possèdent pas une spécificité d'hôte stricte. En effet, l'espèce est majoritairement présente chez un hôte en particulier, cependant cette capacité à infecter d'autres hôtes mineurs est responsable du

pouvoir zoonotique du parasite. C'est notamment le cas de *C. ubiquitum* qui est susceptible d'infecter une grande variété d'hôtes et serait donc moins spécifique (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Espèces de cryptosporidies recensées chez les Mammifères

Adapté de [12] ;[66] ;[91].

Espèces	Hôtes majeurs	Hôtes mineurs	Site de prédilection chez l'hôte
<i>Cryptosporidium andersoni</i>	Bovin-Chameau domestique	Ovin	Gastrique (abomasum)
<i>Cryptosporidium baileyi</i>	Poulet Dinde	Calopsitte-Caille Autruche-Canard	Intestinal
<i>Cryptosporidium bovis</i>	Bovin	-	Non connu
<i>Cryptosporidium canis</i>	Chien	Homme	Intestinal
<i>Cryptosporidium cuniculus</i>	Lapin	Homme	Intestinal
<i>Cryptosporidium fayeri</i>	Kangourou	-	Non connu
<i>Cryptosporidium felis</i>	Chat	Homme -Bovin	Intestinal
<i>Cryptosporidium galli</i>	Poulet -Fringillidé Gros-bec-Grand Tétrás	-	Gastrique
<i>Cryptosporidium hominis</i>	Homme Singe	Ovin Dugong	Intestinal
<i>Cryptosporidium macropodum</i>	Kangourou	-	Non connu
<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	Dinde Homme	Perroquet	Intestinal
<i>Cryptosporidium molnari</i>	Daurade royale Bar commun	-	-

<i>Cryptosporidium muris</i>	Souris Chameau domestique	Homme Daman du Cap Chèvre- chamoisée	Gastrique
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Bovin- Ovin- Caprin Homme	Cerf -Souris Porc	Intestinal
<i>Cryptosporidium ryanae</i>	Bovin	Homme	Non connu
<i>Cryptosporidium saurophilum</i>	Lézard	Serpent	Intestinal
<i>Cryptosporidium scophthalmi</i>	Turbot	-	-
<i>Cryptosporidium serpentis</i>	Serpent Lézard	-	Gastrique
<i>Cryptosporidium suis</i>	Porc	-	Intestinal
<i>Cryptosporidium ubiquitum</i>	Ruminants Rongeurs Carnivores-Primates - Homme	-	Intestinal
<i>Cryptosporidium varanii</i>	Varan émeraude	-	-
<i>Cryptosporidium viatorum</i>	Homme	-	Intestinal
<i>Cryptosporidium wrairi</i>	Cobaye	-	Intestinal
<i>Cryptosporidium xiaoi</i>	Ovin	Caprin -Yack Homme	Non connu

### 2.1.3.3. Espèces affectant les Ruminants

La présence de *Cryptosporidium sp* a été mise en évidence dans les années 1970 chez les ruminants. Ceux-ci constituent le groupe d'espèces, parmi les mammifères, le plus concerné par la cryptosporidiose avec l'espèce humaine.

Les espèces infectant de manière naturelle les ruminants domestiques sont au nombre de 7 : *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. hominis*, *C. xiaoi* et *C. ubiquitum* ; d'autres espèces ou génotypes infectant les ruminants uniquement de manière exceptionnelle. Parmi les espèces citées, seule *C. bovis* n'est pas capable d'infecter l'homme [92].

-*C. andersoni* est une espèce présentant des oocystes de grande taille, elle parasite l'abomasum des ruminants. Elle est rarement retrouvée chez les jeunes de moins de 2 mois mais plus généralement chez des animaux plus âgés. Son pouvoir pathogène serait faible, de même que son pouvoir zoonotique [58] ;[78]

-*C. bovis* est une espèce infectant les animaux sevrés [84]. Les hôtes majeurs sont les bovins tandis que les ovins sont des hôtes mineurs et les caprins très rarement atteints [58]. Les animaux atteints ne présentent pas de signes cliniques et le pouvoir zoonotique de l'espèce est très faible [11] ;[92]

-*C. ryanae*, anciennement dénommée *Cryptosporidium* « deer-like », cette espèce atteint uniquement les bovins, plus souvent les bovins sevrés [89]. L'infection par *C.ryanae* ne provoque que peu de signes cliniques et le pouvoir zoonotique reste faible [11] ;[92].

-*C. hominis*, anciennement connue sous le nom de *C.parvum* génotype 1 ou H ou génotype humain, cette espèce atteint principalement les humains et dans de très rares cas les ruminants [93]

-*C. xiaoi*, anciennement dénommée *C.* génotype « bovis-like », cette espèce est rencontrée chez le mouton à diverses périodes de la vie [94] ;[95]. Elle infecte très rarement les humains et les signes cliniques liés à l'infection chez les animaux ne sont pas importants [94],

-*C. ubiquitum*, autrefois connue sous le nom de *C.* génotype « cervine » [96], cette espèce a été rencontrée chez des ruminants domestiques et sauvages que chez les humains, et d'autres espèces animales à travers le monde.

## 2.1.4. Biologie du parasite

### 2.1.4.1. Cycle évolutif

Le cycle de développement des espèces du genre *Cryptosporidium*, est un cycle monoxène qui se déroule chez un même hôte (figure 2.1 et 2.2).

Il comprend deux mérogonies ou multiplications asexuées et une gamétogonie. La transmission d'un hôte à l'autre se fait via l'oocyste excrété dans les fèces des sujets infectés. Après ingestion, l'oocyste, favorisé par l'action de la trypsine et des sels biliaires, libère les 4 sporozoïtes dans le tractus digestif. Les sporozoïtes pénètrent les cellules épithéliales par leur région apicale qui contient le complexe apical et vont se loger dans des vacuoles parasitophores se différenciant en trophozoïtes. Le parasite acquiert une position intracellulaire mais se maintient à hauteur de la bordure en brosse. Les sporozoïtes de *Cryptosporidium parvum* adhèrent aux cellules épithéliales de l'iléon, spécifiquement à la jonction iléo-cécale dans le cas de *Cryptosporidium parvum*. Après la fixation, les sporozoïtes s'incorporent dans une vacuole parasitophore formée par la membrane de la cellule hôte tout en restant extracytoplasmiques. Un organite nourricier, unique à *Cryptosporidium* est présent à tous les stades intracellulaires, agit comme interface entre le parasite et la cellule hôte. Après le développement de l'organite nourricier (figure 2.3) le sporozoïte lui-même devient plus sphérique et forme un trophozoïte. L'organite nourricier permet au parasite d'obtenir tous les nutriments nécessaires de l'hôte tout en étant protégé de la réponse immunitaire de l'hôte et des conditions intestinales défavorables.[97] ;[98]

Le cycle de multiplication asexuée appelé également mérogonie ou schizogonie peut alors commencer et mener à la formation de mérontes de type 1 qui contiennent 8 mérozoïtes. Ces derniers sont libérés de la vacuole pour envahir les cellules voisines. Ils forment ensuite soit de nouveau des mérontes de type 2, soit des mérontes de type 2 (contenant 4 mérozoïtes de type 2). (figure 2. 4).

Les mérozoïtes de type 2 vont initier le cycle de multiplication sexuée ou gamétogonie et se différencient soit en microgamontes (male), soit en macrogamontes (femelle). Chaque noyau contenu dans les microgamontes (devenus plurinucléés) est ensuite incorporé dans un microgamète. Les macrogamontes demeurent uninucléés en devenant des macrogamètes. Une fois matures les microgamètes fécondent le macrogamète pour donner naissance à un

zygote diploïde, qui se différencie en oocystes in situ. Il existe deux types d'oocystes:

-Les oocystes à paroi épaisse (80%), qui se retrouvent excrétés dans les fèces des hôtes infectés, et sont très résistants à de nombreuses conditions environnementales [99] ; [100].

-Les oocystes à paroi fine (environ 20%) probablement responsables de l'auto-infection interne. [101]

Les particularités du cycle de *Cryptosporidium* par rapport à celui des autres coccidies résident en l'excrétion d'oocystes directement infectants, le recyclage des mérozoïtes de 1<sup>ère</sup> génération et la formation d'oocystes à paroi fine qui se désenkystent immédiatement in situ, entretenant l'infection. Ces particularités favoriseraient le maintien de l'infection chez les sujets immunodéprimés.

Les oocystes sporulés à paroi épaisse sont excrétés qui survivent plusieurs mois dans des climats frais et humides, mais peuvent être inactivés par dessiccation [102]. La contamination de l'environnement et la persistance des oocystes est un facteur important dans l'épidémiologie de la cryptosporidiose bovine. Les veaux peuvent excréter entre  $10^6$  et  $10^7$  oocystes par gramme de matière fécale (*C. parvum*) alors que leur mère peut rejeter entre 500 et 900 oocystes par gramme lors de la mise-bas (*Cryptosporidium sp*) [103] ;[104] ;[105]

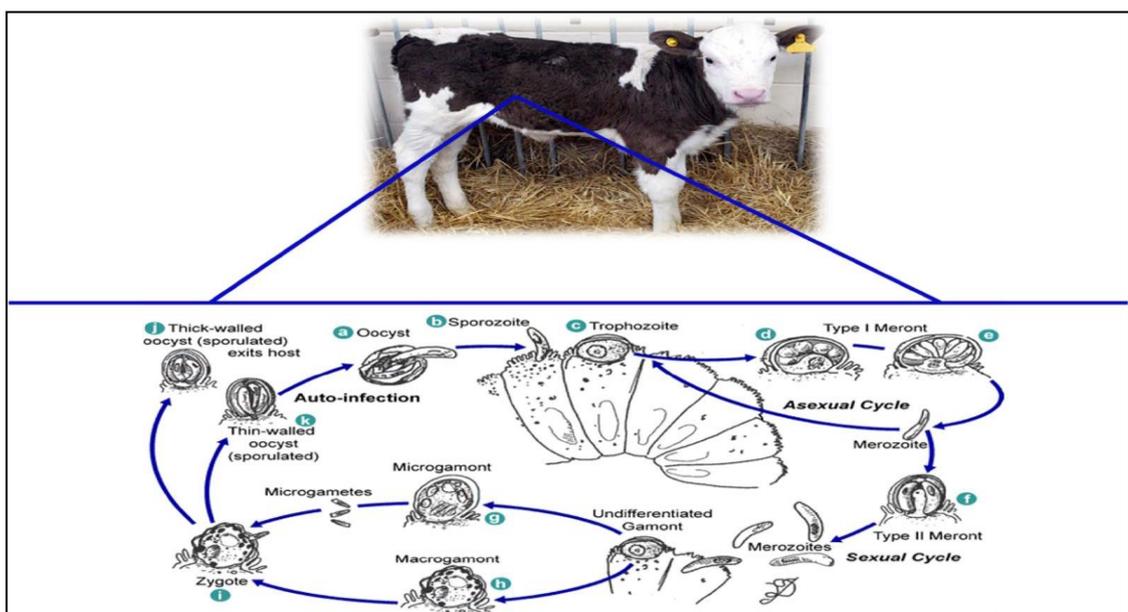


Figure 2.1 : Cycle biologique de *Cryptosporidium* [106]

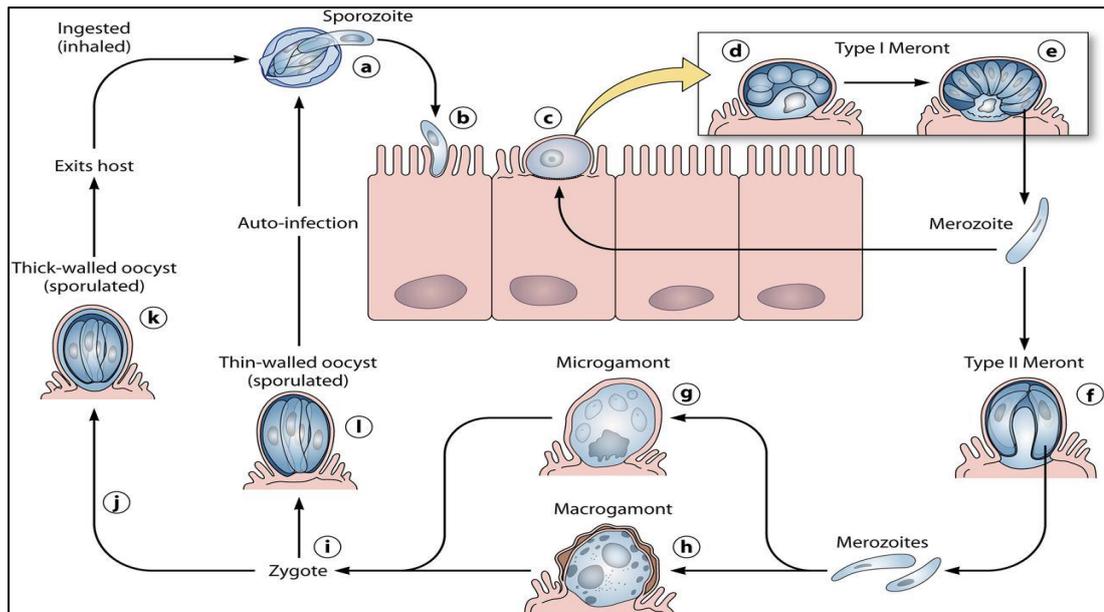


Figure 2.2 : Schéma représentatif du cycle biologique du *Cryptosporidium parvum* [107]

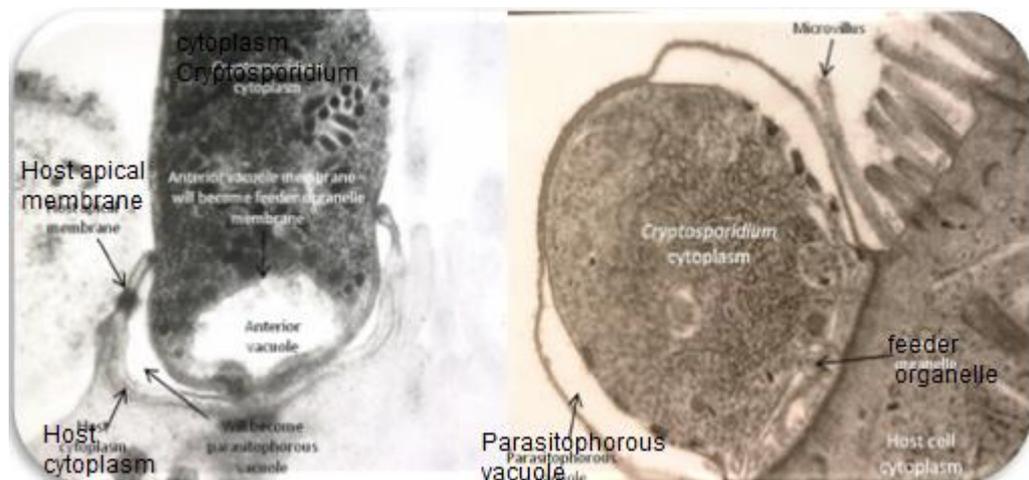


Figure 2.3 : Invasion parasitaire dans les cellules hôtes. Les images illustrent un sporozoïte de *Cryptosporidium* envahissant les cellules épithéliales de l'hôte (à gauche) et un trophozoïte de *Cryptosporidium* dans la vacuole parasitophore (à droite). [49].

#### 2.1.4.2. Déroulement du cycle

##### -Excystation :

L'oocyste à paroi épaisse est ingéré par l'hôte et subit une excystation dans l'iléon.

Sous l'effet des conditions du milieu (température, présence de dioxyde de carbone, enzymes, sels biliaires, conditions réductrices), la paroi de l'oocyste est altérée et se fend libérant ainsi 4 sporozoïtes nus.

Les sporozoïtes s'attachent alors à la membrane apicale de la cellule épithéliale de la bordure en brosse et forment un trophozoïte en s'enfermant dans une vacuole parasitophore qui lui confère une position intracellulaire mais extracytoplasmique. Le trophozoïte ainsi formé possède des organelles d'attachement avec le cytoplasme de la cellule-hôte participant notamment à sa nutrition [55] ;[108].

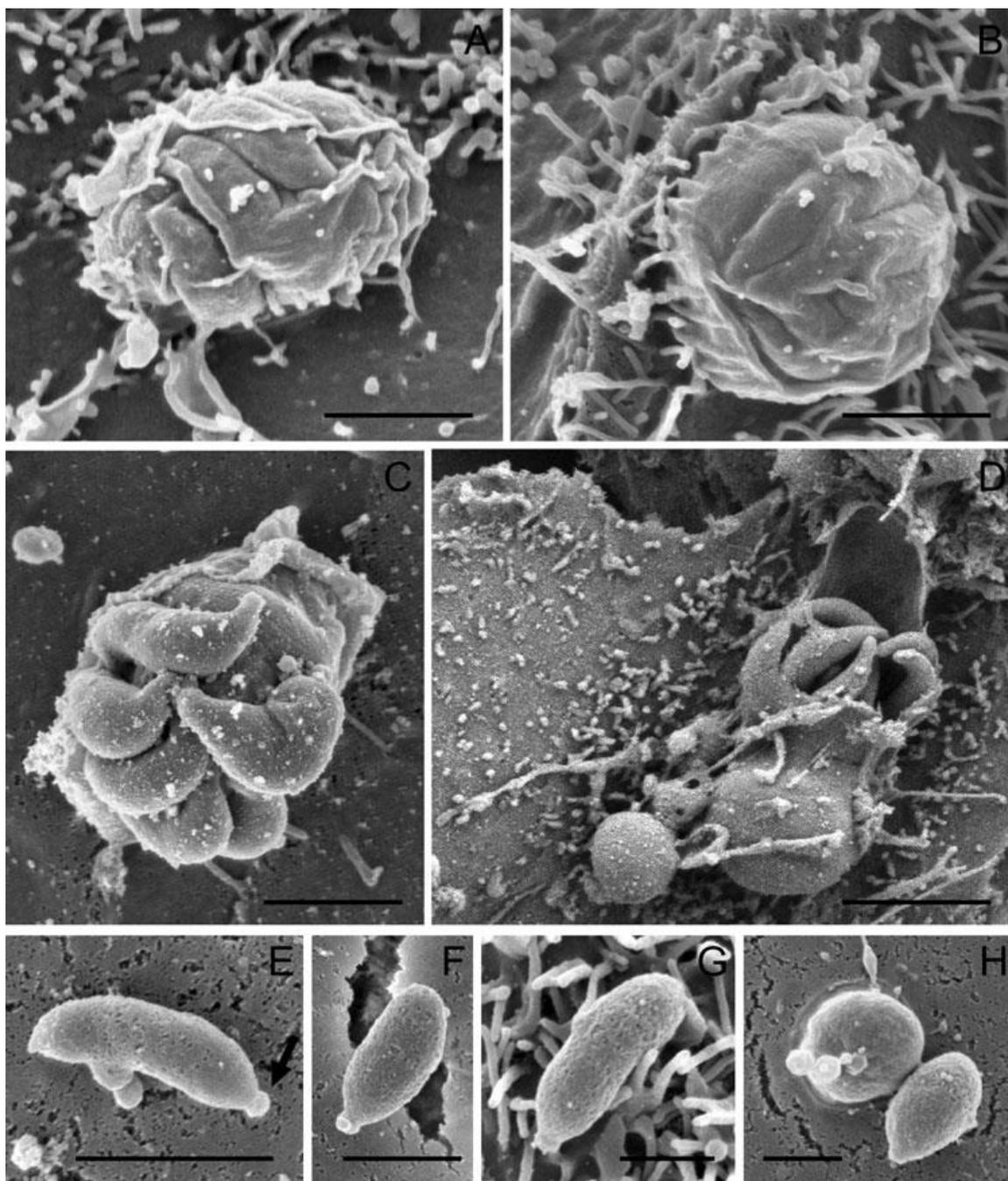
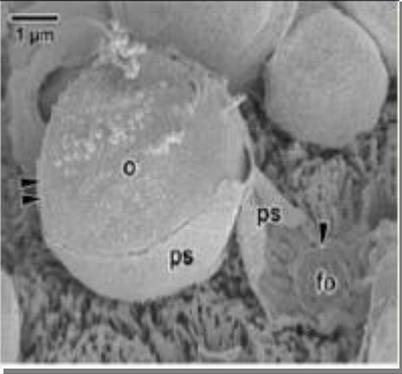
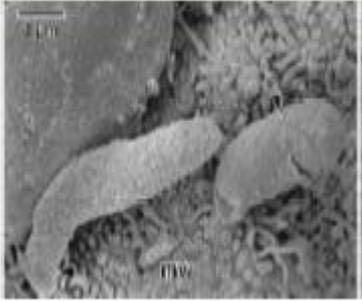
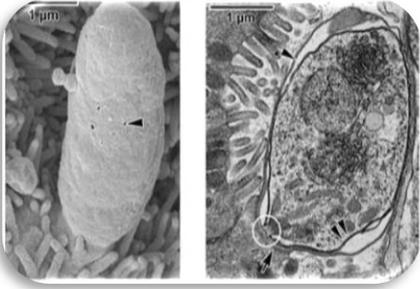
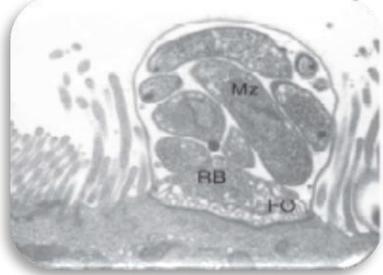
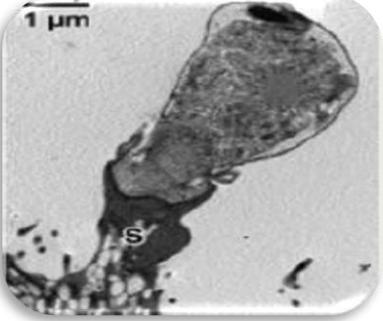
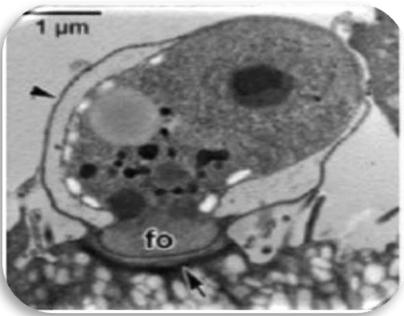


Figure 2.4 : A , B : Meronte I et mérozoïtes I. C,D : Développement de meronte I avec mérozoïtes internes de type I. (C,D) ; (E,F,G) : mérontes I matures au stade de mérozoïte I excystation. H :Mérozoïtes libres de type I présentant des régions apicales bien définies (flèche) à 6 h de culture. (H) Mérozoïte de type I envahissant les cellules hôtes 6 h après l'inoculation [109].

La morphologie des différents stades du cycle de vie de *Cryptosporidium* est décrite dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Les différents stades évolutifs de *Cryptosporidium* sp [110] ;[111] ; [112].

Forme évolutive	Morphologie	Description
Oocyste	 <p>o: oocyste ps: vacuole parasitophore fo: organelle nourricier</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Forme sphérique a ovoïde.</li> <li>2. La taille de l'oocyste varie entre 3 et 8 µm de diamètre, selon l'espèce.</li> <li>3. Chaque oocyste contient quatre sporozoïtes nus sans sporocystes, et présente un corps résiduel granuleux central très réfringent.</li> <li>4. sa paroi est composée de deux couches, interne et externe, bien distinctes.</li> <li>5. À l'un de ses pôles, se situe une fente qui s'étend sur 1/3 à 1/2 de leur circonférence par laquelle sont libérés les sporozoïtes</li> </ol>
Sporozoïte et mérozoïte	 <p>mv : microvillosités</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ils sont élancés, virguliformes.</li> <li>2. Formes libres et mobiles.</li> <li>3. Présence d'un complexe apical.</li> <li>4. Les rhoptries, les micronèmes, les granules denses, le noyau, les ribosomes, les microtubules ainsi que les anneaux apicaux sont visibles par MET.</li> </ol>

Trophozoïte		Trophozoïte mature et son organelle d'attachement ou nourricier.
Méronte	 <p>Mz: mérozoïte Rb: corps résiduel FO: organelle nourricier</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1-Méronte de type I contenant six à huit mérozoïtes.</li> <li>2. La membrane cellulaire de la cellule hôte entourant le méronte se lyse et les mérozoïtes deviennent extracellulaires, capables d'infecter d'autres cellules hôtes pour produire de nouveaux mérontes type I ou peuvent évoluer vers des mérontes type II à 4 mérozoïtes</li> </ol>
Microgamonte		Il a une forme en tige avec une extrémité antérieure aplatie.
Macrogamonte	 <p>fo: organelle nourricier</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1-Forme sphérique à ovoïde. Il présente en position centrale un grand noyau à nucléole proéminent.</li> <li>2. Les microgamètes fécondent le macrogamète pour produire un zygote qui évolue en oocyste.</li> </ol>

Zygote		Un macrogamète fécondé, ou zygote, mur mais toujours connecte via l'organelle nourricier à la cellule hôte.
--------	---	---

### -Particularités du cycle de *Cryptosporidium*

L'existence d'une auto-infestation à partir du recyclage des mérontes de type I et des oocystes à paroi fine serait à l'origine du caractère chronique de la maladie chez certains individus sans que ceux-ci ne soient en contact avec des oocystes d'origine exogène [55];[92];[108].

Le cycle du parasite est court et permet une surinfection de l'hôte de même qu'une libération massive d'oocystes à paroi épaisse dans le milieu extérieur à l'origine d'une infection rapide de nouveaux hôtes.

### -Position dans la cellule-hôte

Le genre *Cryptosporidium* occupe une place tout à fait unique dans la cellule puisque le parasite est en position intracellulaire mais extra-cytoplasmique.

Lors du contact du parasite avec la cellule-hôte, des enzymes (notamment des rhoptries et des micronèmes) sont libérées entraînant l'englobement du parasite par des microvillosités de la membrane apicale de l'hôte et ainsi la formation de la membrane de la vacuole parasitophore.

Cependant *Cryptosporidium* n'est qu'en partie entouré de cette membrane et prélève une majorité de ses nutriments grâce à l'organe de nutrition. Celui-ci a une origine double puisqu'il dérive à la fois du parasite et de l'hôte.

L'organe de nutrition est situé à la base de chaque vacuole parasitophore, sa membrane basale est plissée permettant une augmentation de sa surface et donc des échanges entre la cellule-hôte et le parasite.

La localisation très protégée de *Cryptosporidium* au sein de la cellule-hôte peut expliquer les échecs de traitement contre le parasite. L'organe de nutrition pourrait notamment bloquer l'entrée de molécules dans le parasite protégeant celui-ci de l'action de molécules à activité intracellulaire [52].

### -Structure

L'oocyste est de forme variable, ovoïde à elliptique, et mesure entre 4,5 et 7,9  $\mu\text{m}$  de long pour 4,2 à 6,5  $\mu\text{m}$  de large [55]

La paroi de l'oocyste est constituée de 4 couches (figure 2.5) :

- o La couche externe, le glycocalyx, est principalement composée de sucres. Cette structure apparaît dense aux électrons en microscopie électronique. Elle confère les caractères d'immunogénicité ainsi que d'attachement du parasite à la cellule-hôte. Les préparations pour l'étude microscopique des oocystes peuvent provoquer des altérations du glycocalyx ;
- o La deuxième couche, majoritairement composée de lipides complexes, laisse passer les électrons en microscopie électronique. Elle serait à l'origine de la faiblesse de la paroi de l'oocyste ;
- o La troisième couche est une fine couche apparaissant dense aux électrons. Elle abrite les principales protéines structurales de la paroi de l'oocyste, à l'origine de sa force et de sa flexibilité ;
- o La couche interne est composée d'hydrates de carbone et de polysaccharides de structure [113].

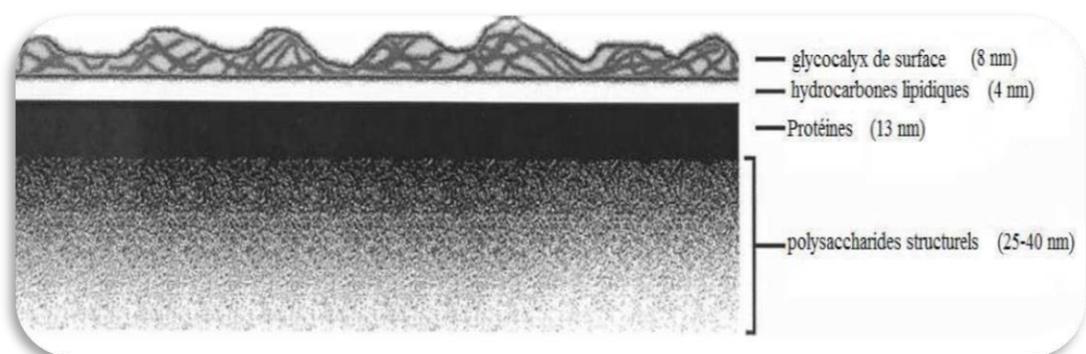


Figure 2.5 : Modèle de la structure en 4 couches de la paroi d'un oocyste de *C. parvum*. [113]

### -Période prépatente et période patente

-La période prépatente est le temps le plus court pour que les oocystes ingérés soient infectieux. Le cycle de vie endogène est achevé, les premiers oocystes nouvellement formés sont excrétés. Ce temps varie suivant l'hôte (âge et statut immunitaire) et les espèces de *Cryptosporidium* ainsi que selon la dose infectieuse. Les études expérimentales ont permis de déterminer la durée de cette période, qui peut aller de 2 à 7 jours pour *C. parvum* chez le veau [90], 4 à 22 jours chez l'homme [114], 10 à 12 jours pour *C. bovis* chez les bovins [76], 6 à 21 jours pour *C. muris* chez la souris [115], 5 à 6 jours pour *C. felis* chez le chat [116] et de 4 à 24 jours pour *C. baileyi* chez le poulet [117].

-La période patente est la durée de l'infection, qui se caractérise généralement par le nombre de jours d'excrétion d'oocystes. Expérimentalement, elle varie de 1 à 12 jours pour *C. parvum* chez les veaux, de 1 à 20 jours chez l'homme, 18 jours pour *C. bovis* chez les bovins, 7 à 10 jours pour *C. felis* chez le chat, et jusqu'à 18 jours pour *C. baileyi* chez le poulet. Les variations de cette période dépendent de l'âge et le statut immunitaire.

### 2.1.5. Transmission du *Cryptosporidium*

Les oocystes de *Cryptosporidium* sont transmis entre hôtes par voie fécale-orale, soit directement par contact avec les excréments des animaux infectés, soit indirectement par contamination environnementale ou par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés.

#### 2.1.5.1. Excrétion des oocystes chez les veaux

Les hôtes infectés peuvent excréter un grand nombre d'oocystes par jour, ces derniers sont immédiatement infectieux pour d'autres hôtes sensibles [118] ;[119] ce qui signifie que l'infection peut passer très rapidement entre les animaux qui sont en contact étroit les uns avec les autres.

Les veaux infectés commenceront à perdre leurs oocystes infectieux 4 à 9 jours après l'infection initiale (selon la dose infectieuse) et peuvent se débarrasser

chaque jour d'un grand nombre d'oocystes. [103], le nombre d'oocystes perdus dans les fèces dépend de la dose infectieuse initiale [118] [120]

L'excrétion des oocystes dure normalement 6 à 14 jours [118] [119]. Par ailleurs, l'excrétion élevée d'oocystes est généralement observée chez les veaux de moins d'un (01) mois [120]. Les animaux infectés avec une dose plus élevée perdront plus d'oocystes pendant toute la durée de l'excrétion.[119]

#### 2.1.5.2. Résistance des oocystes de *Cryptosporidium sp* dans l'environnement

Les oocystes possèdent des propriétés biologiques leur conférant une grande résistance dans le milieu extérieur. En effet, il a été montré qu'ils pouvaient survivre plus de 6 mois dans des conditions favorables d'humidité et de chaleur [98] ;[119]

Des variations de température naturelles et de nombreux désinfectants classiques (crésyl, dérivés iodés, hypochlorite, dérivés de benzylkonium) n'inhibent pas leur pouvoir infectant [121] .Seuls l'ammoniac à 5%, le formaldéhyde à 10% ainsi que les températures inférieures à moins 20°C et supérieures à 60°C peuvent les détruire.[122]

Le chlore utilisé en routine, pour le traitement des eaux, n'altérant pas (ou très peu) la viabilité des oocystes, le risque de contamination peut être présent dans les eaux traitées par chloration [52]

Des études ont montré que la terre et la végétation avaient un effet protecteur sur la viabilité des oocystes en atténuant l'effet des agents physico-chimiques à travers l'enfouissement des oocystes dans le sol [123] ;[124] .

Ceux-ci peuvent persister plus longtemps dans le sol que dans l'eau. Le sol sur lequel s'accumulent les matières fécales animales contenant des oocystes de *Cryptosporidium sp* constitue un réservoir durable d'oocystes infectants. Ces derniers peuvent contaminer les eaux de surface à la faveur des pluies.

Il a été montré que les matières fécales « protégeaient » les oocystes de la dessiccation en augmentant l'imperméabilité de leur paroi, les rendant ainsi moins sensibles aux facteurs létiaux de l'environnement [102] ;[122] . Au vu de ces données, une bonne pratique du compostage du fumier contribuerait à diminuer la

viabilité des oocystes et le risque de contamination environnementale lors d'épandage.

#### 2.1.6. Pouvoir pathogène du parasite

L'homme et les animaux s'infectent en ingérant des oocystes de *Cryptosporidium* sp qui, pour la plupart, vont atteindre l'intestin et libérer leurs sporozoïtes. Les sporozoïtes vont aller envahir les cellules épithéliales intestinales du tube digestif (pour les espèces de *Cryptosporidium* à tropisme digestif).

Le parasite se localise préférentiellement dans les cellules épithéliales intestinales de l'iléon et du jéjunum mais quelques espèces de *Cryptosporidium* à tropisme intestinal ont été retrouvées dans le caecum, le côlon et occasionnellement dans l'estomac et le duodénum [125]. L'extension de ces espèces au niveau de l'appareil respiratoire, vésicule biliaire, canaux pancréatiques ne s'observe que chez l'hôte immunodéprimé [126] ;[127] ;[128].

L'espèce la plus étudiée est *C. parvum* qui parasite la bordure en brosse des entérocytes. Bien que ce parasite ait une position particulière, sa multiplication au sein des cellules peut produire des anomalies significatives dans les fonctions d'absorption et de sécrétion de l'intestin (notamment en détruisant les microvillosités de l'iléon) [43] ;[129].

Des études utilisant des modèles animaux ont décrit certaines modifications histologiques de l'épithélium intestinal induites par *Cryptosporidium* telles que l'atrophie des villosités, l'allongement des cryptes dans l'intestin et la fusion des villosités [43]. Il en résulte une diarrhée par maldigestion et malabsorption.

Plus récemment des études réalisées sur des souris ont mis en évidence la capacité de *C. parvum* à induire des dysplasies intestinales [130] ;[131].

#### 2.1.7. Résistance dans l'eau

Les oocystes peuvent rester viables et infectieux pendant plusieurs mois dans l'eau à des températures comprises entre 0 et 30°C [98] ; [102] et jusqu'à un an dans de l'eau de mer [132]. Ainsi pour des températures de 0, 5, 10, 15 et 20°C,

les oocystes demeurent infectieux pendant 6 mois, pendant 3 mois pour des températures de 25 et 30°C et à 1 semaine pour une température de 35°C [52].

À des températures inférieures à 15°C, le niveau d'infectiosité des oocystes peut être maintenu sur une période de 24 semaines au moins et parfois sur plus d'une année. Les oocystes sont très sensibles à une exposition à de hautes températures sur un temps court : des oocystes maintenus à 64,2°C pendant 5 minutes perdent leur infectiosité vis-à-vis de souris tandis qu'une exposition à 60°C pendant 45 secondes ou à 75°C pendant 20 secondes induit une perte d'infectiosité des oocystes sur des cultures cellulaires HCT-8.

L'exposition à des températures très basses ou la congélation conduit à une inactivation partielle des oocystes : 67% des oocystes sont inactivés après 21 heures passées à -22°C, à -10°C pendant 7 jours ils demeurent viables [133]

La viabilité des oocystes est plus importante pour des salinités et des temps d'exposition faibles, même dans des conditions extrêmes (salinité de 35‰ à 18°C pendant 40 jours) les oocystes peuvent demeurer infectieux. Le maintien des oocystes dans des conditions particulières de température et de salinité a fourni des résultats similaires : à 10°C pendant 12 semaines avec des salinités de 10, 20 et 30‰, à 20°C avec une salinité de 10‰ pendant 12 semaines, de 20‰ pendant 4 semaines et de 30‰ pendant 2 semaines, les oocystes de *C.parvum* restaient viables et infectieux pour des souris [52].

D'autres paramètres peuvent avoir une influence sur la résistance des oocystes de *C. parvum* dans l'eau. La quantité de bactéries hétérotrophes, c'est-à-dire les bactéries tirant leur source de carbone de la matière organique, influence la survie des oocystes qui apparaît meilleure dans les eaux filtrées que dans les non filtrées [52].

#### 2.1.8. Résistance hors de l'eau

La résistance des oocystes dans le sol et les matières fécales dépend de nombreux facteurs. Le type de sol influence la survie des oocystes, avec une préférence pour les terres grasses limoneuses par rapport aux terres grasses argileuses ou sablonneuses [113]. Les différences observées entre ces trois types de sols s'expliqueraient par leurs pH spécifiques.

Les oocystes sont très sensibles à la dessiccation : selon des études différentes seuls 3% restaient viables après 2h et seulement 5% après 4h à température ambiante [133]

#### 2.1.9. Résistance aux procédés de désinfection

Les oocystes de *C.parvum* sont résistants aux désinfectants utilisés couramment (composés alcalins ou contenant des aldéhydes, ammoniacaux, du chlore ou de l'alcool) [55]. L'utilisation du chlore à des concentrations usuelles pour le traitement des équipements d'eau et des piscines n'a que peu d'impact sur la viabilité des oocystes [52] ;[113] . De la même manière, l'aluminium utilisé pour la floculation dans le traitement primaire de l'eau ne permet pas de réduire la viabilité des oocystes [52].

#### 2.1.10. Transport mécanique dans le sol et par les hôtes

La contamination du sol et des eaux de surface par les oocystes de *C.parvum* peut aboutir à une contamination des eaux de boisson [134]

D'autre part, des études ont mis en évidence le rôle de certains oiseaux migrateurs dans la dissémination des oocystes qui sont capables d'ingérer les oocystes et de les excréter tels quels, viables et infectieux, dans leurs fèces pendant une semaine [134]

D'autres espèces animales, telles que les cafards (*Periplaneta americana*), les scarabées, les mouches et les rotifères, jouent ce rôle soit par le biais de leurs fèces soit par portage des oocystes sur leurs surfaces externes [134].

#### 2.1.11. La cryptosporidiose bovine

##### 2.1.11.1. Les bovins adultes

La diarrhée causée chez ces animaux est également associée à d'autres infections virales et bactériennes et ne pouvait pas être seulement attribué à

*Cryptosporidium*. Pohlenz et al [135] expliquent que l'infection par *C. parvum* chez les bovins a tendance à être localisée dans l'intestin grêle au niveau de la jonction iléo-cécale, mais le parasite a également été trouvé dans le cæcum, le côlon et le duodénum donc les différentes espèces de *Cryptosporidium* se trouvent à différents endroits. Selon Lindsay et al [78] *C. andersoni* est plus fréquemment identifié chez les bovins adultes que chez les animaux plus jeunes qui se localise dans la caillette. Les signes cliniques associés à *C. andersoni* se manifestent par une diminution de poids et de la production laitière chez les vaches adultes [136].

Les bovins à différents groupes d'âge sont généralement infectés par des différentes espèces de *Cryptosporidium* (figure 2.6). Alors que les espèces infectant les veaux plus âgés (*C. bovis* et *C. ryanae*) n'ont été associées à aucune maladie clinique. [11];[76];[137]. Une autre espèce a été identifiée chez les bovins suite à des infections naturelles c'est le cas de *C. felis* [138], ce type de portage reste tout de même sporadique et peu fréquent.

De plus, il a été signalé que l'excrétion fécale de *Cryptosporidium sp* chez la vache porteuse asymptomatiquement est plus importante lors du stress associé au vêlage, augmentant davantage l'exposition du nouveau-né [9] ;[103]

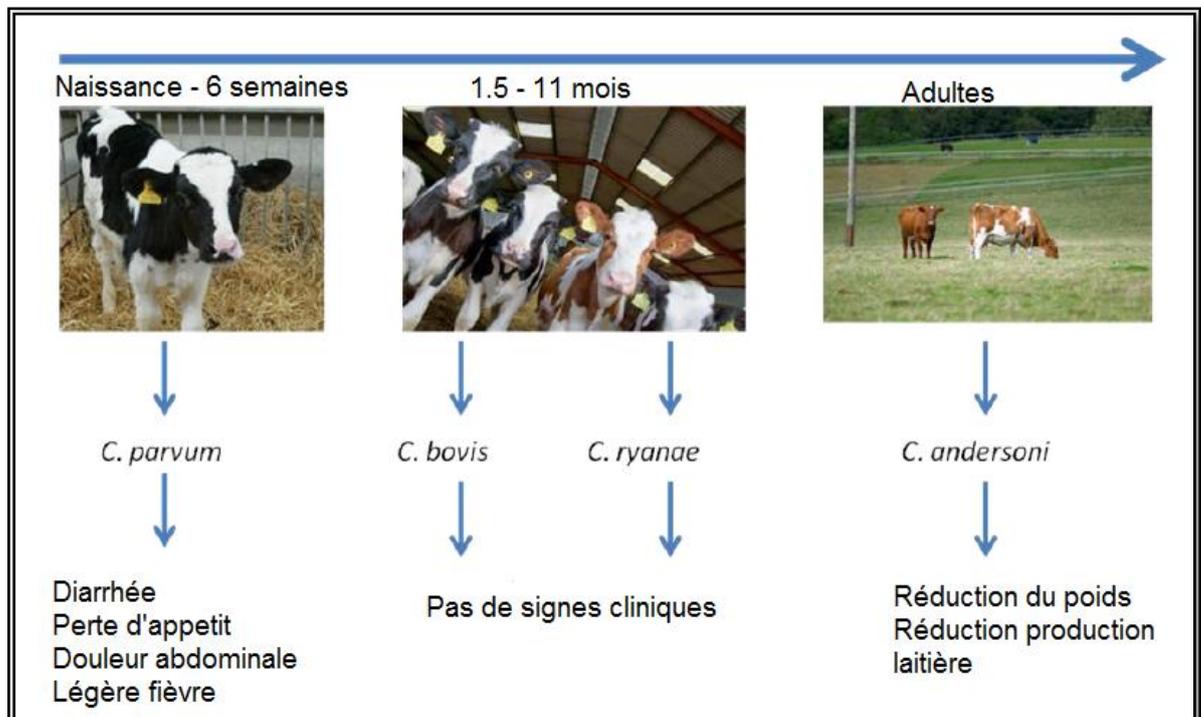


Figure 2.6 : Les espèces de *Cryptosporidium* trouvées chez les bovins.[89]

### -Diarrhée et douleur abdominale

La diarrhée persiste 5 à 12 jours, avec une moyenne de 7 jours [9] ;[139]. Un dos arrondi en raison de la douleur abdominale fait souvent partie des signes cliniques [140] .La sévérité et la durée varient considérablement d'un individu à l'autre.[141]. Certains auteurs ont montré une corrélation significative entre la présence de diarrhée et l'excrétion de *Cryptosporidium* [105] ;[140] ;[142].

En général, la présence de sang et les fèces liquides sont plutôt associées à une coexistence entre *C. parvum* et d'autres agents entéropathogènes (infection mixte avec *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Salmonella*, ou autres).[140] ;[143]

### -Déshydratation et perte d'électrolytes

La déshydratation et la perte d'électrolytes sont les conséquences directes de la perte importante d'eau par malabsorption intestinale lors de diarrhée.

Des déséquilibres électrolytiques (Na, Cl, K, Ca et P) ainsi que des variations du pH sanguin sont à prévoir lors de diarrhées importantes s'étalant sur plusieurs jours [9].

### - Amaigrissement

Les maladies entériques causant de l'amaigrissement sont habituellement celles qui causent une diarrhée modérée sur une longue période (chronique) plutôt qu'une diarrhée aiguë pendant une courte période de temps comme c'est le cas en général lors de cryptosporidiose simple[9] ;[140] . Cependant, la maladie ouvre la porte à d'autres agents pathogènes opportunistes permettant de prolonger et d'augmenter la sévérité de la diarrhée en plus d'occasionner un amaigrissement important [9] ;[140].

#### 2.1.11.2. Signes cliniques chez le veau

Le genre *Cryptosporidium* est une des causes majeures de diarrhée néonatale chez le veau non sevré. Il est également très souvent isolé chez les bovins de tout

âge sans signes cliniques apparents, à l'occasion de portage asymptomatique. O'Handley RM et Olson ME [128] montrent que *C. parvum* est responsable de diarrhée chez les veaux âgés de moins d'un mois. Les signes cliniques apparaissent 3 à 5 jours après l'infection et peuvent durer 4 à 18 jours selon la sévérité de l'infection.

La contamination peut avoir lieu dès la première semaine de vie de l'animal, et peut parfois se déclarer dans les 48 à 72 heures suivant la naissance.

Cette cryptosporidiose précoce résulte d'une contamination ayant eu lieu dans les premières heures de vie de l'animal. [10] ;[144].

Généralement, la diarrhée à *Cryptosporidium sp* apparaît le plus souvent entre 5 et 10 jours d'âge, lors de forte pression parasitaire.

Chez le veau non sevré, la cryptosporidiose clinique à *C.parvum* se caractérise par une diarrhée de couleur jaune pâle à verdâtre, profuse et aqueuse, pouvant contenir du mucus mais rarement de sang.

La diarrhée peut s'accompagner de léthargie, d'anorexie, de douleurs abdominales et d'une déshydratation dans les cas les plus sévères. L'infection est létale dans de très rares cas. La sévérité de la malnutrition et de la déshydratation peut occasionner des retards de croissance postérieurement à l'infection.[10] [144].

La mort des jeunes veaux causée par *Cryptosporidium* est généralement attribuée à une déshydratation due à une diarrhée sévère [139].La morbidité chez les jeunes était près de 100 % lorsque les nouveau-nés infectés sont séparés trop rapidement de leur mère (moins de 48 heures après la naissance), une diarrhée aqueuse avec mortalité rapide (quelques jours) survient vers l'âge d'une à deux semaines en raison d'un manque de transfert de l'immunité passive de la mère au veau [9].

L'apparition de la diarrhée survient généralement environ 3 à 4 jours après l'ingestion d'oocystes infectieux et dure environ 1 à 2 semaines. L'excrétion d'oocystes se produit entre 4 et 12 jours après l'infection, bien que cela puisse varier selon la dose d'attaque initiale [119] et l'excrétion d'oocystes n'est pas toujours associée à la diarrhée. Les veaux infectés peuvent excréter un grand nombre (plus de  $1 \times 10^{10}$ ) d'oocystes chaque jour [80] qui sont immédiatement infectieux aux autres hôtes sensibles. [118]

### 2.1.12. Pathogénie et lésions

La cryptosporidiose clinique chez le veau non sevré se manifeste par un syndrome diarrhéique plus ou moins sévère. Ce phénomène diarrhéique est occasionné par un syndrome de malabsorption et une augmentation des sécrétions intestinales.

Chez les ruminants, *C. parvum* affecte principalement la partie distale du jéjunum et l'iléon, cependant des lésions ont été retrouvées dans le cæcum, le côlon et, plus rarement le duodénum [137] ;[94] ;[128]

Les cryptosporidies se développent dans la bordure en brosse des entérocytes et sont à l'origine d'une atrophie villositaire et d'une réduction de la surface d'absorption de la muqueuse intestinale suite à une destruction et à la fusion de microvillosités.[43 ;[144]

Ces lésions entraînent une augmentation de la perméabilité membranaire diminuant ainsi l'absorption des nutriments, et une modification des flux d'ions sous l'action de prostaglandines locales.

Ces phénomènes sont à l'origine d'une malabsorption et d'une diarrhée sécrétoire. [128] ;[144] . Certains éléments tels que le stress environnemental, une pathologie intercurrente, la dose d'oocystes ingérée et la qualité du colostrum de la mère peuvent aggraver l'infection chez le jeune veau. [92]

L'invasion de la muqueuse entraîne une atrophie modérée à sévère des villosités associée à une réduction de la surface totale de la muqueuse intestinale. Celle-ci est due à une destruction d'entérocytes matures, à l'atrophie des microvillosités et à une augmentation de la perméabilité intestinale [43]

L'augmentation de la perméabilité intestinale (suite à l'augmentation des taux d'interféron gamma), la perturbation du transport des nutriments (suite à la détérioration des villosités) et la baisse des activités enzymatiques (inhibition de l'absorption du sodium, augmentation des sécrétions de Cl<sup>-</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sous l'action de prostaglandines locales) sont responsables de la diarrhée et des pertes hydriques [43] ;[95].

La cytotoxicité directe du parasite intervient peu dans son pouvoir pathogène ; 15 à 20% seulement des cellules infectées rentrent en apoptose. Des études ont montré que dans les stades précoces de l'infection le parasite rend les cellules-hôtes réfractaires à l'apoptose lui permettant ainsi de réaliser son cycle et de se propager. Pendant les stades plus tardifs, la tendance s'inverse, les gènes anti-apoptotiques sont sous-exprimés tandis que les pro-apoptotiques sont sur-exprimés [43].

La présence d'autres agents pathogènes agissant en synergie avec *Cryptosporidium parvum* peut amplifier ou prolonger l'infection [55]

A l'échelle macroscopique, les lésions observées ne sont pas pathognomoniques de cryptosporidiose [92]

À l'examen nécrosique, on peut observer une distension du caecum et du colon, et un contenu digestif jaune et aqueux. L'iléon peut présenter une congestion et une inflammation dans son dernier tiers. Les Nœuds lymphatiques locaux sont généralement hypertrophiés.

À l'échelle microscopique, la partie terminale de l'iléon présente une atrophie plus ou moins sévère des villosités, une hyperplasie des cryptes et des plages de nécroses focales [55]. Une infiltration de la muqueuse intestinale par diverses cellules inflammatoires est observable. Le parasite est généralement visible dans la bordure en brosse.

#### 2.1.13. Le statut immunitaire

Le statut immunitaire du veau joue un rôle important dans la contamination et l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium sp.*

Un colostrum de bonne qualité contient des anticorps anti-*Cryptosporidium* en de faibles quantités, il n'est pas suffisant à lui seul pour protéger le veau d'une contamination par des oocystes présents dans l'environnement.

Cependant le colostrum va amener une immunité intestinale locale qui protégera le veau des autres agents diarrhéiques. [43]

Cette protection vis-à-vis des autres agents va réduire le risque de diarrhée néonatale et d'affections concomitantes et limiter l'excrétion d'oocystes de

*Cryptosporidium sp.* Le statut immunitaire du veau nouveau-né est affecté par les carences liées à la gestation. Des carences en vitamines et sélénium prédisposent à une immunité affaiblie pouvant occasionner une infection à *Cryptosporidium sp* et une excrétion d'oocystes massive. [92]

#### 2.2.14. Réponse immunitaire à l'infection à *Cryptosporidium*

-La réponse immunitaire innée constitue un ensemble de mécanismes (barrières physiques, phagocytose, réaction inflammatoire) mis en place immédiatement lors de l'infection, elle est non spécifique de l'agent pathogène rencontré.

Chez les souris, l'acquisition d'une flore intestinale mature serait associée à une résistance au parasite. Elle stimulerait des mécanismes non spécifiques tels qu'une possible production d'interféron gamma indépendamment de la voie des lymphocytes T. [55]

Chez le veau, la flore intestinale présente après la naissance entre en compétition avec les sporozoïtes dans l'attachement aux cellules épithéliales intestinales. De plus, chez les bovins infectés par *Cryptosporidium parvum*, des quantités importantes de défensine  $\beta$  entérique, un peptide antimicrobien, ont été mises en évidence. Cependant ces mécanismes s'avèrent insuffisants pour neutraliser l'infection.[43]

La réponse immunitaire innée fournira une défense immédiate contre le parasite qui envahit les cellules épithéliales en empêchant leur fixation. Il a été démontré que la mucine interfère avec la capacité du sporozoïte à se fixer à la paroi cellulaire [145] ;[146] et d'autres cellules immunitaires comme les cellules tueuses naturelles (NK) sécrètent des cytokines qui peuvent avoir un effet direct sur le parasite ou signaler une autre réponse immunitaire. Après l'invasion des cellules épithéliales de l'hôte, des cytokines sont produites qui signalent les cellules NK en action. Lorsqu'elles sont stimulées par  $TNF\alpha$  et IL-12, les cellules NK produisent IFN- $\gamma$  (et d'autres cytokines mais principalement IFN- $\gamma$ ), les cellules NK produisent également  $TNF\beta$ , qui peut endommager directement les cellules cibles et provoquer une lyse cellulaire.  $TNF\alpha$  active l'APC (antigène présentant des

cellules) telles que les cellules dendritiques et les macrophages que l'on trouve dans les villosités de la muqueuse intestinale.

L'activation de ces derniers entraîne la sécrétion d'autres cytokines et l'interaction avec les cellules T CD4+, ces cellules se différencient en cellules Th1 ou Th2. Les cellules Th1 produisent l'IL-12, l'IFN- $\gamma$  et le TNF $\beta$  qui améliorent la réponse cytotoxique, les cellules Th2 produisent d'autres interleukines qui stimulent la différenciation des cellules B en anticorps. (figure 2.7).

-La réponse immunitaire acquise, spécifique de l'agent pathogène, est plus tardive mais durable dans le temps. Elle est également à l'origine de la mémoire immunitaire. Elle comprend la réponse humorale et la réponse cellulaire.

-La réponse humorale fait intervenir les anticorps, ou immunoglobulines, produits par les lymphocytes B. Des anticorps spécifiques IgA, IgM et IgG ont été détectés dans le sérum de veaux, agneaux, souris et poulets infectés par le parasite [55]

La présence d'anticorps circulants a été décrite chez des veaux n'excrétant plus d'oocystes de *C.parvum*. Ces anticorps sont capables de se lier à des antigènes de taille très variable, par exemple l'antigène p23 présent sur les sporozoïtes, et sont excrétés dans la lumière intestinale. Ces antigènes présentent un intérêt majeur en thérapeutique : ils induisent la production d'anticorps neutralisants fournissant ainsi une possible protection contre la maladie [43]

Ces anticorps excrétés dans la lumière de l'intestin peuvent se retrouver dans les fèces des veaux, une partie semble provenir du transfert passif d'anticorps depuis le colostrum. Une étude a montré que les différentes classes d'anticorps ne sont pas excrétées dans les fèces au même moment après l'infection : les IgG1 sont détectées à partir du 5<sup>ème</sup> jour après l'infection tandis qu'il faut attendre le 7<sup>ème</sup> jour pour voir apparaître les IgG2 [43]. Selon O'Donoghue, [55] l'augmentation des taux d'anticorps fécaux serait corrélée à la diminution du nombre d'oocystes excrétés chez les veaux et les agneaux infectés. Ces informations suggèrent que les anticorps sont capables de neutraliser les formes libres du parasite cependant ils seraient inefficaces sur les stades intracellulaires et leur courte durée de vie limiterait leur efficacité [55]

-La réponse cellulaire met en jeu les lymphocytes T, cytotoxiques et auxiliaires, et les cellules NK.

Des études ont montré que la réponse immunitaire acquise se met en place dans l'intestin avant même le début des signes cliniques. Des lymphocytes T CD4+ et CD8+ ainsi que des cytokines (IL-10) ont été observés dans les villosités, la lamina propria et les plaques de Peyer de l'iléon peu après l'infection. Cependant, à 3 jours post-inoculation, la présence de l'IL-10 et l'absence de l'interféron gamma provoquent une inhibition de la réponse Th1 et donc un développement de l'infection et de la diarrhée [43].

La guérison de l'animal est associée à la production d'anticorps et à une réponse Th1 (par la production d'interféron gamma) dans la muqueuse intestinale [43]. Selon certaines études, les lymphocytes CD4+ auraient un rôle dans la durée de l'infection tandis que l'interféron gamma limiterait la sévérité de celle-ci [55]. Chez les veaux guéris, le nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ retrouvés dans l'iléon est encore élevé par rapport à des veaux nouveau-nés [43].

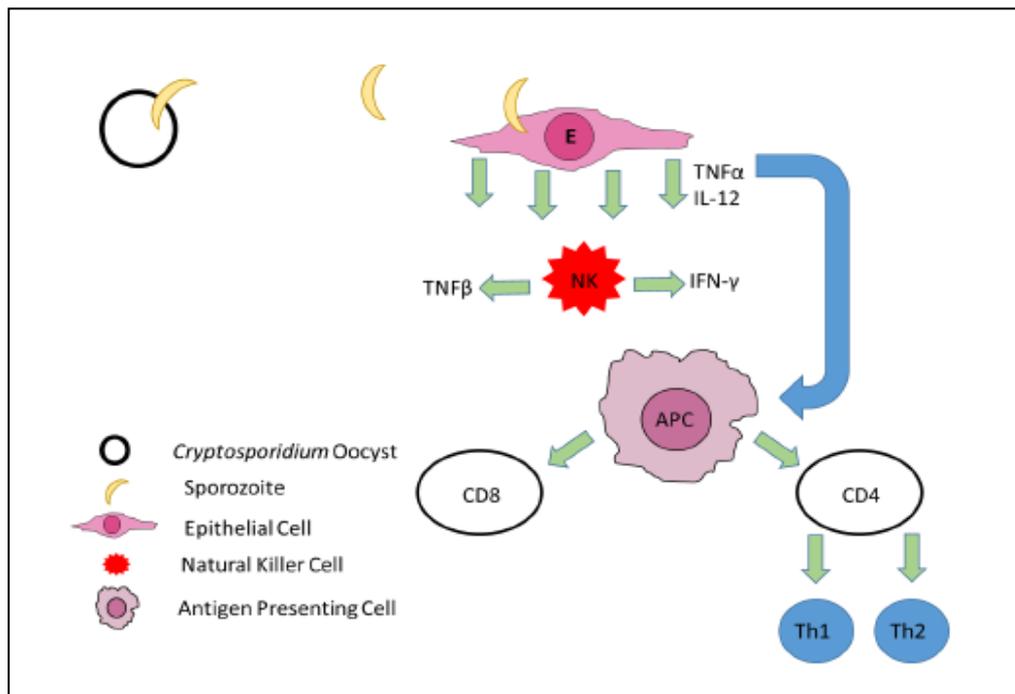


Figure 2.7 : Diagramme simplifié montrant les étapes et interactions les plus importantes dans la réponse immunitaire acquise contre l'infection à *Cryptosporidium* [147]

Une grande partie des connaissances sur les réponses immunitaires à *Cryptosporidium* a été acquise grâce à des essais d'infection sur des modèles murins. Certaines études portent sur la réponse immunitaire à *Cryptosporidium* chez les humains, mais très peu chez les animaux d'élevage.

Des infections expérimentales chez la souris ont montré que les cytokines Th1, les lymphocytes T CD4+ et l'IFN- $\gamma$  sont essentiels à l'élimination des infections à *Cryptosporidium* [148]. Les souris dépourvues de lymphocytes T CD4+ deviennent gravement malades si elles sont infectées par rapport aux souris " normales ", on suppose qu'il en va de même pour les humains, car on sait que les patients atteints du sida dont le nombre de lymphocytes T CD4+ est faible souffrent de maladies plus graves qui peuvent être mortelles

Les cytokines qui jouent un rôle clé dans l'immunité innée et l'immunité adaptative comprennent l'IFN- $\gamma$ . Chez la souris, il a été établi que l'IFN- $\gamma$  joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection à *Cryptosporidium*, non seulement dans l'immunité à médiation cellulaire mais aussi dans les premières réponses immunitaires innées [149].

#### 2.2.15. Critères de sensibilité du veau non sevré

La sensibilité du veau non sevré aux cryptosporidies est influencée par le type d'atelier. Naciri et al [140] ont montré que la pression d'infection est plus importante chez les veaux allaitants que chez les veaux laitiers. Cette observation a été appuyée par d'autres études qui ont constaté un taux de létalité plus important chez les veaux issus d'atelier allaitant, ce taux pouvant grimper jusqu'à 30% lors d'épizootie dans une exploitation. [33] ; [128].

La différence de prévalence observable chez les veaux issus d'ateliers allaitants et laitiers s'explique de plusieurs manières.

En élevage allaitant, les veaux sont élevés au contact de leur mère, ils peuvent se contaminer dès la première tétée par une mamelle souillée, le colostrum n'apportant pas de protection suffisante vis-à-vis des cryptosporidies.

La concentration des vèlages propre au système allaitant augmente également la pression parasitaire. La contamination de l'environnement augmente au fur et à mesure des vèlages. Les veaux nouveau-nés sont directement au contact d'un environnement fortement contaminé, notamment en fin de période de mise bas, et grandissent au milieu d'autres veaux excréteurs. [128] ; [144]

De plus les mères sont souvent carencées en fin de saison de vèlage et donnent naissance à des veaux affaiblis et carencés, plus sensibles aux infections néonatales.

Les taux élevés de mortalité observés chez les veaux allaitants sont en partie dus à des carences en sélénium. [33] ; [128].

Par ailleurs, en élevage laitier, les vèlages sont étalés sur l'année et les veaux ne sont pas élevés sous la mère, ce qui tend à diminuer la pression parasitaire [150].

L'utilisation de cases collectives et le mélange des classes d'âge favorisent la contamination des jeunes veaux. [151] ; [152].

#### 2.2.16. Immunité et colostrum

Le statut immunitaire du veau joue également un rôle important dans la contamination et l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium sp.*

Un colostrum de bonne qualité contient des anticorps anti-*Cryptosporidium* en de faibles quantités, il n'est pas suffisant à lui seul pour protéger le veau d'une contamination par des oocystes présents dans l'environnement.

Cependant le colostrum va amener une immunité intestinale locale qui protégera le veau des autres agents diarrhéiques. [43]

Cette protection vis-à-vis des autres agents va réduire le risque de diarrhée néonatale et d'affections concomitantes et ainsi limiter l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium sp.* Le statut immunitaire du veau nouveau-né est affecté par les carences liées à la gestation.

Des carences en vitamines et sélénium prédisposent à une immunité affaiblie pouvant occasionné une infection à *Cryptosporidium sp* et une excrétion d'oocystes massive [92].

## CHAPITRE 3

### EPIDEMIOLOGIE

#### 3.1. Répartition géographique et prévalence de la cryptosporidiose

La cryptosporidiose animale est présente sur les six continents, aussi bien dans des zones tropicales que tempérées [55]

La prévalence de la maladie représente le nombre d'animaux infectés par le genre *Cryptosporidium sp.*, à un moment donné et dans une population donnée. Cependant, la plupart des études menées sur le sujet visent à déterminer la prévalence d'excrétion, c'est-à-dire le nombre d'animaux excréant des oocystes indépendamment de leur statut clinique à un moment donné.

La détermination de la prévalence d'excrétion chez les espèces domestiques a fait l'objet d'un grand nombre d'études.

Chez les bovins, des variations de la prévalence d'excrétion sont observées selon les différentes classes d'âge des animaux. Les études s'accordent sur le fait que la prévalence décroît avec l'âge [137] ; [153]. Par ailleurs, elle est maximale chez les veaux non sevrés (45,8%) puis elle diminue chez les veaux sevrés (18,5%) et chez les génisses (2,2%). La prévalence d'excrétion est aussi fonction du type de race : elle est plus élevée pour les veaux allaitants que pour les veaux laitiers [140]

L'âge des animaux présente également une grande influence sur la prévalence d'excrétion chez les petits ruminants. Ainsi, chez les animaux non sevrés et non-diarrhéiques, elle varie de 2 à 85% pour les agneaux et de 5 à 30% pour les chevreaux. La plus forte prévalence avec un taux de 76% est rapportée pour des agneaux âgés de 8 à 14 jours. [95]

#### 3.2. Epidémiologie de la cryptosporidiose chez les ruminants

Chez les ruminants, ce sont généralement les animaux les plus jeunes qui sont les plus réceptifs et les plus sensibles à l'infection alors que les animaux adultes infectés sont peu nombreux et asymptomatiques [153] ; [154] ; [155]

À l'heure actuelle, la cryptosporidiose est l'une des premières causes d'entérite diarrhéique des veaux nouveau-nés [156]. Cette parasitose entraîne d'importantes pertes économiques chez les ruminants nouveau-nés de par la mortalité et la morbidité qu'elle entraîne [137]. Le taux de prévalence moyen de cette infection varie largement selon les pays et les différentes espèces hôtes de ruminants.

### 3.3. Répartition géographique et prévalence de la maladie

Le 1<sup>er</sup> cas de cryptosporidiose bovine a été décrit en 1971 par Fayer R et al [134]. De nombreuses études ont été conduites dans le monde, sur la prévalence à l'infection chez les bovins laitiers diarrhéiques ou non diarrhéiques [153] ; [156].

Le nombre d'études sur la cryptosporidiose des veaux allaitants est beaucoup moins conséquent. [157] ; [158].

La prévalence de l'infection semble largement varier chez les bovins en fonction de la géographie, du type d'élevage (bovins allaitants ou bovins laitiers) et de l'âge des animaux [158]

Selon certaines études, la plus forte prévalence de l'infection serait rencontrée dans les élevages de veaux laitiers [157].

La prévalence de l'infection est beaucoup plus forte chez les jeunes animaux (inférieurs à 2 mois) que chez les animaux âgés [84] ; [159]

Chez les ruminants, l'âge semble grandement influencer la réceptivité et la sensibilité à l'infection. En effet les jeunes ruminants (inférieurs à 2 mois d'âge) sont les plus sensibles et les plus excréteurs (100 à 107-108 oocystes/ gramme de fèces). [160]

### 3.4. Espèces présentes

L'utilisation de la biologie moléculaire a permis l'étude plus fine des espèces du genre *Cryptosporidium* retrouvées chez les ruminants.

Les quatre espèces majoritairement retrouvées chez les bovins sont : *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae* et *C. andersoni* [21] [153] [161].

#### -Chez les bovins laitiers

*C. parvum* qui est majoritairement présent chez les jeunes veaux non sevrés, *C. ryanae* et *C. bovis* qui sont retrouvés chez les jeunes animaux sevrés et *C. andersoni* qui devient prépondérant chez les vaches adultes [84]

La caractérisation moléculaire des oocystes excrétés par les ruminants permet également de définir le caractère potentiellement zoonotique de certains isolats appartenant aux sous-types IIa et IIc de *C. parvum* [75].

L'identification des différents sous-types se fait par la détermination de la séquence de la glycoprotéine de surface GP60. Il convient donc d'évaluer le potentiel de transmission de *C. parvum* par les ruminants à l'homme.

Chez les bovins, les sous-types appartenant à la famille IIa sont les plus rapportés mais les sous-types sont variables d'une région à l'autre [58]. Le sous-type majoritairement décrit dans le monde chez les bovins est le sous-type IIaA15G2R1, dans certains pays tel que le Portugal ce sous-type est responsable de plus de 75% des infections chez des jeunes veaux [162]. Bien que, le sous-type IIaA15G2R1 soit le plus répandu dans le monde, d'autres peuvent être retrouvés. En effet, dans le nord de l'Irlande, le sous-type IIaA18G3R1 est responsable de l'infection de 55,6 % des jeunes veaux [147]. Les sous-types IIaA18G2R1 et IIaA19G2R1 sont dominants en Floride alors que dans le sud de l'Ontario on retrouve majoritairement trois autres sous-types : IIaA16G1R1, IIaA16G2R1 et IIaA16G3R1 [163]. Ce dernier, IIaA16G3R1 est plus largement décrit que les autres, il a été trouvé récemment chez des veaux en Angleterre et aux Pays-Bas [163].

Il a été décrit, dans les zones où il existe une grande diversité de sous types de *C. parvum*, que plusieurs sous-types peuvent circuler au sein des élevages et même au sein d'un même veau [160]. Les raisons pour lesquelles on observe une différence de sous-types selon les régions ou pays ne sont pas claires. Les pratiques d'élevages telles que les achats d'animaux pourraient être à l'origine de l'augmentation de la diversité des sous-types de *C. parvum* au sein du troupeau [164].

La forte prévalence du sous type IIaA15G2R1 chez les bovins et la détection de ce sous-type chez l'homme dans différents pays tels que l'Australie, le Portugal, la Slovénie et les Pays-Bas suggèrent que celui-ci peut se répandre facilement au sein de la population bovine et peut être à l'origine d'infection chez l'homme [165].

### 3.5. Sources du parasite

#### 3.5.1. Les jeunes animaux du troupeau

Les jeunes ruminants non sevrés sont très susceptibles d'être infectés par le parasite. Selon l'étude de Santin et al [153]. Dans un élevage de vaches laitières au Maryland, la prévalence de la maladie est maximale chez les veaux âgés de 1 à 8 semaines puis elle diminue rapidement chez les veaux de 3 à 12 mois et chez ceux de 13 à 24 mois. De plus, *C. parvum*, principale espèce d'intérêt en médecine vétérinaire et humaine, est à l'origine de 97% des cas de cryptosporidiose chez les veaux non sevrés contre 4% et 0% respectivement pour les autres tranches d'âge. On comprend ainsi que les veaux non sevrés représentent une source majeure du parasite.

Les veaux nouveau-nés infectés excrètent en moyenne  $10^6$  à  $10^7$  oocystes par gramme de fèces [137]. D'après d'autres études, les veaux infectés par  $10^5$  oocystes excrètent entre  $10^9$  et  $10^{10}$  oocystes par gramme de fèces pendant une période de 7 à 10 jours. La quantité importante d'oocystes excrétés est à l'origine d'une contamination massive de l'environnement notamment à la fin de la saison des mises-bas [52]. . Ainsi un veau nouveau-né peut facilement se contaminer par le biais des fèces des veaux voisins. Ceci est d'autant plus vrai que les veaux sont élevés dans des enclos collectifs et que la densité animale est élevée [137].

#### 3.5.2. Les mères

La plupart des bovins adultes excrètent des oocystes de *Cryptosporidium*. Cependant, aucune différence dans l'excrétion n'est observée chez les adultes, qu'il s'agisse d'un élevage présentant des problèmes de cryptosporidiose ou non. Ainsi leur rôle dans la contamination des autres animaux n'est pas clairement établi. Il semblerait également que l'excrétion n'augmente pas autour du vêlage [137]. Dans une étude, des veaux séparés de leurs mères dès la naissance et placés dans des enclos désinfectés ont excrété des oocystes dès l'âge de 3 jours, suggérant la possibilité d'une infection *in utero* [52]. Chez les adultes, l'infection à *C. andersoni* est la plus fréquente [153].

### 3.5.3. Les animaux sauvages et les rongeurs

Les animaux sauvages constituent une source non négligeable du parasite. La présence de rongeurs dans les élevages permettrait de maintenir le niveau de contamination de ceux-ci grâce à une transmission facilitée de l'agent pathogène entre les ruminants et les rongeurs [52].

Certaines espèces animales, comme les mouches, les rotifères et les oiseaux migrateurs, jouent le rôle de transporteurs passifs du parasite [166]. Les mouches, par exemple, peuvent héberger des oocystes de *Cryptosporidium* sur leurs surfaces externes, contribuant ainsi à la propagation de celui-ci.[167].

Enfin les coquillages, capables de filtrer des quantités d'eau importantes, représentent une source d'oocystes en milieu marin tant pour l'homme que pour la faune. [133].

### 3.6. Modes de transmission

La transmission du parasite se fait essentiellement par voie oro-fécale, via l'ingestion d'oocystes directement émis dans les fèces de l'hôte précédent.

La contamination par la voie aérienne est anecdotique et concerne principalement les oiseaux. La transmission chez les animaux peut se faire de manière directe, c'est-à-dire d'animal à animal, ou de manière indirecte par le biais de la nourriture, de l'eau, mais également du personnel s'occupant des animaux, des locaux ou du matériel utilisé.[134].

La dose infectante serait très faible pour les jeunes ruminants en raison de leur sensibilité à l'infection par *Cryptosporidium*. [52]. Certaines espèces de *Cryptosporidium*, en particulier *C. parvum*, peuvent être retrouvées chez toutes les espèces de ruminants. Au sein d'un troupeau la transmission peut être très rapide dès lors qu'un animal est contaminé, car les animaux sont généralement regroupés dans un espace relativement restreint.

Les jeunes ruminants sont les plus sensibles et les plus excréteurs et l'origine de la contamination est souvent difficile à identifier. En effet, la cryptosporidiose clinique peut toucher gravement certains élevages alors que d'autres ne sont pas ou peu touchés [157]. Les oocystes, très résistants dans le milieu extérieur

peuvent survivre jusqu'à 6 mois dans l'eau, les litières ou le fumier dans des conditions de température modérée et ainsi être à l'origine de nouvelles infections. Moore et al [167] ont montré chez le veau que plus la dose infectante était élevée, plus la durée de l'excrétion et le nombre d'oocystes excrétés étaient importants. Il paraît donc important de minimiser l'infection chez les nouveau-nés pour limiter l'évolution de la contamination de l'environnement et ainsi la transmission du parasite. Il est d'ailleurs fortement conseillé de ne pas laisser les jeunes animaux malades en contact avec les nouveaux animaux naissants ni de laisser des animaux d'âge différents dans un même parc [152]. Ce genre de pratique permettrait de minimiser l'infection des nouveau-nés.

Les adultes des ruminants n'excrètent le parasite qu'à faible niveau.[153] Cependant, une augmentation du niveau d'excrétion chez les petits ruminants au moment de la mise-bas a été montrée par Castro-Hermida JA et al.[142].

### 3.7. Critères de sensibilité de l'hôte

#### 3.7.1. L'espèce

La cryptosporidiose infecte un très grand nombre d'espèces animales aussi bien domestiques que sauvages.

Parmi les Ruminants domestiques, qui présentent un intérêt en raison des pertes économiques générées par la maladie, les caprins sont les plus sensibles, suivis des bovins et des ovins [92].

#### 3.7.2. La race

Les différences de prévalence de la maladie entre les races allaitantes et les races laitières chez les ruminants seraient dues à des différences dans le mode d'élevage de celles-ci, les races allaitantes étant élevées sur un mode extensif seraient moins sensibles au parasite [92]. Par ailleurs, Nacir M et al.[140] ont montré que la prévalence de la cryptosporidiose était plus élevée chez les veaux allaitants que chez les veaux laitiers. En effet, ces derniers sont élevés en box individuels la plupart du temps permettant de limiter les contacts entre les animaux

à l'inverse des veaux élevés sous la mère qui ont de nombreux contacts avec leurs congénères.

### 3.7.3. L'âge

Chez les bovins, l'étude de Santín et al [153] montre que la prévalence de l'infection est plus élevée chez les veaux non sevrés que chez les veaux sevrés et les génisses, suggérant ainsi que les jeunes animaux sont plus sensibles à *Cryptosporidium sp.* Dans la même étude, ils ont mis en évidence que l'espèce de *Cryptosporidium* incriminée diffère en fonction de l'âge des animaux : les veaux non sevrés sont principalement atteints par *C.parvum* tandis que dans les autres tranches d'âge des espèces au pouvoir pathogène plus faible sont décrites (*C.bovis*, *C.andersoni*, *C.ubiquitum*).

### 3.7.4. Le statut immunitaire

Le statut immunitaire de l'animal joue un rôle dans l'installation de l'infection. Celle-ci sera facilitée chez un individu présentant une immunodéficiences, qu'elle soit naturelle ou acquise. Ainsi des infections sévères ont été décrites chez des animaux immunodéprimés tels que des chats, des chiens, des chevaux et des singes [55].

Le statut immunitaire influencerait la sévérité mais aussi la distribution de l'infection. Chez les jeunes ruminants, la prise du colostrum dans les premières heures de vie permet un transfert d'immunoglobulines de la mère vers le nouveau-né, le protégeant d'un certain nombre d'infections. Ainsi, un défaut au niveau du colostrum, en quantité et/ou en qualité, est souvent associé à des épidémies de cryptosporidiose en élevage [168].

Les critères de sensibilité de l'hôte jouent un rôle dans l'apparition de la cryptosporidiose mais peuvent également être à l'origine d'une augmentation des taux de mortalité dus à la maladie [92].

### 3.8. Facteurs de risque

#### 3.8.1. La saison

Plusieurs auteurs ont tenté de mettre en évidence le caractère saisonnier de la cryptosporidiose chez les ruminants. Dans une étude au Canada sur des veaux allaitants, la prévalence de l'infection est plus élevée en hiver et au printemps, coïncidant ainsi avec la période des vêlages. En revanche, une autre étude, menée dans un élevage laitier aux Etats-Unis avec des vêlages tout au long de l'année, a montré que la prévalence est plus élevée pendant l'été [137].

L'étude de Trotz-Williams et al. [151] au Canada dans un élevage laitier a mis en évidence que l'excrétion d'oocystes est plus élevée chez les veaux nés en été que chez ceux nés en hiver.

Cependant, l'effet saison observé pourrait être dû à un regroupement des animaux pendant ces périodes et donc à une contamination de l'environnement plus importante. Ainsi de manière générale, le pic d'incidence de la cryptosporidiose est observé lors du pic d'incidence des naissances [151].

#### 3.8.2. La densité animale

Une forte densité animale facilite les contacts entre les individus et ainsi la transmission du parasite. Cette situation peut se retrouver dans des élevages avec une mauvaise conception des bâtiments, qui, associée à une hygiène défailante des locaux et à un renouvellement de l'air insuffisant, facilite la contamination des animaux [151].

#### 3.8.3. La conduite d'élevage

La gestion de l'élevage dans son ensemble peut être à l'origine d'une augmentation de la prévalence de la cryptosporidiose.

De nombreuses études ont pu mettre en évidence différents facteurs de risques tels que la présence de nurseries dans l'élevage, le stress d'un sevrage trop

précoce, les transports. La mise en place d'une prophylaxie chez les mères contre les diarrhées néonatales est associée à une augmentation de la prévalence d'excrétion du parasite. Ceci pourrait être dû au fait que de telles prophylaxies sont souvent mises en place dans des élevages présentant une forte incidence de diarrhées chez les veaux, cependant ces mesures prophylactiques s'avèrent inefficaces contre les cas de cryptosporidiose [151].

Chez les animaux logés sur un sol en béton, la prévalence d'excrétion des oocystes est plus faible. En effet, ce type de sol facilite son nettoyage régulier par rapport aux sols de type sable, terre ou graviers. De la même manière, l'utilisation de savon ou de détergent pour le nettoyage des ustensiles ayant servis à nourrir les animaux est associée à une diminution du risque d'excrétion des oocystes [151].

#### 3.8.4. Le rôle de l'épandage du fumier

L'épandage de fumier ou de lisier dans le but d'enrichir ou de fertiliser les sols conduit à un recyclage des micro-organismes qui peuvent persister pendant de longues périodes aussi bien sur les végétaux que dans les couches supérieures du sol.

En ce qui concerne *Cryptosporidium*, la survie des oocystes après l'épandage peut être à l'origine de la contamination d'animaux qui pâturent sur ces terres ou qui consomment de l'ensilage d'herbe contaminée.

L'épandage du fumier entraînerait également la contamination des cours d'eau situés à proximité des exploitations agricoles, en raison des phénomènes de ruissellement [169].

#### 3.8.5. Alimentation

Le fait de donner de la moulée serait un facteur de risque à cause d'une contamination par les fèces de rongeurs ou en raison d'une trop grande perturbation de la microflore intestinale au moment du sevrage des veaux [170]. Les veaux nourris au lait reconstitué sont 5 fois moins à risque que ceux nourris

au lait naturel dont les risques de contamination sont beaucoup plus élevés. L'eau aussi peut être contaminée puisque la désinfection de l'eau, généralement à base de chlore, est inefficace pour éliminer complètement les ookystes [9].

#### 3.8.6. Type de sol et nettoyage

Les mauvaises conditions de salubrité augmentent significativement le risque de cryptosporidiose définissent trois facteurs de risque : la méthode de nettoyage, la fréquence des nettoyages ainsi que le type de sol.

Même si le produit utilisé n'est pas précisé, le simple fait de désinfecter diminue significativement le risque [142]. La fréquence de nettoyage est également importante. Si les stalles sont lavées une seule fois par mois, les veaux peuvent être jusqu'à deux fois plus à risque d'être infectés comparativement si on les nettoie quotidiennement [143]. La litière semble avoir beaucoup d'influence. Les animaux logés sur de la paille avec un sol en terre ont plus de risque d'être infectés que ceux vivant sur le ciment. La terre et la paille conservent beaucoup mieux l'humidité que les sols en ciment ce qui permet une meilleure survie du parasite [170]. De plus, il est possible de désinfecter un plancher de ciment et cela diminue les risques de contamination de 62 % [143]. Le balayage est aussi un facteur de risque important en permettant le transport des ookystes d'une stalle à l'autre [170]. La majorité des désinfectants à base de chlore ne sont pas reconnus efficaces pour éliminer *Cryptosporidium* de l'environnement. Récemment, des désinfectants à base d'amines, se sont montrés très efficaces.

#### 3.8.7. Les vecteurs externes inanimés

Des échantillons pris sur du fumier sec ramassé à l'intérieur de l'étable, dans des enclos de vèlage et à partir des poussières prises de 3 à 6 mètres du sol (fenêtres, mangeoires et poutres) montrent une grande contamination de *Cryptosporidium* dans l'environnement des vaches [171].

### 3.8.8. Les vecteurs externes animés

Les travailleurs à la ferme pourraient représenter des vecteurs mécaniques de transmission entre les veaux. L'étude de l'équipe O'Handley et al [120] soulignent que la prévalence est très forte dans une étable où le contact entre les veaux est impossible, la même équipe [120] a montré que les souris présentes dans les bâtiments d'élevage bovins pourraient jouer le rôle de réservoir pour les jeunes animaux de l'étable.

L'équipe de Clavel a trouvé *C. parvum* sur 18 % des mouches d'une ville où les infections à *Cryptosporidium* sont connues chez les bovins, les mouches porteraient les ookystes aussi bien dans leur tractus digestif que sur leur cuticule. Elles pourraient transporter jusqu'à 1000 ookystes capables d'infecter des souris pour un minimum de 3 semaines [172].

Les mouches capturées aux alentours des fermes portaient beaucoup plus de *Cryptosporidium* que celles retrouvées ailleurs, notamment dans les villes. Les insectes se nourrissant de matières fécales comme les bousiers ont aussi le potentiel de transporter des ookystes.

## CHAPITRE 4

### DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

Le recours aux techniques de laboratoire est le seul moyen de démontrer de façon certaine la présence ou l'absence des cryptosporidies chez un sujet malade. Ces techniques reposent soit sur la mise en évidence du parasite, de ses antigènes, de ses fractions génomiques ou des anticorps [153].

Il est à noter que *Cryptosporidium* est un organisme de niveau II en biosécurité et les procédures de laboratoire doivent être réalisées dans une enceinte de sécurité microbiologique. Les échantillons cliniques peuvent contenir d'autres agents pathogènes et doivent être traités en conformité avec les normes de sécurité locales.

La meilleure viabilité d'oocystes est obtenue après conservation dans du bichromate de potassium 2,5% à 4°C, dépassant 18 mois. La congélation des prélèvements est déconseillée et le stockage doit être à l'abri de l'air afin d'éviter une excystation prématurée et réduire le développement des bactéries et des moisissures [153]. Le stockage dans du formol pendant une période prolongée doit être évité si les analyses moléculaires sont à effectuer [14].

#### 4.1. Techniques coprologiques

##### 4.1.1. Méthodes microscopiques (Appendice B)

Les méthodes microscopiques permettent de détecter la présence d'oocystes dans les matières fécales prélevées. Les oocystes sont des structures rondes à ovalaires dont la taille varie selon l'espèce de cryptosporidies observée. ( tableau 4.1)

Tableau 4.1: Taille des oocystes de *Cryptosporidium Sp* en fonction de l'espèce observée [48].

Espèces de <i>Cryptosporidium</i>	Taille de l'oocyste
<i>C.parvum</i>	5,4 x 4,9 µm
<i>C. bovis</i>	4,9 x 4,6 µm
<i>C .ryanae</i>	3,7 x 3,2 µm
<i>C. andersoni</i>	7,5 x 5,5 µm

*C. parvum*, *C. bovis* et *C. ryanae* sont de tailles similaires et sont très difficiles à différencier à l'examen microscopique [43]. Le diagnostic de laboratoire repose sur la mise en évidence d'oocystes de *Cryptosporidium sp* dans les matières fécales.

#### 4.1.2. Techniques de concentration (enrichissement)

Elles ont pour but de concentrer dans un faible volume un petit nombre de parasites dispersés initialement dans un grand volume. Par ces techniques, en faisant réduire les débris, on augmente la sensibilité des méthodes de diagnostic. Les méthodes de concentration les plus communes comprennent la méthode de flottation sur sucrose de Sheather et celle de Ritchie sur formol-éther (formol-acétate d'éthyle). Certains auteurs considèrent la méthode de Sheather comme la meilleure. La méthode au formol-éther (Ritchie) modifiée par Allen et Ridney [173] est considérée comme la plus sensible, et est recommandée pour des selles contenant peu d'oocystes [174]. D'autres méthodes conventionnelles de flottaison peuvent être utilisées pour des matières fécales animales. Cependant, les faibles excréteurs d'oocystes (par exemple excréteurs asymptomatiques) ne seront probablement pas diagnostiqués car le nombre d'oocystes sera inférieur à la limite de détection de ces méthodes conventionnelles.

#### A. Techniques physiques [175].

Leur principe est basé sur la différence de densité entre les éléments parasitaires et celle du diluant.

### A1. Techniques de flottaison

Elles utilisent un diluant dont la densité est supérieure à celle des parasites. Ces derniers, plus légers, vont flotter à la surface

#### a. Technique d'Anderson : la plus couramment utilisée

Principe : Elle utilise la solution saturée en saccharose (solution de Sheather) : une dilution, une filtration puis une centrifugation. Elle est très sensible mais d'une lecture difficile

#### b. Flottaison rapide sur lame, modifiée par Naciri [144].

Principe : C'est une méthode quantitative qui utilise la solution de Sheather. Elle simplifie la méthode originelle d'Anderson. Le score d'évaluation du degré d'infection est de 0 à 4.

### A2. Techniques de sédimentation/centrifugation

Elles utilisent un diluant dont la densité est inférieure à celle des parasites. Ces derniers, plus lourds, vont sédimenter au fond :

- Formol-acétate d'éthyle : c'est une technique de concentration largement utilisée en pratique.

### B. Techniques diphasiques (physico-chimiques)

Ces techniques utilisent deux phases liquides non miscibles, l'une aqueuse et l'autre organique, de sorte à produire un coefficient de partage basé sur la balance hydrophile-lipophile du parasite [175] : technique au formol-éther, appelée aussi technique de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley.

#### 4.1.3. Méthodes de détection et de quantification des oocystes

- Méthode quantitative sur cellule de Thoma : Cette méthode est utilisée dans les laboratoires de recherche pour des essais cliniques. Son inconvénient est qu'elle est longue et fastidieuse et, de ce fait, ne peut être utilisée en routine [144].

#### 4.1.4. Techniques de coloration.

À partir d'une concentration, un frottis sur lame est fixé puis coloré, ce qui permet une différenciation des parasites par rapport aux autres éléments (bactéries, cellules, etc.) Les principales techniques utilisées sont :

- o La coloration de Ziehl Neelson modifiée, considérée comme la coloration de référence.
- o La coloration négative de Heine
- o La coloration de Kinyoun à froid modifiée
- o Les colorations aux fluorochromes (notamment à l'auramine O)
- o La coloration au bleu de méthylène/éosine
- o La coloration d'Armand-Desbordes
- o La coloration de May-Grünwald-Giemsa
- o La coloration de Giemsa, mais elle ne constitue pas une bonne méthode pour les frottis de selles (risques de confusion avec des levures)

Ces méthodes sont rapides, simples et peu onéreuses. Leur sensibilité est par contre limitée, généralement de l'ordre de 10 oocystes par gramme, mais elle peut être améliorée par une méthode de concentration préalable. De plus, elles ne permettent qu'une quantification très approximative de l'excrétion oocystale

#### A. Colorations temporaires

Ces colorations sont utilisées pour une orientation rapide. Elles sont faciles à utiliser et réalisées après enrichissement.

##### A1. Coloration négative de Heine (1982)

Principe : Elle utilise la fuchsine carbolique de Ziehl. Cette technique est aussi utilisée pour un but quantitatif à l'échelle d'un individu [176].

##### A2. Coloration au lugol :

Méthode décrite par Bailanger, [150].

## B. Colorations permanentes

A-Coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981) [177].

Cette technique est décrite en détail dans la partie expérimentale.

### B1. Coloration de Ziehl Neelsen modifiée par Angus

Avantage : c'est une technique simple, peu coûteuse et de lecture facile. Les levures, les bactéries et les débris fécaux prennent la contre-coloration et les lames peuvent être conservées pendant longtemps.

Inconvénient : des difficultés surgissent dans la discrimination entre les oocystes de *Cryptosporidium* et d'autres objets sphériques de taille similaire,

### B2. Coloration au Giemsa

Cette technique est actuellement peu utilisée.

B3. Méthode rapide de Baxby et Blundell : C'est une technique très peu utilisée.

### B4. Technique au bleu de méthylène fuchsine basique

Cette technique à l'avantage d'être rapide et spécifique [178].

### B5. Technique à l'auramine phénol (AP)

Cette technique est rapide mais coûteuse et nécessite une coloration de contrôle.[55].

### B6. Coloration acide rapide de Kinyoun

Cette méthode est une variante des méthodes de Ziehl-Neelsen modifiées par Henriksen et Pohlenz et par Angus, ici, c'est la fuchsine phéniquée de Kinyoun qui est utilisée à froid.[179].

#### 4.1.5. Mesure des oocystes

Ces méthodes servent, d'une part, à mesurer l'oocyste identifié pour confirmation et, d'autre part, donner une orientation sur l'espèce parasitaire en cause. En effet, la plupart des oocystes sont semblables dans la forme et se chevauchent en taille [181]. Leur morphométrie peut être utile pour les distinguer des autres objets microscopiques.

#### 4.1.6. Techniques d'immuno-détection

Ces techniques, plus sensibles que celles de concentration ou de coloration, sont indiquées dans le cas de suspicion d'une infection à *Cryptosporidium* avec très peu d'oocystes dans l'échantillon. Leur principe général est basé sur l'utilisation d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques (en général contre *C. parvum* ou *C. hominis*) utilisés dans les tests d'immunofluorescence directe ou indirecte [180]

##### A1. Sérodiagnostic

Le sérodiagnostic est important pour les études épidémiologiques, et est indispensable pour le traitement d'un grand nombre d'échantillons, ce qui serait laborieux avec les techniques de coloration ou de flottation. [144]

##### A2. ELISA (enzyme--linked immunosorbent assay)

L'ELISA permet également de détecter la présence d'antigènes parasitaires dans les matières fécales. [181].

C'est une technique qui repose sur la détection des antigènes de surface des oocystes de *Cryptosporidium sp.* Le fond des puits est tapissé d'anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium*.

##### A3. Immunofluorescence indirecte

Principe : Utilise comme antigène des oocystes de *Cryptosporidium* ou des coupes de lésions renfermant des stades endogènes Cette épreuve réalisée sur un groupe de personnes immunocompétentes guéris de la maladie a confirmé la persistance des anticorps pendant au moins une année. [182].

#### A4. Immunofluorescence directe

Principe : Consiste à détecter la présence des antigènes cryptosporidiens en utilisant des anticorps monoclonaux anti-*C. parvum* fluorescents, conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine, qui reconnaissent les épitopes à la surface des oocystes (FITC-C-Mabs) présents dans les matières fécales [14].

#### A5. Test ELISA en sandwich

Avantages : Les tests immunologiques de détection des copro-antigènes sont moins longs et plus faciles à réaliser que les méthodes microscopiques, et ne nécessitent pas un œil expérimenté. Un autre avantage par rapport à la microscopie est que ces tests peuvent être utiles en cas d'infection en l'absence d'oocystes détectables par la microscopie. Leur spécificité est élevée (98 à 100%).

#### A6. Tests immuno-chromatographiques (IC)

Principe : Dans l'immuno-chromatographie à flux latéral, tous les fluides sont attirés par effet de mèche à travers une membrane enfermée dans une cassette. Les antigènes solubles de *Cryptosporidium* dans l'échantillon à tester sont attirés à travers la membrane, entrent en contact et se lient à des anticorps immobilisés qui augmentent considérablement la vitesse de l'interaction antigène-anticorps. [153].

#### A7. Test immuno-enzymatique d'immuno-électro-transfert blot (EITB)

EITB semble être plus prédictive que la technique ELISA dans la détection notamment de groupes d'antigènes IgG anti-27 kDa et 15/17. [183]

Par cette spécificité, la méthode donne alors l'avantage et l'utilité pour les enquêtes séro-épidémiologiques rétrospectives et prospectives afin de surveiller le risque d'infection.

#### A8. Dosage immuno-enzymatique de protéines recombinantes

La progression des techniques immunologiques modernes a permis d'obtenir une protéine recombinante appelée rCP41. [153]

#### A9. Immuno-séparation magnétique (IMS)

L'IMS est limitée par le temps et les contraintes de coûts. Il s'agit d'une option lors d'enquête sur les cas spécifiques de l'infection ou de la maladie, en particulier lorsque l'indice de suspicion clinique ou épidémiologique est élevé. [153]

#### 4.1.7. Test d'agglutination au latex

Cette technique est plus utilisée pour la détection de *Cryptosporidium* dans l'eau et permet aussi de mettre en évidence les antigènes d'oocystes dans les fèces [92].

## CHAPITRE 5

### LA BIOLOGIE MOLECULAIRE ET LA PHYLOGENIE

#### 5.1. Diagnostic moléculaire

##### 5.1.1. Introduction

La biologie moléculaire est la science qui étudie les différentes formes de vie ainsi que les conditions du vivant, elle permet de comprendre le fonctionnement des cellules au travers du fonctionnement des gènes et de leurs produits. sur le plan fondamental et pratique visant particulièrement à établir des moyens de diagnostic.

Dans le diagnostic moléculaire, on trouve les différentes méthodes qui sont :

PCR - RFLP – séquençage

##### 5.1.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR est particulièrement sensible et spécifique pour l'identification de *Cryptosporidium* à partir d'un échantillon d'eau où la concentration du parasite est généralement beaucoup plus faible que dans les matières fécales d'un animal excréteur [184]. Elle a l'avantage de détecter un plus grand nombre de cas de cryptosporidiose que les autres techniques existantes et permet l'identification des porteurs asymptomatiques au sein d'une population animale [185]. C'est une discipline qui a permis de différencier plusieurs espèces parmi le genre *Cryptosporidium* et de refaire une taxonomie plus juste, jouant ainsi un rôle clé pour la compréhension de ce groupe.

C'est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments.

Nous allons aborder les techniques moléculaires en relation avec notre étude :

La PCR avec ses différentes étapes passe dans chaque cycle par différents produits (Primaire, Secondaire, Tertiaire) pour arriver en dernier à la cible que nous voudrions amplifier.

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles (figure 5.1).

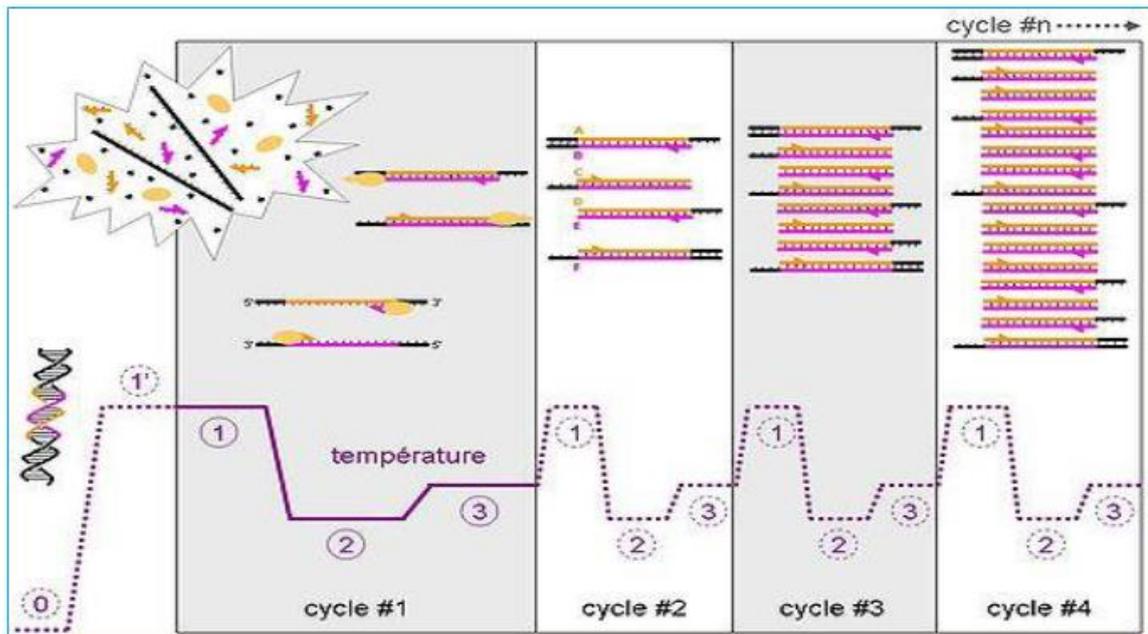


Figure 5.1 : Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR [186]

### 5.1.3. Les acteurs de la PCR :

#### a. L'ADN

L'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser. Puis purifié [187].

#### b. Les deux amorces

Ce sont des fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN.

Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de désoxyribonucléotides. De plus, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier.[187].

#### c. Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Les dNTPs (Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.[187].

#### d. L'enzyme, Taq polymérase

L'enzyme ADN polymérase ADN dépendante, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce. [187].

#### e. Le milieu réactionnel

Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs, les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium ( $MgCl_2$ ). Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme. [187].

À nos jours, la réaction de PCR se fait dans un thermocycleur, ce dernier contient un bloc chauffant où l'on insère les tubes contenant le mélange réactionnel de PCR et où la température peut varier très rapidement de 0°C à 100°C.

Chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier, de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces. [187]

Chaque cycle est donc constitué de trois périodes différentes (figure 5.2)

-Dénaturation

-Hybridation

-Elongation

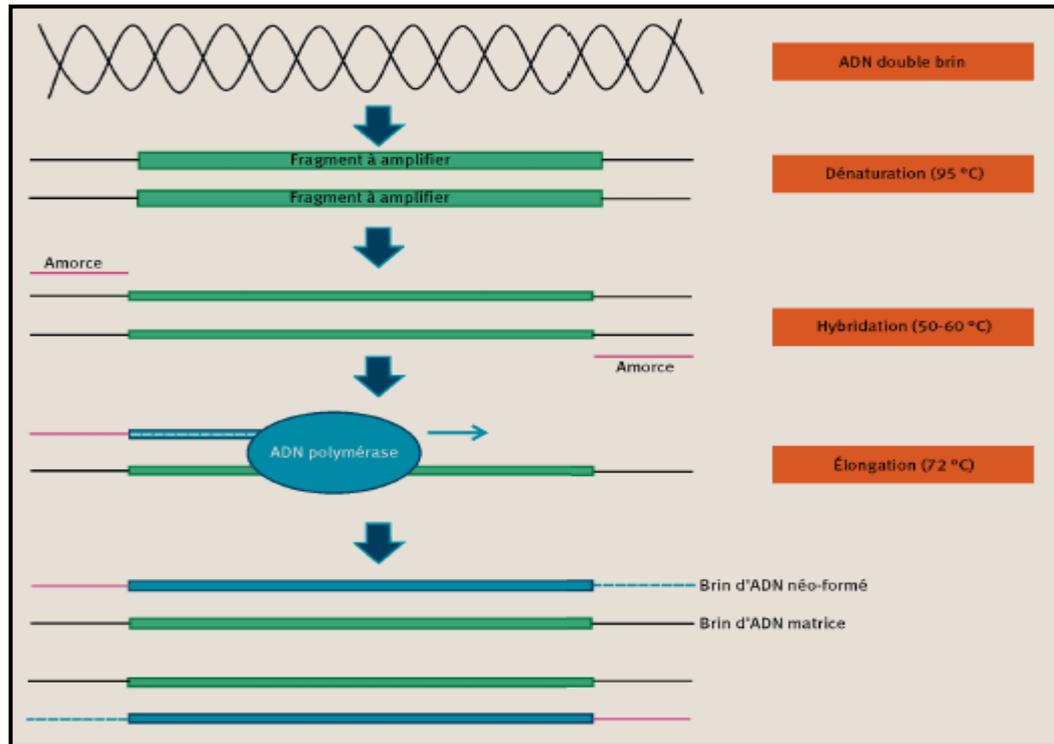


Figure 5.2: Principe de la réaction de PCR [188]

Lorsque la PCR est terminée, on procède à la révélation de l'amplification, les différents produits d'amplification sont les suivants

#### 5.1.4. Migration électrophorétique et révélation

Les produits PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Cette électrophorèse permet de faire migrer les acides nucléiques de charges négatives au travers du gel additionné de Bromure d'ethidium (BET) : produit intercalant qui se glisse entre les bases des acides nucléiques faisant apparaître la molécule d'ADN en fluorescence orange sous illumination par des UV courts (environ 30 nm). La vitesse de migration est dépendante de la masse de la molécule, la présence et la taille des amplicons peuvent être facilement vérifiables sur le gel, [189], en utilisant un marqueur de poids moléculaire contenant l'ADN à différentes tailles

Cette révélation permet de détecter la présence de germe *Cryptosporidium* de manière générale, et une fois faite, nous pouvons passer à la caractérisation des espèces par RFLP

### 5.1.5. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

C'est une méthode en deux temps

Premier temps : nous avons amplifié à titre d'exemple le gène SSU ARNr par la PCR nichée

Deuxième temps : les produits d'amplification vont subir une digestion enzymatique par les enzymes de restriction.

Le profil de migration de RFLP est spécifique des différentes espèces, les espèces étant identifiées, nous pouvons passer à la caractérisation des sous types en utilisant le séquençage d'ADN [190].

### 5.1.6. Séquençage

La caractérisation des sous type de *C.parvum* repose sur l'analyse du gène *gp60*. Cette technique est similaire au séquençage par microsatellites via l'utilisation d'une séquence répétitive de trois nucléotides (TCA, ACG ou TCT) propres à chaque sous-type de *C.parvum* [9] Une PCR nichée amplifie une séquence d'environ 850 paires de base du gène *gp60*, ensuite les produits d'amplification positifs sont séquencés [191] .

L'appartenance à un sous-type de *C.parvum* est codée par le nombre *Il* suivi d'une lettre minuscule notée de *a* à *l*. Chaque trinuécléotide est identifié par une lettre (A pour la séquence TCA, G pour TCG et T pour TCT), et son nombre de répétitions est notifié.

La présence de la séquence ACATCA est notifiée par la lettre R suivi du chiffre correspondant au nombre de répétitions.

## 5.2. La phylogénie moléculaire

La phylogénie est la branche de la biologie qui étudie les relations évolutives entre les êtres vivants. Ces relations sont représentées à l'aide d'arbres phylogénétiques, construits à partir de données moléculaires

La phylogénie permet d'étudier les espèces végétales, animales et microbiennes, sur les deux plans phénotypique et génotypique, afin de les classer en fonction de leurs ressemblances et en fonction de leurs structures géniques (liens de parenté). La phylogénie étudie les relations de parenté entre les individus et représente sous forme d'arbre le résultat de ces relations [192].

La phylogénie se base sur le principe de la comparaison de caractères spécifiques pour un ensemble d'individus.

On peut diviser les données qui vont nous servir pour la construction d'arbres phylogénétiques en deux groupes distincts :

- Les données liées aux caractères phénotypiques.
- Les données moléculaires telles que les séquences d'ADN ou de protéines.

Ces données concernent les caractères morphologiques, physiologiques, génétiques et génomiques.

Pour l'élaboration de l'arbre phylogénétique, nous avons utilisé durant notre étude les deux méthodes suivantes.

#### A. Le Bootstrap :

La construction des arbres phylogénétiques est basée sur des hypothèses évolutionnistes qui nécessitent des corrections. Le Bootstrap est une méthode qui permet de vérifier la robustesse et la fiabilité de l'arbre obtenu avec telle ou telle méthode de construction [192].

Le principe général du Bootstrap est de réaliser des modifications sur les colonnes de l'alignement en les déplaçant aléatoirement de leurs sites initiaux pour retrouver le même arbre car en permutant les colonnes de leurs sites initiaux, nous supposons que ceux-ci évoluent de manière indépendante. À partir de l'alignement multiple principal, on construit de nouveaux alignements qui sont obtenus en permutant les colonnes (les sites). Pour chaque nouvel alignement, on construit une matrice des distances, puis l'arbre correspondant.

## B. Méthode du Neighbor – Joining (NJ)

La méthode NJ autorise des taux de mutations différents donc des longueurs de branches inégales car elle ne se base pas sur la théorie de l'horloge moléculaire.

Le principe de NJ consiste en le calcul des longueurs des branches de l'arbre de sorte qu'elles soient les plus petites possibles. À chaque étape d'agglomération, NJ préfère les taxons qui réduisent la longueur des branches de l'arbre.

La méthode NJ ne choisit pas le couple de taxon ayant la plus petite distance pour faire de lui le premier clade de l'arbre, mais calcule la divergence de chaque taxon par rapport aux autres [192].

## CHAPITRE 6

### TRAITEMENT ET PREVENTION

#### 6.1. Traitement symptomatique

##### 6.1.1. Correction des troubles hydro-électrolytiques

Une simple réhydratation par voie orale suffit pour corriger les troubles hydro-électrolytiques. Lors d'atteinte plus sévère, la mise en place d'une fluidothérapie par voie parentérale est nécessaire. Elle permet de corriger les troubles volémiques, les pertes électrolytiques et corrige un état d'acidose métabolique tout en apportant au veau une source d'énergie et de nutriments.

##### 6.1.2. Protection de la muqueuse intestinale

L'utilisation de pansements intestinaux est recommandée pour protéger la muqueuse du tractus digestif. Ils permettent de limiter l'accès aux cellules intestinales, de ralentir le transit, et ainsi de réduire les pertes hydriques et favoriser la réparation de la muqueuse.[34]

##### 6.1.3. Prévention des surinfections

Une antibiothérapie large spectre est mise en place lors d'altération de l'état général. Elle permet de limiter la surinfection bactérienne et d'écartier le risque de bactériémie.

#### 6.2. Traitement thérapeutique

##### - Le lactate d'halofuginone

Lors d'administration curative sur 7 jours, la réduction de l'excrétion est moins importante et aucun effet n'est observé sur la diarrhée.[92]

Cette particularité est due à l'effet cryptosporidiostatique de l'halofuginone. Il retarde le développement des oocystes par action sur les stades précoces de *Cryptosporidium sp.*

Le traitement doit être administré à l'ensemble des veaux d'une même case. Les élevages ayant des antécédents de cryptosporidiose doivent instaurer un traitement préventif des les 24 à 48 heures suivant la naissance.

#### - Le sulfate de paromomycine

Lors d'administration préventive de paromomycine à 100 mg/kg per os durant 11 jours, on observe une excrétion d'oocystes extrêmement faible et une réduction de la diarrhée chez le veau. Peu d'effets secondaires ont été observés, seulement un ramollissement fécal lors d'administration préventive chez le veau.[43] ;[92]

### 6.3. Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire a pour but d'éviter l'infection chez le veau et de faire diminuer la pression parasitaire dans l'environnement, afin de diminuer le risque d'ingestion d'oocystes de *Cryptosporidium sp.* La prévention repose sur le contrôle de la pression parasitaire, en agissant à la fois sur les animaux excréteurs et sur l'environnement.

### 6.4. Importance

La cryptosporidiose est à l'origine de perte économique chez les bovins. La diarrhée à *Cryptosporidium sp* chez le veau représente un cout important pour l'éleveur .Elle occasionne une forte morbidité et implique un investissement financier dans les traitements préventif et curatif, ainsi qu'une perte de temps non négligeable pour l'éleveur qui doit assurer le nursing du veau et l'observance des traitements. Le taux de mortalité rencontre lors d'épisode diarrhéique se répercute également sur l'économie de l'exploitation [144].

D'un point de vue sanitaire, *C.parvum* est à l' origine d'infection zoonotique chez l'homme. Il occasionne un syndrome diarrhéique d'intensité variable.

Les mesures préventives contre la contamination des eaux concernent majoritairement les veaux non sevrés qui sont les plus grands excréteurs d'oocystes.

La prévention passe par une limitation d'accès aux zones de captage d'eau, de compostage, et d'épandage du fumier de veau [193].

### 6.5. Vaccination

Actuellement il n'existe aucun vaccin disponible contre la cryptosporidiose clinique mais des études montrent des résultats encourageants lors de vaccination des mères et distribution du colostrum hyperimmun aux nouveau-nés [194].

## CHAPITRE 07 PARTIE EXPERIMENTALE

### 7.1. Introduction :

La cryptosporidiose représente le type de pathologie pour lequel la résolution de la problématique est nécessairement préventive.

En outre, nous connaissons mal la part de l'agriculture et des animaux comme source de contamination de l'eau par *Cryptosporidium* en milieu agricole en Algérie.

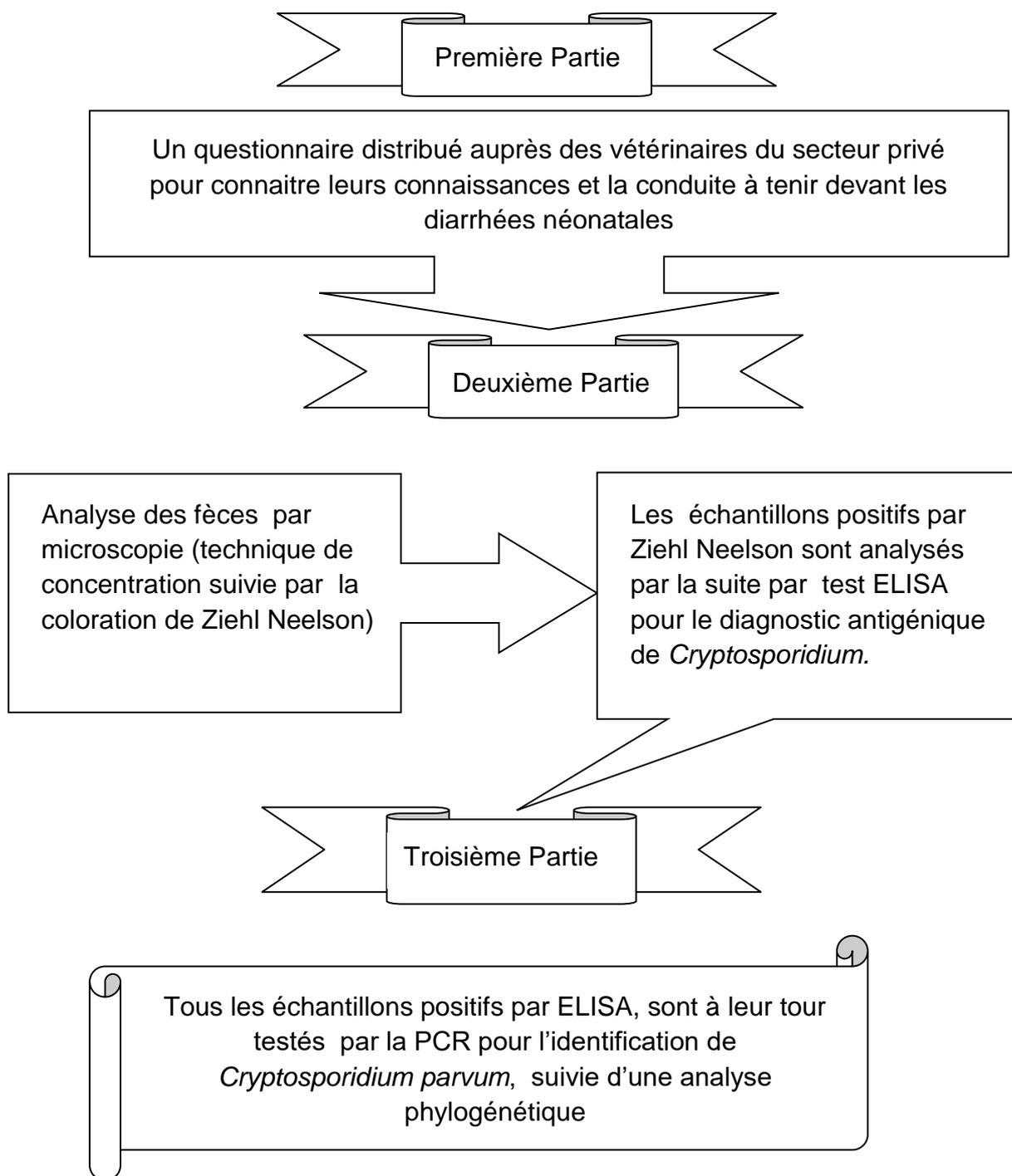
Malgré la bonne connaissance de la cryptosporidiose qui ne cesse d'évoluer et les chiffres d'augmenter chez l'homme et l'animal, ceci pourrait être due à la méconnaissance du génotype circulant. Il nous est apparu opportun de réaliser cette thèse et devant le besoin d'approfondir nos connaissances sur la cryptosporidiose.

Nous nous sommes tracés les objectifs suivants :

-Une enquête menée auprès des vétérinaires privés des différentes régions de l'Algérie pour connaître la conduite à tenir face aux diarrhées néonatales des veaux.

-Face aux données récoltées durant notre enquête et en partant de ces orientations un deuxième objectif est de déterminer la prévalence de *Cryptosporidium* sp dans les différents élevages bovins situés au Centre, Ouest et Est de l'Algérie en utilisant la technique de référence, la coloration de Ziehl Neelson modifiée, le test ELISA pour le diagnostic antigénique de *Cryptosporidium* et le génotypage de *Cryptosporidium* par la méthode PCR (Polymerase Chain Reaction).

## Protocole de notre étude



## 7.2. Enquête auprès des vétérinaires privés

### 7.2.1. Introduction

Cette partie concerne une enquête basée sur un questionnaire (Appendice C) qui a touché 128 vétérinaires du secteur privé localisés dans les wilayas suivantes : Alger (Zone 1), Tizi Ouzou (Zone 2), Blida, Tipaza, Laghouat (Zone 3), les vétérinaires ont été questionnés durant la période allant de l'année 2015 jusqu'à l'année 2016.

Le but de cette enquête était de connaître la conduite à tenir des vétérinaires praticiens devant les diarrhées néonatales dans les élevages bovins mixte (laitier et allaitant) situés en Algérie, ainsi que les facteurs de risque influençant l'apparition des diarrhées.

### 7.2.2. Matériel et méthodes

L'enquête concerne 128 vétérinaires touchant cinq wilayas (Blida, Tizi Ouzou, Alger, Tipaza et Laghouat). Ces régions sont considérées parmi les bastions. (Ministère Agriculture et du Développement Rural, 2013) de la production laitière en Algérie.

Chaque vétérinaire a fait l'objet d'un entretien personnel pour répondre au questionnaire.

Ce dernier comporte deux aspects :

Le premier : concerne des questions d'ordre général ; telles que la surface de l'exploitation, type de production, l'existence d'autres espèces, la taille du troupeau, le type de stabulation, l'hygiène de l'étable, l'hygiène des animaux, la vaccination des animaux, les conditions de vêlage, source d'abreuvement. (Annexe 2)

Le deuxième : aspect concerne davantage les questions en relation directe avec l'apparition des diarrhées, notamment la fréquence de rencontre des diarrhées néonatales, la tranche d'âge la plus touchée, la période d'apparition de la

diarrhée, l'état du nouveau-né à la naissance, les modalités de la distribution du colostrum, le taux de mortalité. (Appendice C)

Notre enquête a fait l'objet d'une étude statistique définie par une étude relationnelle. Cette partie, s'intéresse à l'identification de l'impact de quelques facteurs (sexe, âge, modalités de distribution du colostrum et l'hygiène des étables) sur l'apparition des diarrhées néonatales chez les veaux, au moyen du test de Pearson à 5 % version 25. (Appendice D).

L'étude statistique, établie grâce au logiciel *SPSS version 25*, a été utilisé pour une analyse de corrélation bivariée (corrélation de Pearson à 5 %). Si  $P < 0.05$ , nous parlons d'une différence significative (Appendice D).

### 7.2.3. Résultats

#### 7.2.3.1. Enquête sur la fréquence de rencontre des diarrhées néonatales des veaux

Un total de 128 vétérinaires praticiens questionnés, un nombre élevé des vétérinaires rencontrent fréquemment les diarrhées néonatales ce qui correspond à un taux de 70.3 % (figure 7.1).

L'analyse statistique a révélé une différence très hautement significative ( $P < 0.01$ ) (Appendice D).

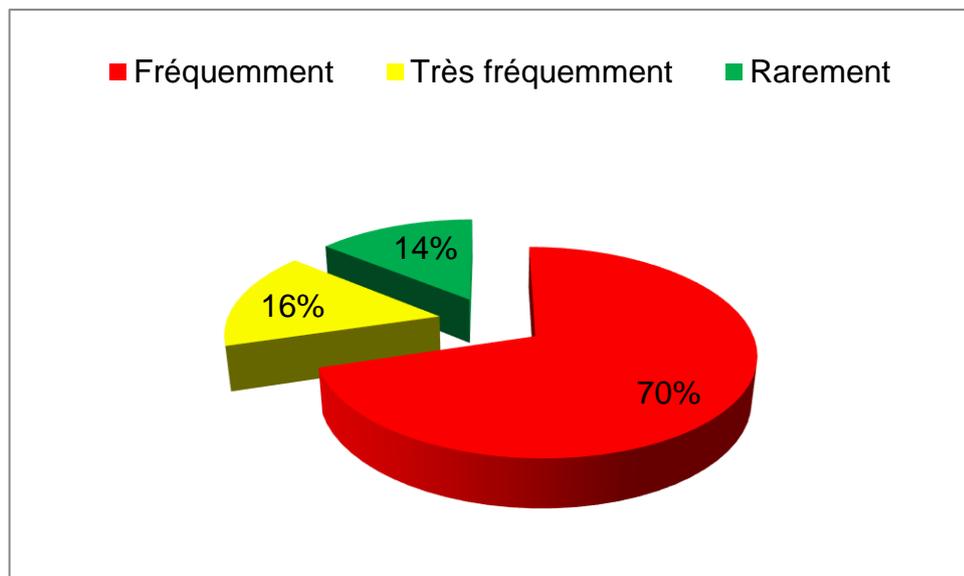


Figure 7.1 : Fréquence des diarrhées néonatales selon les vétérinaires

### 7.2.3.2. Enquête sur les origines des diarrhées néonatales des veaux

Sur les 128 vétérinaires interrogés, 34.4 % soupçonnent en premier lieu une origine bactérienne, 30.5 % une origine virale, 17.6 % suspectent une origine alimentaire, alors que seulement 14.5 % % incriminent une origine parasitaire (figure 7.2).

Notons aussi que pour cette question, les vétérinaires questionnés se sont basés sur la couleur des fèces afin de préciser l'origine de la diarrhée (jaune paille : bactérienne marron, verte ou rouge : virale ; blanchâtre : alimentaire)

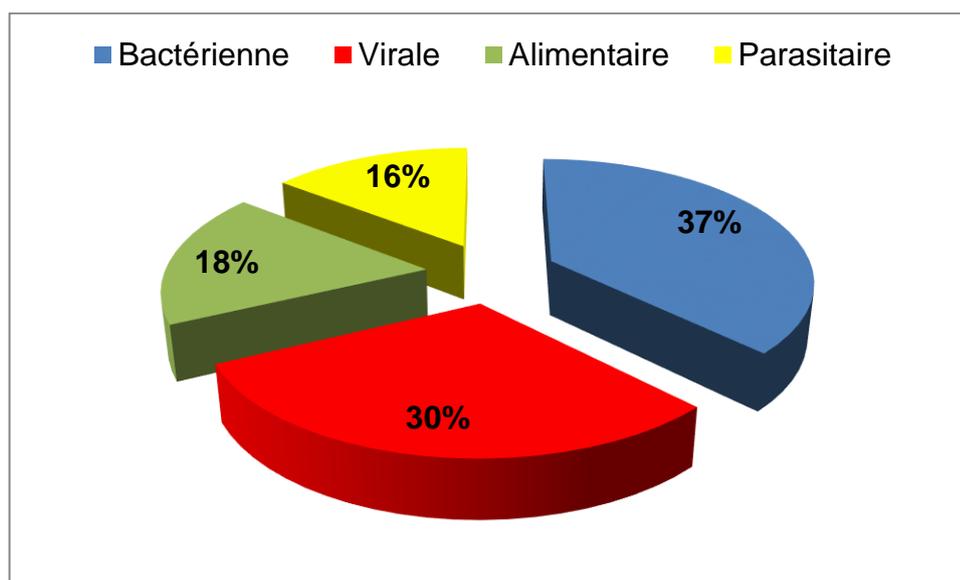


Figure 7.2 : Origine des diarrhées néonatales

### 7.2.3.3 : Enquête sur les mortalités liées aux diarrhées néonatales des veaux

L'enquête a enregistré que 82.9 % des vétérinaires interrogés déclarent que les diarrhées néonatales sont liées aux mortalités, alors que 17.1 % des vétérinaires jugent que les mortalités ne sont pas liées aux diarrhées (figure 7-3).

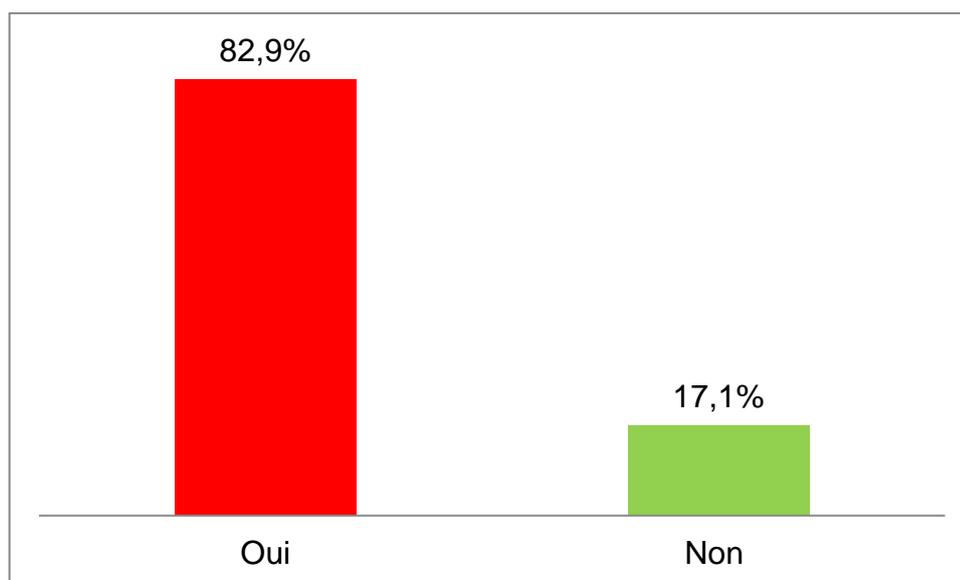


Figure 7.3 : Mortalités liées aux diarrhées néonatales du veau

#### 7.2.3.4 : Enquête sur le recours au diagnostic de laboratoire

D'après la figure 7.4, 76.2 % des vétérinaires interrogés ont affirmé n'être jamais amené à faire un diagnostic de laboratoire, bien que 23.8 % déclarent avoir recours aux analyses de laboratoire.

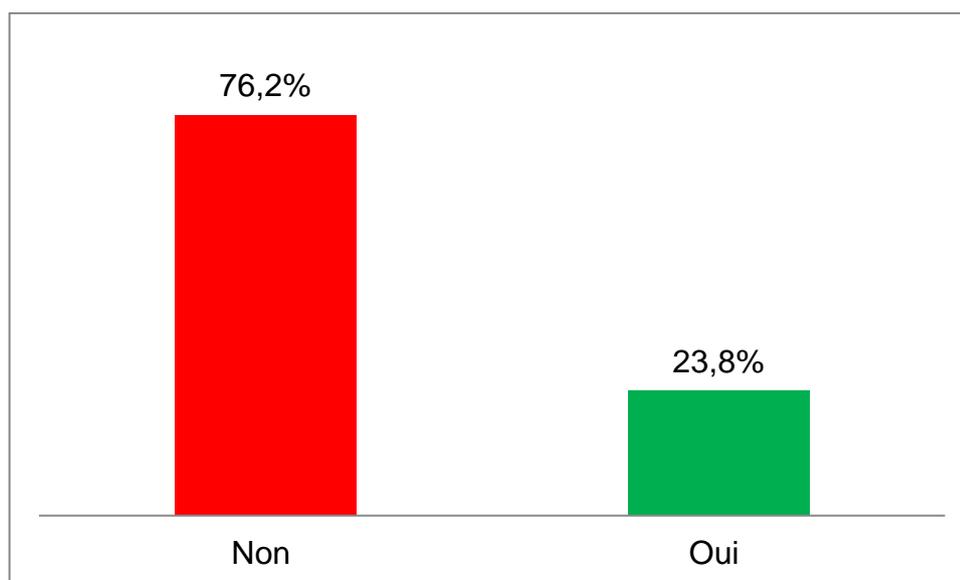


Figure 7.4 : Recours au diagnostic de laboratoire

### 7.2.3.5. Enquête sur l'utilisation de vaccin anti diarrhéique avant le vêlage

Nous avons constaté qu'une minorité avec un taux de 35 % des vétérinaires recommandent l'utilisation de vaccin anti diarrhéique avant le vêlage pour renforcer l'immunité du veau à la naissance (figure 7.5).

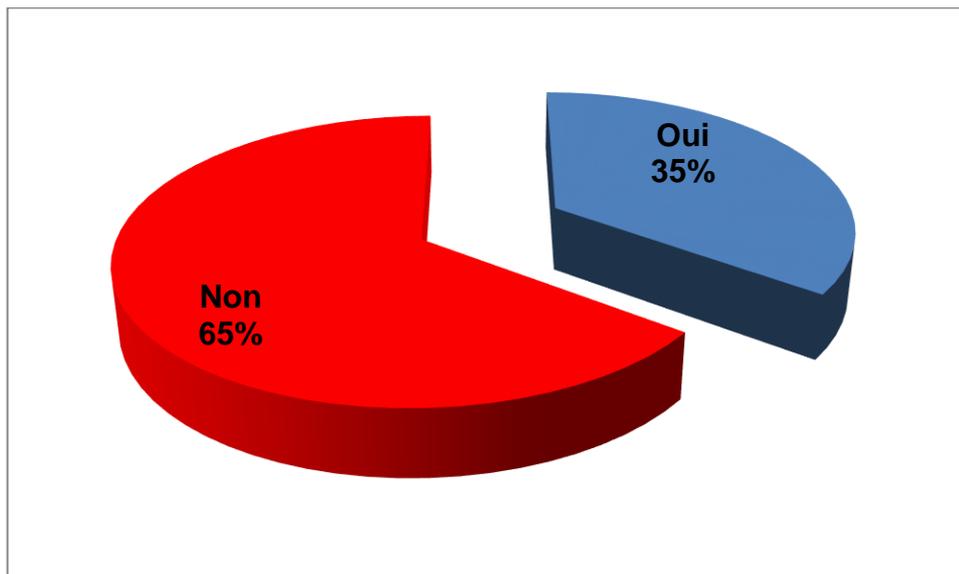


Figure 7.5 : Utilisation de vaccin anti-diarrhéique avant vêlage

### 7.2.3.6. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales en fonction de l'âge

Durant notre enquête, nous avons constaté que sur les 128 vétérinaires interrogés, 54.6 % déclarent que la tranche d'âge la plus touchée est située entre 1 à 7 jours et 32.3 % soulignent que les veaux présentant de la diarrhée sont âgés entre 8 à 15 jours (figure 7.6).

L'analyse statistique révèle une différence hautement significative ( $P < 0.01$ ) qui explique un lien entre la diarrhée et l'âge. (Appendice D)

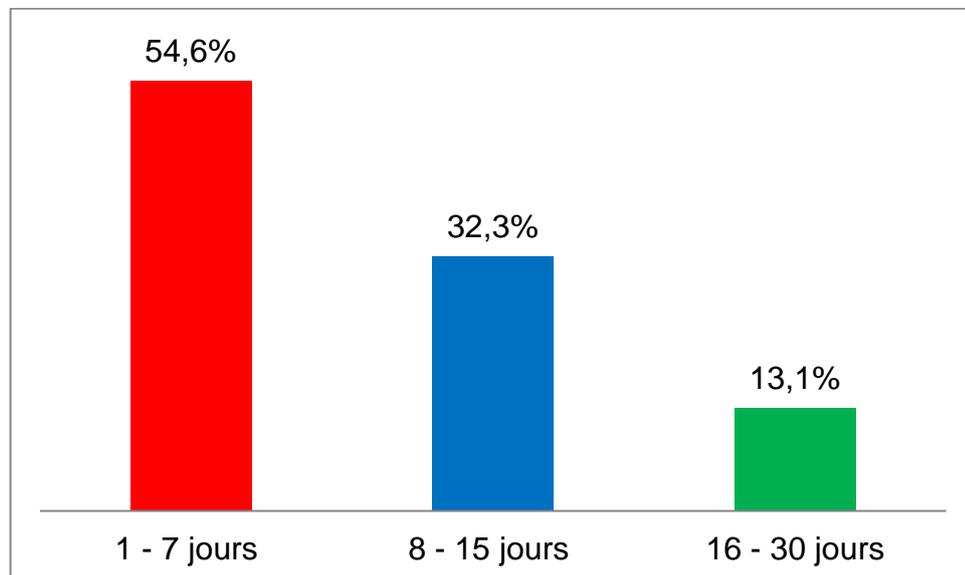


Figure 7.6 : Fréquence des diarrhées néonatales en fonction de l'âge

### 7.2.3.7. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales en fonction du sexe

Durant notre enquête, nous avons remarqué que 71.6 % des vétérinaires interrogés déclarent que les diarrhées sont observées beaucoup plus chez les veaux que les velles (figure 7.7)

L'analyse statistique a révélé une différence hautement significative ( $P < 0.01$ ) (Appendice D)

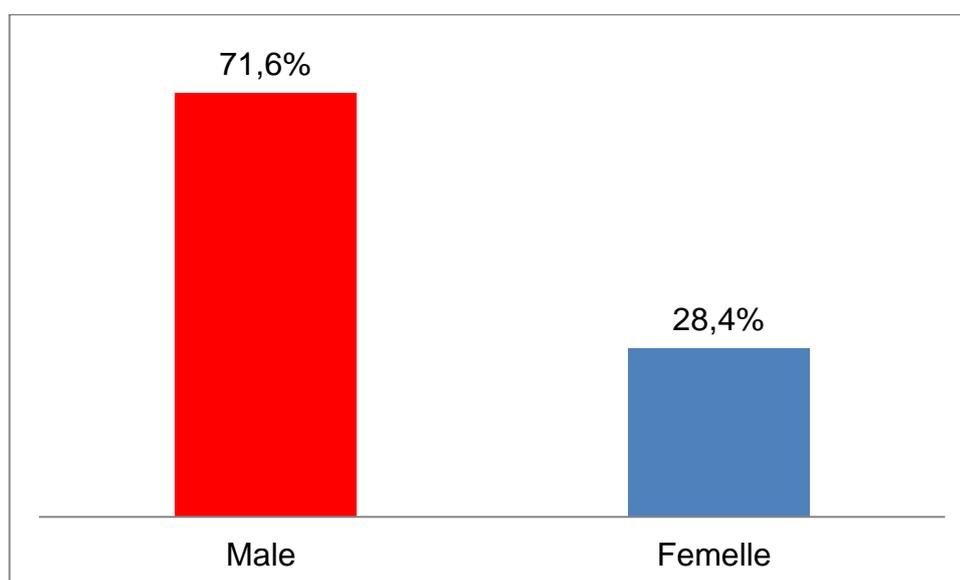


Figure 7.7 : Fréquence des diarrhées néonatales en fonction du sexe

### 7.2.3.8. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales selon la saison

Durant notre enquête, nous avons constaté que 42 % des vétérinaires questionnés soulignent que l'hiver est la saison la plus touchée, alors que 38 % des vétérinaires déclarent que le printemps est la saison la plus touchée (figure 7.8).

L'analyse statistique a révélé une différence hautement significative ( $P < 0.01$ ) (Appendice D).

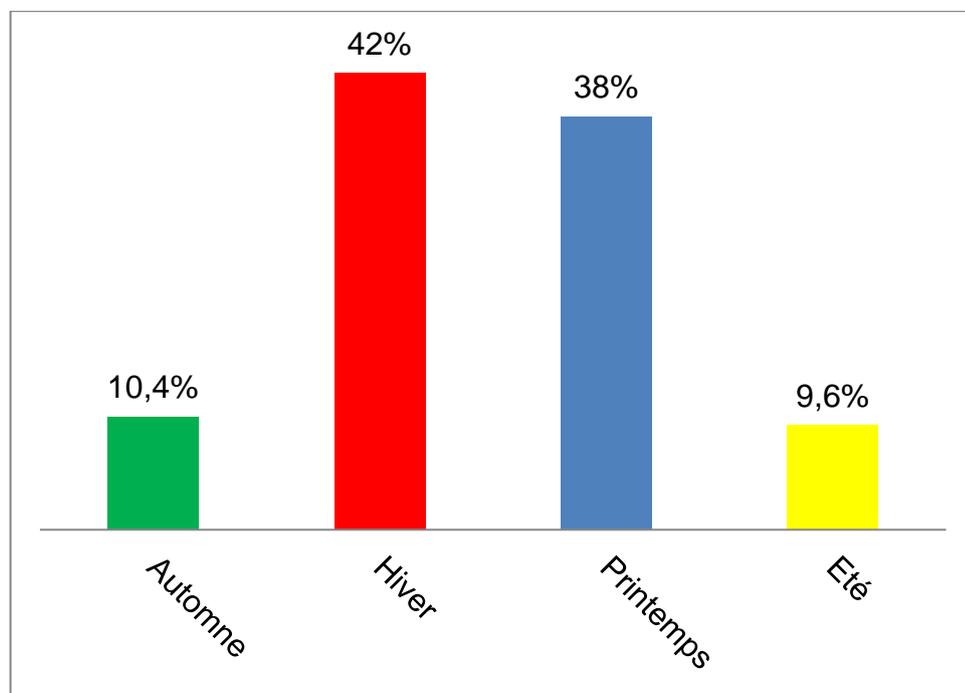


Figure 7.8 : Fréquence des diarrhées néonatales selon la saison

### 7.2.3.9. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales selon l'état d'hygiène des étables.

Selon les vétérinaires audités, le facteur hygiène est un facteur de risque qui joue un rôle dans l'apparition de la diarrhée, ce qui a été constaté avec un taux de 51 % des vétérinaires qui ont précisé que la diarrhée est associée à un état d'hygiène « médiocre » et 41 % à un état d'hygiène « moyen » ( figure 7.9).

L'analyse statistique a révélé une différence hautement significative ( $P < 0.01$ ). (Appendice D)

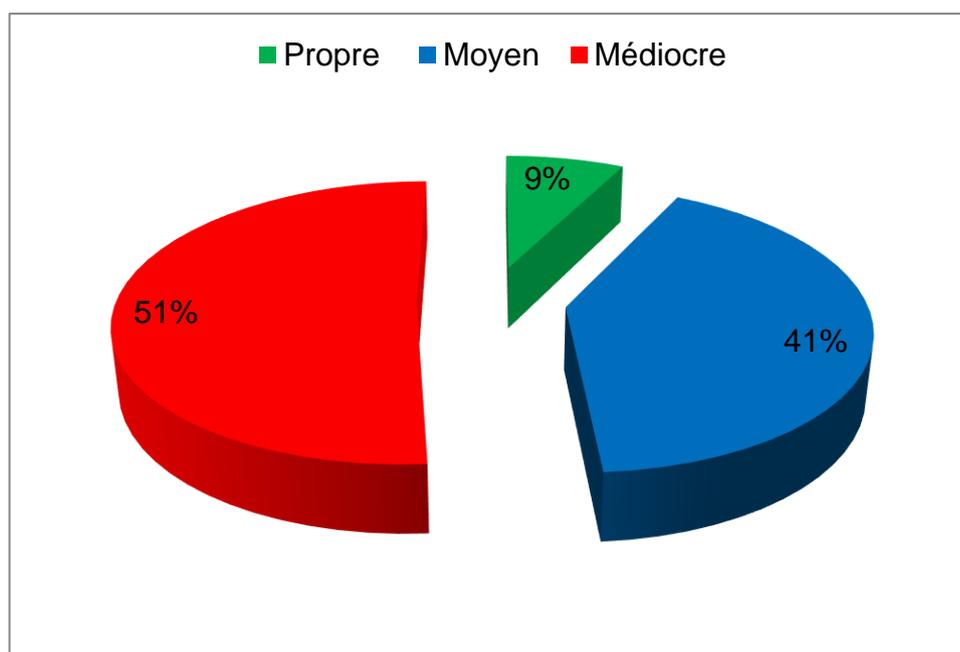


Figure 7. 9 : Fréquence des diarrhées néonatales selon l'état d'hygiène des étables

#### 7.2.3.10. Enquête sur la fréquence des diarrhées néonatales en fonction des modalités de distribution de colostrum

Concernant la prise de colostrum la majorité des vétérinaires praticiens questionnés déclarent que les veaux sous mère présentent de la diarrhée ce qui correspond à un taux de 50.1 %, tandis que 32.8 % des vétérinaires expliquent que la diarrhée est observée chez les veaux nourris avec le biberon (figure 7.10).

Par ailleurs, l'analyse statistique n'a révélé aucune différence statistique. (Appendice D)

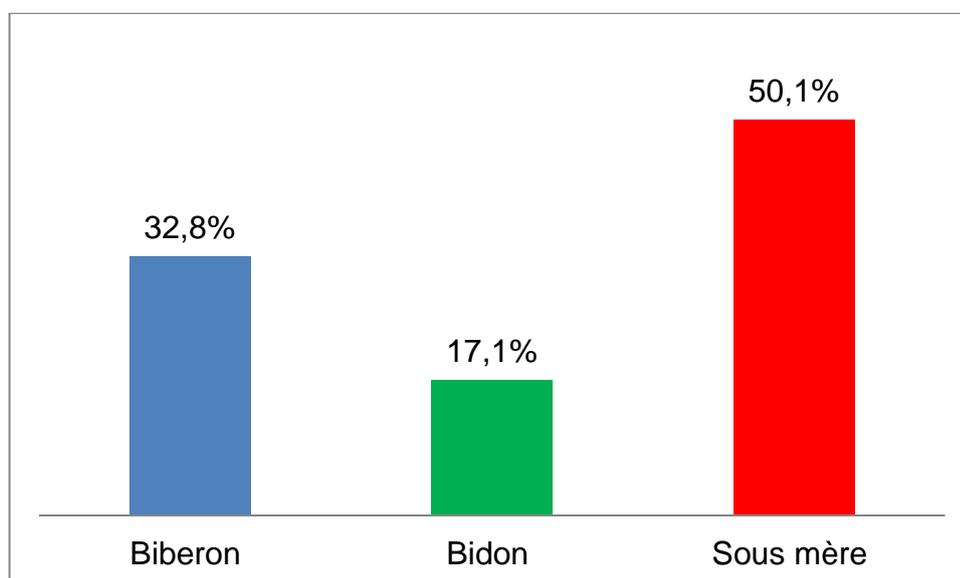


Figure 7.10 : Fréquence des diarrhées néonatales en fonction des modalités de distribution de colostrum

#### 7.2.4. Discussion

Notre objectif a pour but de connaître la situation des diarrhées néonatales du veau dans nos élevages bovins situés en Algérie, une enquête auprès des vétérinaires privés nous a permis de recueillir des informations sur les diarrhées néonatales du veau en général et quelques facteurs de risque en particulier.

Notre but est de rassembler le maximum d'informations pour connaître la conduite à tenir des vétérinaires face aux diarrhées néonatales et en particulier de savoir si le praticien est en mesure de diagnostiquer la cause de la diarrhée ou non.

##### 1. La fréquence de rencontre des diarrhées néonatales chez le veau :

L'enquête réalisée au près des vétérinaires praticiens a relevé un taux de 70.3 % de vétérinaires rencontrent fréquemment les diarrhées chez le veau, ceci peut être expliquée aux mauvaises conditions d'hygiène, une mauvaise gestion des éleveurs, nous avons constaté que ce taux est supérieur à celui rapporté en 1985 par Vallet et al [195] ; en 1999 par Bendali ,et al [2] et en 2009 par Boussenna et Sfaksi [196] avec des taux de 64 % ;14.6 % et 51 % respectivement.

##### 2. Les origines des diarrhées néonatales

Les veaux nouveau-nés sont extrêmement sujets à la diarrhée, particulièrement durant les 4 premières semaines de vie. Ce sont certaines bactéries et certains virus qui, en s'attaquant à la muqueuse intestinale des veaux, provoquent cette diarrhée, laquelle conduit à une diminution de l'absorption des nutriments, essentiels pour le veau, et à une déshydratation.

Plusieurs de ces agents peuvent être en cause simultanément. C'est pourquoi il n'est pas toujours facile en pratique d'identifier le type de diarrhées. Pour cela, il est nécessaire de demander une analyse de fèces pour déterminer ou confirmer les agents pathogènes en cause.

Durant notre enquête, nous avons constaté que la majorité des vétérinaires déclarent que les diarrhées rencontrées sont surtout d'origine virale et

bactérienne, sans avoir recours au diagnostic de laboratoire en se basant sur la couleur et l'aspect des matières fécales ,ce qui a été rapporté en 2006 par Rousseau F [197] , et en 2007 par Navetat et al.[198] , une consistance très liquide de couleur jaune paille causée par les *Colibacilles*, une consistance glaireuse de couleur marron, verte ou orange causée par *Rotavirus* ou *Coronavirus* , un aspect pâteux de couleur jaunâtre provoquée par les cryptosporidies parfois avec des filets de sang souvent associée à des virus , une couleur blanchâtre, très liquide avec grumeaux et odeur acide souvent due à des erreurs de conduite alimentaire

### 3. Les mortalités liées aux diarrhées

La mortalité des veaux est un sujet très sensible, en même temps elle engendre des pertes économiques. Durant notre enquête, nous avons remarqué que la majorité des vétérinaires déclarent que les mortalités sont liées aux diarrhées sans avoir recours à un diagnostic plus approfondi (prélèvement pour examen complémentaire). En 2016, selon Trou G [199] explique que les problèmes sont rarement dus à un seul facteur de risque, souvent, les élevages cumulent des pratiques à risques : un lieu de vêlage pas approprié, où l'hygiène n'est peut-être pas idéale ou maîtrisée, un vêlage sans désinfection du cordon ombilical après la naissance, des apports de colostrum insuffisants, du colostrum de mauvaise qualité ou apporté trop tardivement.

### 4. Le recours au diagnostic de laboratoire

Le diagnostic de laboratoire est une étape très importante pour mettre en évidence un germe, durant notre enquête un taux élevé a été remarqué concernant le non recours au diagnostic de laboratoire, ce qui rend difficile le traitement de la diarrhée. Au terme de cette enquête, nous avons enregistré que la minorité des praticiens pensent à une cause parasitaire sans avoir recours au diagnostic de laboratoire et que la majorité d'entre eux tranchent d'emblée en faveur d'une origine virale ou bactérienne.

## 5. Utilisation de vaccin contre les diarrhées avant le vêlage

Durant notre enquête un nombre important de vétérinaires ne recommandent pas l'utilisation de vaccin anti diarrhéique avant le vêlage sachant que la vaccination des mères permet d'augmenter les anticorps sériques qui enrichissent le colostrum, ce qui renforce l'immunité du veau après la naissance, ceci a été rapporté par Waltner –Toews D et al, [200] en 1986, qui ont montré que le risque de diarrhée est 4 fois supérieur si les mères ne sont pas vaccinées. En 1993 des études effectués par Bonal C et Moussa A,[201] ; Schelcher F et al,[202] qui ont recommandé l'utilisation de vaccin dans les semaines qui précèdent la mise bas. Par ailleurs, Roy JHB,[203] a souligné dans des enquêtes prospectives l'intérêt et le bénéfice du vaccin.

### 5. Les facteurs de risque

#### 5.1. La fréquence en fonction de l'âge :

Notre enquête a souligné que les vétérinaires questionnés déclarent que la tranche d'âge la plus touchée est située entre 1 à 7 jours et 8 à 16 jours (une période inférieure à 15 jours), c'est une période très critique pour le veau, pour cela, nos résultats sont en accord avec les travaux de Bendali F [2] en 1999 ; Clement J.C., al [204] en 1995 qui ont montré que le plus grand risque de la diarrhée se trouve durant les deux premières semaines de vie , aussi avec les travaux de Constable [205] en 2004 qui souligne que les veaux âgés de moins de 2 semaines sont plus touchés, ceci explique l'immaturation du système immunitaire, ou encore au type de parcage (parcage collectif) et à une mauvaise distribution de colostrum ce qui augmente la sensibilité aux infections.

#### 5.2. La fréquence en fonction du sexe

Nos résultats rejoignent les données de la bibliographie où les femelles sont plus résistantes aux diarrhées, ceci peut être expliqué par le fait que ces dernières semblent avoir des taux sériques d'immunoglobulines (reflétant une absorption accrue de colostrum) significativement plus élevés que chez les mâles. Ce résultat étant certainement influencé par une facilité du vêlage. Cependant, les veaux sont

généralement plus gros au moment du vêlage, souffrent davantage à ce moment, et tardent à se lever et téter ce qui a été cité par Selles [206] en 2009.

En outre, nos résultats rejoignent les travaux de Clement et al [204] en 1995 ; ainsi que les travaux de Vallet [195] en 1985 qui ont montré que les males sont deux fois plus sensibles que les femelles.

### 5.3. La fréquence en fonction des modalités de distribution de colostrum

Durant notre enquête, les vétérinaires ont souligné que la majorité des veaux nourris sous-mère présentent de la diarrhée ceci est du probablement aux conditions d'hygiène de la vache et de l'étable, ceci est en accord avec les travaux de Gay et al [207] en 1994 qui ont souligné que l'efficacité de la prise de colostrum dépend de plusieurs paramètres : la quantité absorbée, la qualité, la vivacité du veau, une prise insuffisante ou trop tardive du colostrum

### 5.4. La fréquence selon la saison

Durant notre enquête, nous pouvons dire que la fréquence de la diarrhée durant l'hiver est élevée, en effet, la relation entre l'hiver et l'apparition de diarrhée serait expliquée par le climat humide et froid, ce qui expose les veaux au stress et par la concentration des vêlages pendant l'hiver (facteur favorisant la concentration des germes, plusieurs auteurs soutiennent cette idée les travaux de Bendali et al [2] en 1999 et de Vallet [195] en 1985 et en 2001 par les travaux de Huentink et al [209].

Nous avons aussi constaté que la fréquence des diarrhées est élevée durant le printemps ceci est due au regroupement des vêlages durant cette période ce qui rejoint les travaux effectués par Atwill et al [208] en 1999 qui ont constaté que les veaux au mois de mai (printemps) c'est une période où les veaux sont en contact étroit avec la source d'infection ou leur résistance est faible. En 2007, les travaux de Navetat et al [198] qui ont expliqué que les éleveurs préfèrent regrouper les vêlages en saison d'herbe, en 2001,

En 2000, Selon Naciri et al [210] ; ainsi qu'en 2002 selon Morin [211], les veaux qui naissent en premiers provoquent l'augmentation de la contamination de l'environnement et les derniers veaux reçoivent une dose importante de germes et manifestent une diarrhée.

### 5.5. La fréquence selon l'état d'hygiène des étables

La majorité des vétérinaires questionnés ont déclaré que l'état d'hygiène des étables était de "moyens" à "médiocre" ce qui accentue l'apparition de la diarrhée, à ne pas aussi négliger le rôle de la litière, dont il est quasiment impossible de garder un environnement "stérile " et le non-respect de certains éleveurs des conditions d'hygiène entraîne la propagation de la maladie. Un autre facteur qui contribue dans l'apparition de la diarrhée, le parcage des veaux, ce qui a été remarqué par les vétérinaires questionnés où la majorité des veaux sont logés dans des box collectifs ce qui accentue le risque d'infection ceci a été rapporté en 1985 par Fayer et al [5] ; en 1992 par Heath et al, [212] ; en 1994 par Garber et al [213], en 1994 par Quigley et al [214], en 1999 par Mohammed et al, [215] qui ont fait ressortir que les veaux logés dans des box individuels, le risque d'infection est moindre par rapport aux veaux logés en collectivité.

### 7.2.5. Conclusion

Les diarrhées néonatales constituent à l'heure actuelle un problème majeur en élevage bovin et une préoccupation pour l'éleveur et les chercheurs.

L'apparition de diarrhée dans un élevage a une étiologie multifactorielle (virus, bactéries et parasites), cette pathologie représente une cause de mortalité surtout chez les jeunes animaux (inférieur à 15 jours). Les diarrhées sont souvent d'origine infectieuse que d'origine alimentaire, d'autres facteurs qui sont liés à l'animal, à l'environnement, à la gestion des élevages, l'hygiène peuvent entraîner l'apparition de cette pathologie.

Par ailleurs, il est obligatoire et nécessaire de peser la responsabilité de chaque agent pathogène dans l'induction de cette pathologie en effectuant des examens complémentaires pour la mise en évidence du germe par le recours au diagnostic de laboratoire.

Au terme de notre enquête, nous avons pu avoir des informations sur les connaissances des vétérinaires et leurs conduites à tenir devant les diarrhées néonatales des veaux :

- Les vétérinaires rencontrent fréquemment les diarrhées
- Les veaux touchés sont âgés moins de 2 semaines
- Les males sont plus touchés et plus sensibles que les femelles
- Le printemps et l'Hiver représentent les saisons où les veaux sont plus touchés
- Les conditions d'hygiène sont défavorables.
- Le traitement est instauré sans avoir recours au diagnostic de laboratoire et que la majorité d'entre eux tranchent d'emblée en faveur d'une origine infectieuse ou bactérienne.
- La vaccination est rarement utilisée.

## 7.3. Etude microscopique et le test ELISA

### 7.3.1. Introduction

Le genre *Cryptosporidium* est une des causes majeures de diarrhée néonatale chez le veau non sevré. Il est également très souvent isolé chez les bovins de tout âge sans signes cliniques apparents, à l'occasion de portage asymptomatique. Par ailleurs, les bovins à différents groupes d'âge sont généralement infectés par les différentes espèces de *Cryptosporidium* (Figure 2-6, page 41). De plus, il a été signalé que l'excrétion fécale de *Cryptosporidium sp* chez la vache porteuse asymptomatiquement est plus importante lors du stress associé au vêlage, augmentant davantage l'exposition du nouveau-né. Généralement, la diarrhée à *Cryptosporidium sp* apparaît le plus souvent entre 5 et 10 jours d'âge, lors de forte pression parasitaire.

À partir des données récoltées de la bibliographie, de l'enquête réalisée auprès des vétérinaires praticiens et en partant de ces orientations un deuxième objectif est de déterminer la prévalence de *Cryptosporidium sp* dans les différents élevages bovins situés au Centre, Ouest et Est de l'Algérie en utilisant la technique de référence, la coloration de Ziehl Neelson modifiée, le test ELISA pour le diagnostic antigénique de *Cryptosporidium*.

L'association de techniques microscopiques conventionnelles et la technique ELISA à l'aide d'un test disponible dans le commerce, basé sur un test ELISA en sandwich à deux sites (BIO K 346 ELISA, Bio-X Diagnostics), Rochefort, Belgique) sont réalisées au laboratoire de Biotechnologie de l'Institut vétérinaire de Blida 1 ayant pour objectif la mise en évidence du *Cryptosporidium sp* dans les matières fécales de consistance diarrhéique et non diarrhéique.

### 7.3.2. Matériel & Méthodes

#### 7.3.2.1. Matériel

##### A1. Echantillonnage

Un total de 10 fermes de type allaitant (avec un nombre d'animaux qui varie de 16 à 273 animaux), âgés de deux (02) jours à 5 ans appartenant à des éleveurs privés n'ayant pas fait l'objet d'une étude antérieure.

Les fermes sont situées dans les wilayas de Aïn Defla, Blida, Sétif et Tizi Ouzou réparties géographiquement en 3 régions (3 zones) : la région 1 représente le nord-ouest de l'Algérie (n=1); la région 2, le centre-nord de l'Algérie (n=2); et la région 3, le nord-est de l'Algérie (n=7) (Figure 7.11).

Un total de 460 bovins choisis au hasard a été prélevé une seule fois durant la période allant de l'année 2015 à l'année 2016, avec un état d'hygiène de la litière dans les quatre fermes allant de mauvais (paille humide) à moyen (paille sèche grâce à un renouvellement quotidien de celle-ci).

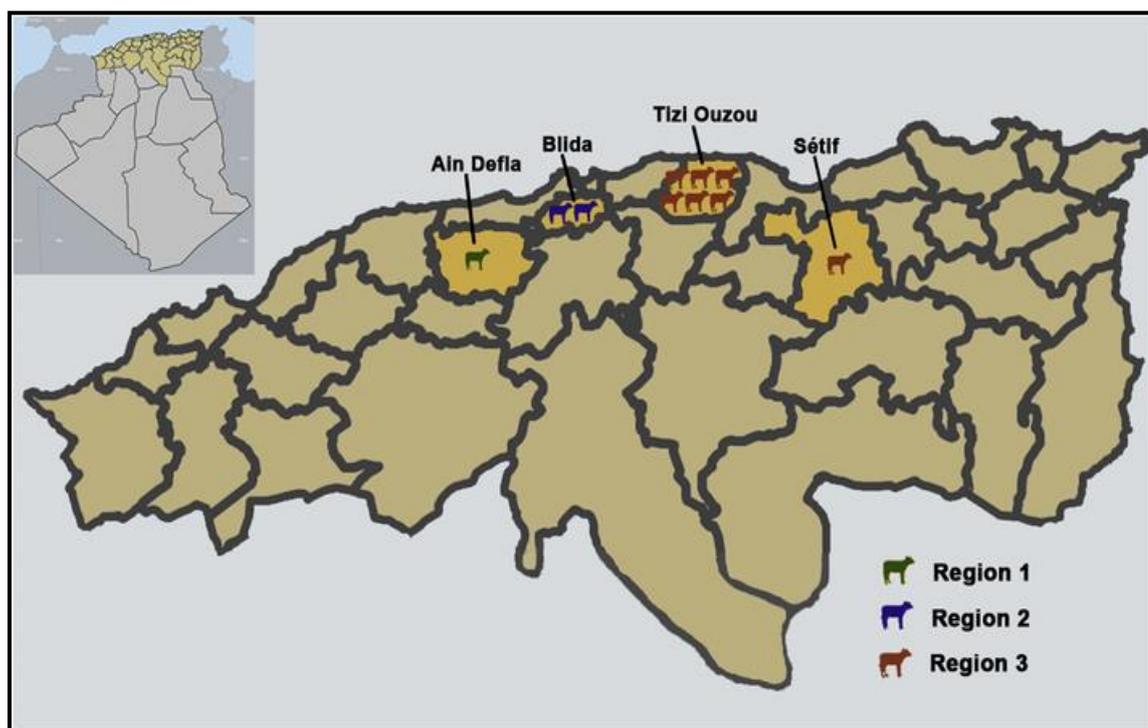


Figure 7.11 : Carte montrant la situation et la répartition géographique des exploitations laitières suivies dans le cadre de la présente enquête : La carte des frontières de l'Unité administrative des données saisies pour l'Algérie a été téléchargée du Centre de données et d'applications socio-économiques de la NASA (SEDAC) : <http://sedac.ciesin.columbia.edu/data/collection/groads/maps/gallery/search/>. (Consulté le 21 Mai 2017).

## A2. Technique de prélèvement

Les prélèvements sont récupérés par stimulation de l'orifice anal de chaque animal (main munie de gants en latex), environ 5 g de matières fécales sont placés dans des flacons propres bien fermés. Les flacons ont été étiquetés avec un numéro d'identification et accompagnés d'un formulaire indiquant la date de prélèvement, la ferme d'origine, le sexe, l'âge et la race de l'animal. Les informations concernant le logement des animaux, la gestion et le type d'alimentation ont également été recueillies et soigneusement notées. Les échantillons ont été expédiés au laboratoire de Biotechnologie de l'Institut vétérinaire de Blida<sup>1</sup>, dans une glacière et traités dans les 24 heures suivant le prélèvement pour une analyse microscopique ensuite les échantillons testés positifs ont été conservés dans du bichromate de potassium à 2.5 % et conservés à 4°C pour le test immuno-enzymatique de Co-antigène lié à l'enzyme (CpAg-ELISA).

## A3. Matériel et réactifs de laboratoire

Le matériel et réactifs utilisés pour la technique d'enrichissement de Ritchie :

- Verres à pied conique,
- Agitateur en verre,
- Lames porte-objet, lamelles 22 x 22 mm,
- Portoires, balance électrique, pissette, pipette Pasteur,
- Tubes coniques en verre avec bouchon en caoutchouc,
- Centrifugeuse et microscope optique.

Les réactifs sont :

- Formole à 10% (100 ml de formol pur dans 900 ml d'eau distillée)
- Ether diéthylique.

Le matériel et réactifs utilisés pour la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz :

Composé de lames bien dégraissées avec un mélange alcool-éther, bacs à coloration, pinces, minuterie et microscope optique. Les réactifs sont :

- Le méthanol pur,

- La fuchsine phéniquée de Ziehl modifiée, préparée au laboratoire, composée de
  - Solution A 10 ml (15 g de fuchsine basique + 100 ml d'éthanol à 95%)
  - Solution B 90 ml (5 g de phénol + 100 ml d'eau distillée). Le mélange est laissé à reposer et filtré avant emploi.
- Acide sulfurique à 2%, préparé au laboratoire à l'aide de 4 ml d'acide sulfurique concentré dans 196 ml d'eau distillée. L'acide est versé goutte à goutte dans l'eau
- Vert de malachite à 5%, préparé avec 5 g de poudre de vert de malachite dans 100 ml d'eau distillée, laissé reposer et filtré avant l'emploi.

Autres matériels :

- Flacons de prélèvements
- Glacière pour l'acheminement des prélèvements fécaux vers le laboratoire,
- Étiquettes pour inscrire les renseignements, Gants.

#### 7.3.2.2. Méthodes

##### A1. Technique de concentration de Ritchie simplifiée par Allen et Ridney (1970).

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

C'est une technique ayant pour but de réunir dans un faible volume ; des parasites dispersés dans une masse de selle.

Mode opératoire : (Appendice E)

- 1-Déposer 3 à 5 g de selles dans un verre à pied conique
- 2-Verser dans le verre un volume de formol à 10 % 2 à 3 fois supérieur à celui des selles.
- 3-Délayer progressivement à l'aide d'un agitateur en verre jusqu'à obtention d'une dilution homogène.
- 4-Laisser décanter 1 à 2 minutes pour éliminer les gros débris fécaux
- 5-Verser le surnageant dans 2 tubes coniques de 15 ml (chance de trouver des parasites).

6-Ajouter de l'éther : le 1/3 du volume décanté.

7-Laisser environ 1 cm de l'ouverture du tube qui permet l'émulsion de matières fécales pendant l'agitation.

8-Fermer le tube et agiter énergiquement de façon à obtenir un liquide homogène.

9-Centrifuger pendant 5 mn à 2500 tours /minute

10-Après centrifugation le contenu du tube se répartit en 4 couches qui sont de haut en bas :

-Une couche d'éther de couleur jaune chargée en graisse

-Une couche épaisse sous forme d'anneau constitué de gros débris

-Une couche aqueuse

-Un culot dans lequel sont concentrés les éléments parasitaires

11-Jeter énergiquement le surnageant constitué par les 3 couches et garder le Culot

#### Confection du frottis fécal :

Le frottis doit être mince et adhérent à la lame. Ce frottis est réalisé à partir du culot de centrifugation de la méthode de Ritchie simplifiée déjà décrite. À 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 diamant, 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. L'étaler ensuite sur toute la surface de la lame, d'une manière continue en zigzag, sans revenir au point de départ. On obtient alors un frottis mince avec plusieurs épaisseurs, c'est le cas d'un bon frottis. Laisser sécher à l'air.

#### Fixation du frottis :

Les frottis fécal est fixé au méthanol pendant 5 minutes et laissé sécher à l'air ou par agitation.

## A2. Technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (Appendice E)

A ce jour, c'est la technique de coloration de référence utilisée pour l'identification spécifique des cryptosporidies (CDC, 2013).

Mode opératoire :

- Colorer dans une solution de Fuschine phéniquée pendant 60 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet
- Différencier avec une solution d'acide sulfurique à 2% pendant 20 secondes, pour décolorer et éliminer les débris et les autres microorganismes
- Rincer à l'eau du robinet
- Contre-colorer avec une solution de vert de malachite à 5% pendant 5 minutes.  
Tout est coloré en vert sauf les cryptosporidies qui gardent la coloration rouge
- Rincer à l'eau du robinet
- Laisser sécher à l'air.

La lecture se fait au microscope optique aux objectifs 40 et 100 à immersion.

Cette technique permet de visualiser nettement les oocystes de *Cryptosporidium*, qui sont colorés en rouge vif, parfois en rose sur un fond vert ( figure 7.12)

Les oocystes sont des éléments ronds à ovoïdes, de 4-6  $\mu\text{m}$  de diamètre en moyenne, à paroi épaisse. Dans le cytoplasme, il y a une zone centrale ou latérale plus claire, non colorée, qui correspond au corps résiduel (reliquat oocystal), et en périphérie ou au centre, des granulations noirâtres au nombre de quatre, qui correspondent aux sporozoïtes.

NB : la lecture doit être faite sur toute la surface de la lame, de haut en bas et de gauche à droite.

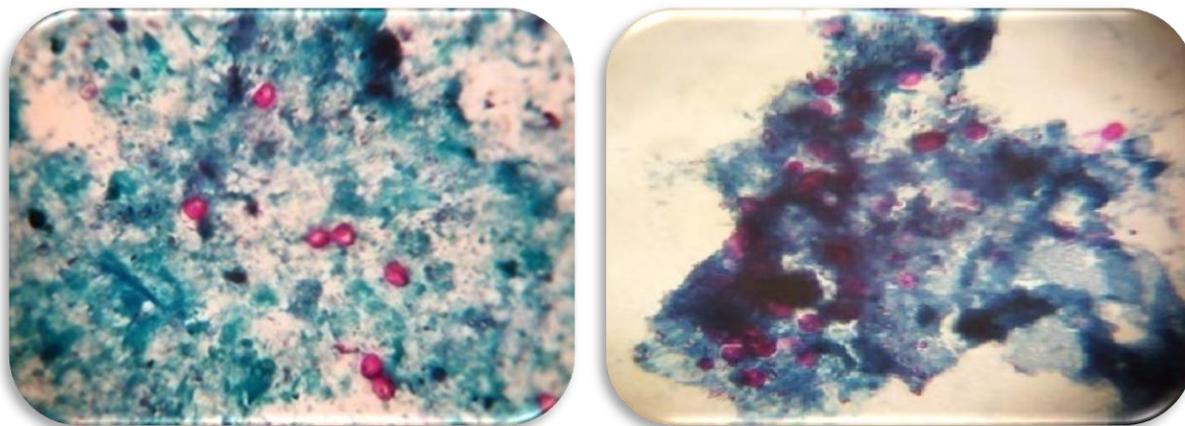


Figure 7.12 : *Cryptosporidium* après coloration de Ziehl Neelsen modifiée (photo personnelle)

### A3. Méthode immunologique (Test immuno-enzymatique de Co-antigène lié à l'enzyme (CpAg-ELISA))

La technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immuno-enzymatique de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

#### Principe du test :

Les lignes A, C, E, G de microplaques à 96 puits ont été sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique des oocystes de *Cryptosporidium*. Cet anticorps assure la capture du protozoaire à partir de l'échantillon dans lequel il se trouve (matières fécales)

Les lignes B, D, F, H, ont été sensibilisées avec un anticorps monoclonal non spécifique du protozoaire. On dispose d'un témoin négatif véritable qui permet de déterminer ce qui a été fixé de façon spécifique sur la microplaque.

L'utilisation d'un tel témoin permet de limiter dans des proportions importantes le nombre d'échantillons faussement positifs.

### Mode opératoire (Appendice F)

- 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) si la consistance de l'échantillon rend l'homogénéisation difficile, on peut ajouter dans le récipient des billes de verre et déliter la selle en agitant vigoureusement l'ensemble. Ne pas centrifuger
- 4-Distribuer les échantillons dilués à raison de 100 µl par puits en respectant la disposition suivante : Echantillon 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-Incuber la plaque à 21°C +/- 3°C durant 1 heure. Utiliser un couvercle
- 6-Rincer la plaque à l'aide de la solution de lavage préparée selon les modalités définies (composition de la trousse). Pour ce faire, éliminer le contenu de la microplaque en la retournant brutalement au-dessus d'un évier. Tapoter la microplaque à l'envers sur une feuille de papier absorbant propre de manière à bien éliminer tout le liquide. À l'aide d'une pissette ou par immersion dans un récipient de dimension adéquate, remplir les cupules utilisées avec la solution de lavage puis vider à nouveau la plaque par retournement au-dessus d'un évier. 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. Incuber 1 heure à 21°C +/- 3°C utiliser un couvercle
- 8-Laver la plaque comme décrit au point 6
- 9-Distribuer le révélateur sur la microplaque à raison de 100 µl par puits. La solution de révélateur doit être parfaitement incolore lors de la distribution sur la microplaque. Si une coloration bleue devait être visible, cela indiquerait une contamination de la solution ou de la pipette. 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 une longueur d'onde de 450 nm microplaques à 96 puits (Dialab, Neudorf, Autriche).

Les résultats doivent être enregistrés le plus rapidement possible après l'application de la solution d'arrêt. En effet, en cas de signal élevé c'est-à-dire après avoir arrêté la réaction avec la solution d'arrêt, il est obligatoire de lire la plaque au spectrophotomètre. En effet lorsque l'antigène est présent en très grande quantité et que le signal optique est très fort, par exemple supérieur à 2.000, le chromogène peut précipiter et le liquide devient blanc transparent avec un dépôt noir dans le fond, si on laisse la plaque ELISA trop longtemps sur le plan de travail avant de la lire, le chromogène peut cristalliser et conduire à des mesures erronées.

Ce kit a, selon le fabricant, une spécificité et une sensibilité de diagnostic de 90,9% et 97,1%, respectivement.

#### Interprétation des résultats :

Il faut soustraire de chaque valeur enregistrée sur les lignes impaires (A, C, E, G) le signal des puits témoins négatifs correspondantes (B, D, F, H) et noter le résultat obtenu (calcul des delta D.O). Pour effectuer ce calcul, tenir compte de l'existence éventuelle de valeurs négatives. Procéder de même pour le contrôle positif. Le test ne peut être validé que si la référence positive fournit une différence de densité optique en dix (10) minutes supérieure à la valeur indiquée sur le contrôle de qualité.

Diviser chaque valeur obtenue par la valeur correspondante obtenue avec le contrôle positif et multiplier ce résultat par 100 pour l'exprimer sous la forme d'un pourcentage.

$$\text{Valeur} = \frac{\text{Delta DO échantillon}}{\text{Delta DO échantillon positif}} \times 100$$

Validation : Crypto > 1.311

Positive > 7.00%

### 7.3.2.3. Analyses des données

Le test du Chi deux a été utilisé pour comparer les taux d'infection à *Cryptosporidium* dans les troupeaux étudiés par groupe d'âge et par ferme d'origine. Le même test a également été utilisé pour déterminer la fréquence des diarrhées associées au *Cryptosporidium* selon le groupe d'âge des bovins. Une valeur de probabilité  $P < 0,05$  était considérée comme une preuve de signification statistique.

### 7.3.2.4. Résultats

#### 7.3.2.4.1. Prévalence de *Cryptosporidium sp.* par microscopie

Sur un total de 460 prélèvements testés par la méthode de Ziehl Neelsen modifiée, 240 prélèvements se sont révélés positifs, ce qui correspond à un taux de 52.2 %.

La prévalence de la cryptosporidiose bovine dans les trois régions étudiées a été estimée à 52,2% (intervalle de confiance à 95%: 47,6-56,7%) par microscopie, les oocystes de *Cryptosporidium* ont été identifiés dans 240 prélèvements parmi les 460 échantillons fécaux analysés (240/460) (tableau 7.1).

Tableau 7.1 : Prévalence de *Cryptosporidium sp.* par microscopie

Zone	Nombre de vache	Nombre de bovins prélevés	ZNM positif	Taux
Blida	77	70	64	91 %
Ain Defla	273	120	60	50 %
Sétif	16	16	16	100 %
Tizi Ouzou	320	254	100	39.4 %
Total	686	460	240	52.2 %

Le parasite était présent dans les 4 fermes étudiées, ce qui correspond à un taux de 67,1 % (460/686) des bovins présents au moment de l'étude qui ont été prélevés et leurs matières fécales analysées. Des variations considérables dans la prévalence, allant de 39.4 % à 100 %, ont été observées dans les fermes étudiées. Les exploitations situées dans le Centre de l'Algérie ont enregistré la présence du parasite dans les échantillons fécaux des bovins significativement plus élevés que dans le Nord (KHi2 =33,5; P<. 00001) et l'Est du pays (KHi2 = 52,5; P<. 00001).

#### 7.3.2.4.2. Prévalence de *Cryptosporidium* par la technique ELISA

Sur les 240 échantillons diarrhéiques et non diarrhéiques testés positivement par la méthode de Ziehl Neelsen modifiée, ont été analysés par le test ELISA, 38 échantillons étaient positifs avec un taux de 15.83% avec une variation dans les différents élevages Blida 4.69% (3/61), Ain Defla 5% (3/57), Tizi Ouzou 25 % (25/75) et Sétif 43.75% (7/9) (tableau 7. 2).

Tableau 7. 2 : Prévalence de *Cryptosporidium* par la technique ELISA

Zone	NP (ZNM+)	ED	END	ELISA -	ELISA +	%
Blida	64	16	48	61	3	4.69
Ain Defla	60	06	54	57	3	5
Sétif	16	07	09	9	7	43.75
Tizi Ouzou	100	45	55	75	25	25
Total	240	74	166	202	38	15.83

NP (ZNM +) : nombre de prélèvements révélés positifs par la technique de Ziehl Neelson modifiée,

ED : échantillons diarrhéiques,

END : échantillons non diarrhéiques

### 7.3.2.4.3. Distribution selon la consistance et l'âge

La tranche d'âge la plus touchée se situe entre 2 -15 jours pour les échantillons diarrhéiques ce qui correspond à un taux de 47.91% avec une différence très significative ( $\chi^2 = 67,62$  et  $p < 0,01$ ) par contre, les animaux âgés de plus de 30 jours présentent plutôt des échantillons non diarrhéiques avec un taux de 72.9% (tableau 7.3 ; figure 7.13).

Tableau 7. 3 : Distribution selon la consistance et l'âge

Age des animaux	Echantillons diarrhéiques (ED)		Echantillons non diarrhéiques (END)	
2 - 15 jours	46	47.91%	17	11.8%
16 – 30 jours	31	32.29%	22	15.2%
> 30 jours	19	19.8%	105	72.9%
Total	96	100 %	144	100%

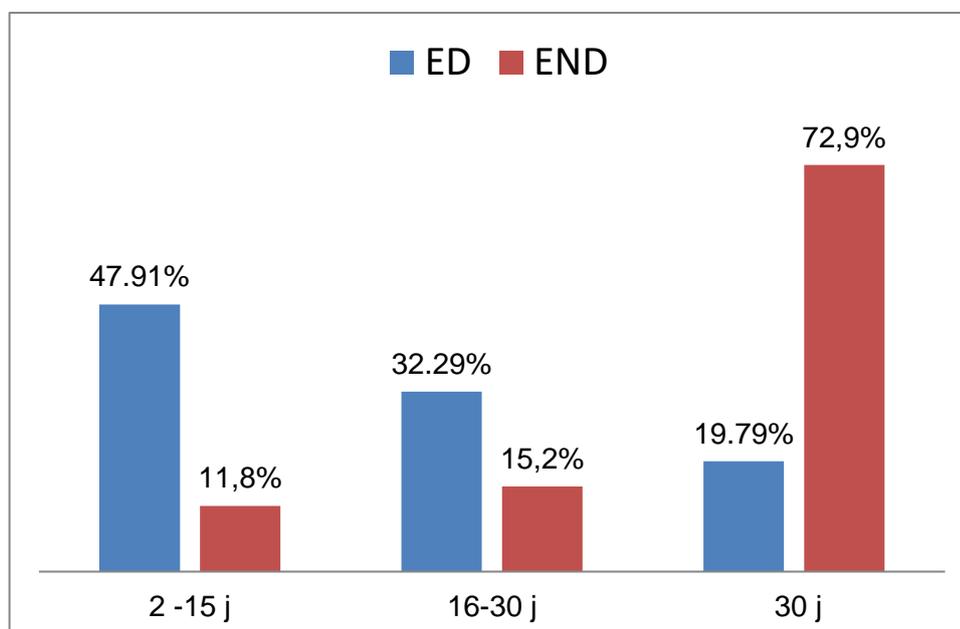


Figure 7.13: Fréquence de la distribution selon la consistance et l'âge

#### 7.3.2.4.4. Résultats du test ELISA en fonction de la consistance

Une prévalence élevée de 31,25 % hautement significative ( $\chi^2 = 28,53$  et  $p < 0,01$ ) de la présence des cryptosporidies dans les matières fécales de nature diarrhéique diagnostiqués par ELISA. La sensibilité de l'ELISA est plus élevée que celle de la technique de coloration (ZNM) pour la détection de *Cryptosporidium* dans les matières fécales bovines (tableau 7. 4, figure 7.14)

Tableau 7. 4 : Résultats du test ELISA en fonction de la consistance

Technique	Echantillons diarrhéiques		Echantillons non diarrhéiques	
ELISA +	30	31.25%	8	5.55%
ELISA -	66	68.75%	136	94.45%
Total	96	100%	144	100%

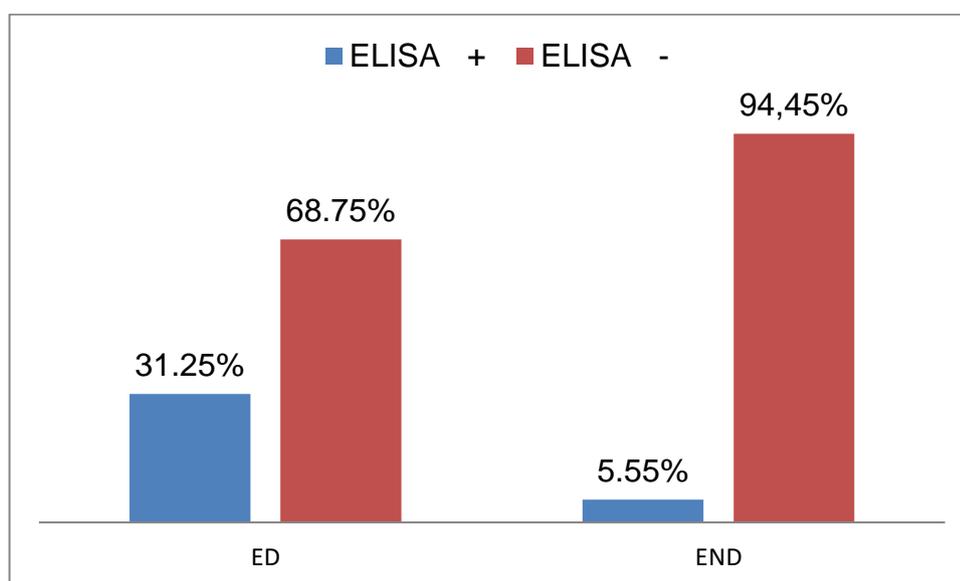


Figure 7. 14 : Prévalence du parasite selon test ELISA et Consistance

### 7.3.2.4.5. Résultats du test ELISA et la saison

Le tableau 7-5 montre que la saison la plus touchée est l'hiver pour les sujets qui présentent des échantillons diarrhéiques et non diarrhéiques et l'automne pour les animaux présentant des échantillons non diarrhéiques (tableau 7.5, figure 7.15) sachant que l'analyse statistique n'a révélée aucune différence significative ( $\chi^2=0,81$   $p=0,36>0,05$ )

Tableau 7. 5 : Résultats du test ELISA et Saison

Saison	ELISA +		ELISA -	
Automne	12	31.58%	79	39.2%
Hiver	25	65.78%	147	57.91%
Eté	0	0%	4	1.9%
Printemps	1	2.64%	2	0.99%
Total	38	100%	202	100 %

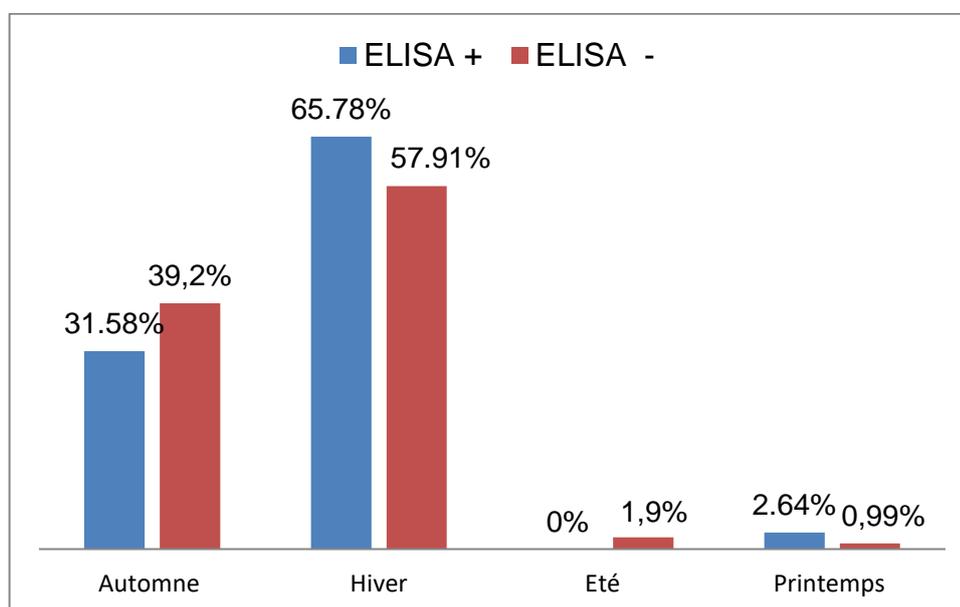


Figure 7.15 : Fréquence entre ELISA et Saison

#### 7.3.2.4.6. Résultats positif du test ELISA en fonction du Sexe :

Nos résultats montrent que le sexe male est plus touché que le sexe femelle (tableau 7.6, figure 7.16). L'analyse révèle une différence significative avec un  $KHI_2 = 9,68$  et  $P < 0,01$ .

Tableau 7. 6 : Résultats du test ELISA et le sexe

Sexe des animaux	ELISA +		ELISA -	
Male	27	71.06%	88	43.57%
Femelle	11	28.94%	114	56.43%
Total	38	100 %	202	100 %

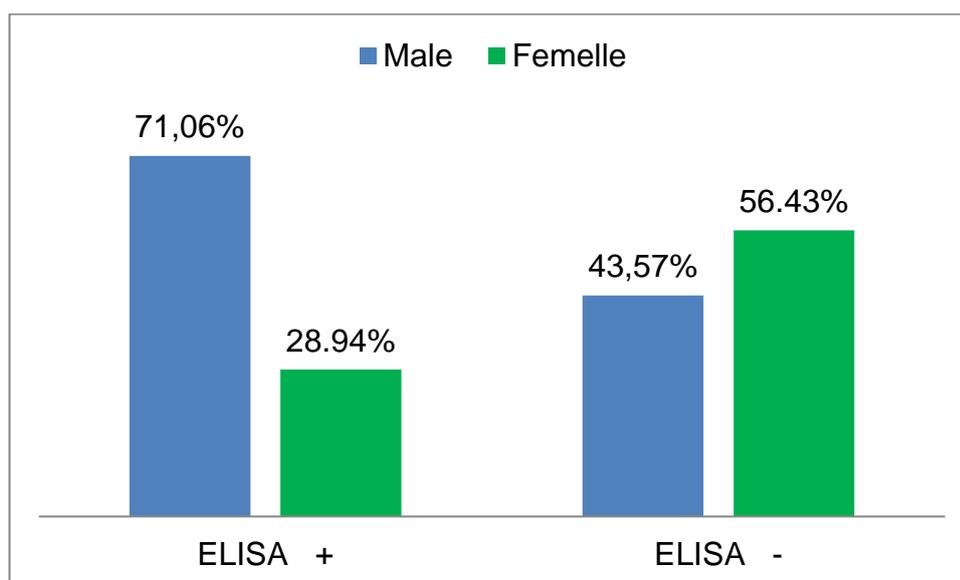


Figure 7.16 : Comparaison entre ELISA et Sexe

#### 7.3.2.4.7. Corrélation entre consistance, ELISA négatif et Age :

Une différence significative ( $\chi^2 = 51,35$   $P < 0,01$ ) a été observée pour les échantillons non diarrhéiques avec un test ELISA négatif pour la tranche d'âge allant de 2 à 15 jours, par ailleurs un taux de 45.45% a été signalé pour les échantillons diarrhéiques pour la même tranche d'âge. (tableau 7.7, figure 7.17)

Tableau 7.7 : Corrélation entre Consistance , ELISA négatif et Age

Age des animaux	Echantillons diarrhéiques		Echantillons non diarrhéiques	
	ELISA -		ELISA -	
2 - 15j	30	45.45%	14	10.29%
16 - 30	20	30.3%	19	13.98%
>30 j	16	24.25%	103	75.73%
Total	66	100 %	136	100 %

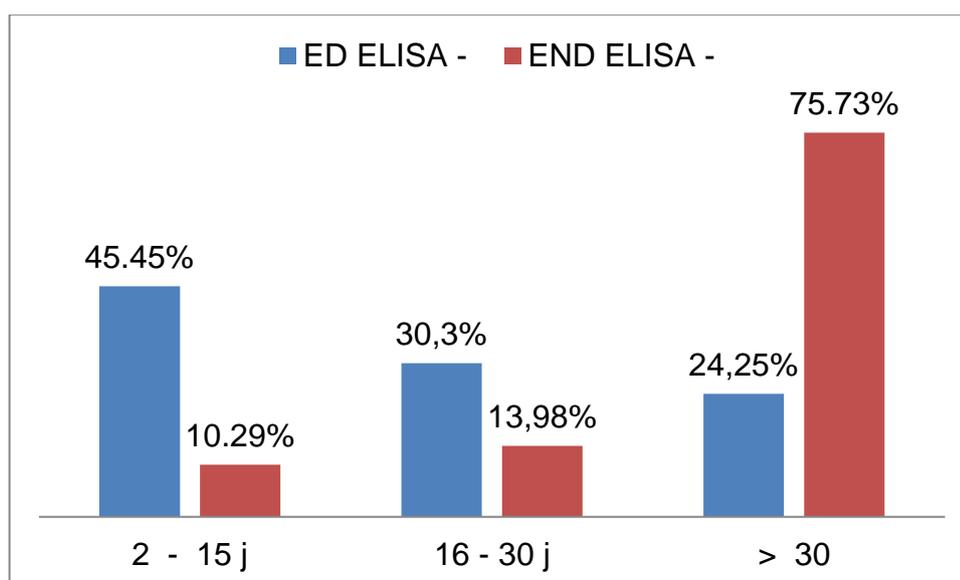


Figure 7.17 : Corrélation entre ELISA négatif, ED et END et l'âge

7.3.2.4.8. Corrélation entre échantillons diarrhéiques, ELISA positifs & ELISA négatif.

Aucune différence significative n'a été constaté ( $\chi^2=0,51$   $P=0,47 >0,05$ ) pour les échantillons diarrhéiques avec ELISA positif et négatif pour les tranches d'âge de 2 à 15 jours et 16 à 30 jours (tableau 7. 8, figure 7.18)

Tableau 7. 8 : Corrélation entre échantillons diarrhéiques, ELISA positifs & ELISA négatif.

Age	Echantillons diarrhéiques		Echantillons diarrhéiques	
	ELISA +		ELISA -	
2 - 15j	16	53.37%	30	45.45%
16 - 30	11	36.63%	20	30.3%
>30 j	3	10%	16	24.25%
Total	30	100 %	66	100 %

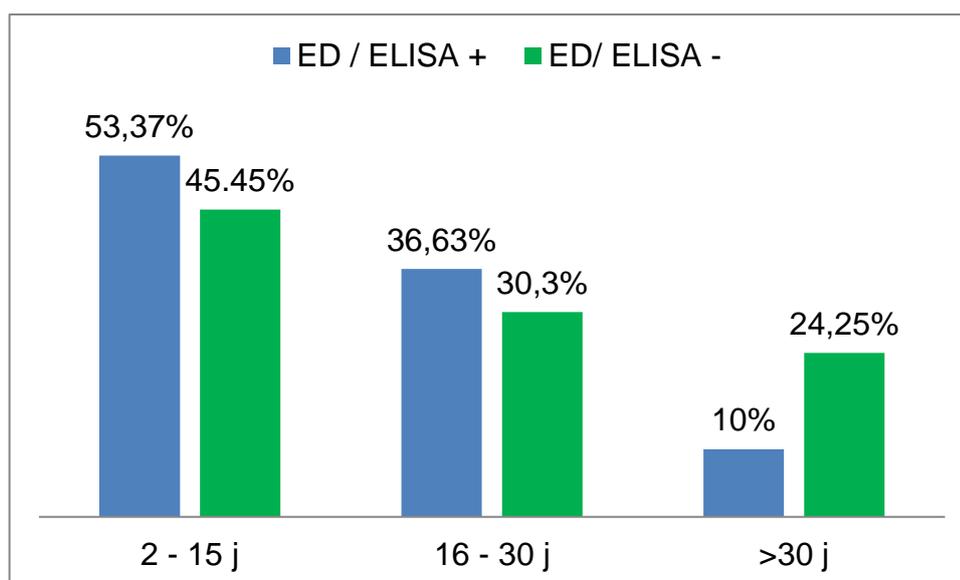


Figure 7.18 : Corrélation entre échantillons diarrhéique & ELISA positif & ELISA négatif & l'âge

#### 7.3.2.4.9. Corrélation entre l'âge et la consistance dans les régions d'étude

Sur un effectif de 240 prélèvements fécaux, 74 échantillons étaient de nature diarrhéique dont 30 échantillons se sont révélés positifs par le test ELISA, ce qui correspond à un taux de 40.5 % et 166 échantillons fécaux étaient de nature non diarrhéique dont 8 échantillons se sont révélés positifs par la technique ELISA qui correspond à un taux de 4.8 %.

Par ailleurs, le *Cryptosporidium* a été retrouvé dans toutes les tranches d'âge ce qui correspond à un taux de 26,3 % ont été détectés chez les veaux âgés de 2 à 15 jours, un taux de 22,1 % chez les veaux âgés de 16 à 30 jours, et un taux de 37,1 % chez les sujets âgés plus d'un (1) mois à 12 mois et un taux de 14,5 % chez les bovins âgés de plus de 12 mois.

En ce qui concerne la présence de symptômes cliniques, 30,8 % (74/240) des animaux atteints de cryptosporidiose présentaient une diarrhée, les 69,2 % restants (166/240) présentant des infections subcliniques (échantillons non diarrhéiques) (tableau 7. 9).

Tableau 7-9 : Corrélation entre l'âge et la consistance dans les régions d'étude

Age (jours)	Nombre échantillons	Echantillons diarrhéiques			Echantillons non diarrhéiques		
		NP	ELISA +	%	NP	ELISA +	%
2-15 j	63	52	16	30.8	11	3	27.3
16-30 j	53	16	11	68.7	37	3	8.1
> 30 j	124	6	3	50.0	118	2	1.7
Total	240	74	30	40.5	166	8	4.8

### 7.3.2.5. Discussion

Les diarrhées néonatales ont été une préoccupation pour les éleveurs et les chercheurs durant ces dernières années. En outre, la diarrhée chez le veau a une étiologie multifactorielle (virus, bactéries et parasites) ; selon Bendali et al [2] ; et Lorenz [216] les facteurs de gestion (hygiène, alimentation et logement des veaux) jouent un rôle très important.

Compte tenu de cette situation, la présence de la maladie "la cryptosporidiose" et l'identification précise des espèces de cryptosporidiose au niveau du troupeau est importante non seulement pour adopter un traitement adéquat et des mesures préventives pour réduire la charge de *Cryptosporidium* dans les fermes, mais aussi pour minimiser le risque zoonotique rapporté en 2015 par Kinross et al. [217] et en 2016 par Suler et al. [218]

À la lumière de ces données, l'objectif de notre étude était de déterminer la prévalence de la cryptosporidiose dans les matières fécales de bovins dans des fermes de type allaitant situés dans des régions du nord de l'Algérie.

À l'issue des résultats obtenus lors de notre étude, il ressort que le *Cryptosporidium* considéré comme un germe ubiquiste possède une distribution mondiale [219] a été retrouvé dans les matières fécales prélevés des animaux appartenant aux 10 élevages de type allaitant, dont l'âge varie de 2 jours à 5 ans. Il est à signaler que durant notre étude, le veau reste avec la mère les premiers jours de sa naissance ce qui peut provoquer la contamination du jeune veau.

#### 1. Microscopie

Un total de 460 échantillons fécaux prélevés, testés par la méthode de Ziehl Neelson modifiée, la méthode de référence, 240 échantillons se sont révélés positifs, d'où une prévalence de la cryptosporidiose bovine dans les trois régions étudiées estimée à 52,2%.

Sur un total de 240 échantillons fécaux, 74 prélèvement de nature diarrhéique correspond à un taux de 30.8 % et 166 de nature non diarrhéique correspond à 69.2 %.

Nos résultats sont supérieurs à ceux rapportés par Bartels [220] ; Akam et al [221] ; Singh [222] ; Lise et al [223] ; Baroudi [224] ; Amedeo [225] pour les échantillons non diarrhéiques avec des taux de 57,1% ; 22,83% ; 25,68% ; 23,5% ; 36,01% et 18 % respectivement, par contre, pour les échantillons diarrhéiques retrouvés dans nos résultats sont inférieurs à ceux cités par Bartels [220] ; Akam et al [221] ; Singh [222] ; Lise et al [223] ; Baroudi [224] ; Otto et al [226] ; Amedeo [225] et Castro-Hermida A. [142] avec des taux de 42,9% ; 44,43% ; 50% ; 50,5% ; 63,73% ; 52,5% ; 47.7% et 39.1%, respectivement.

Il est à signaler que les travaux des auteurs cités ci-dessus ont été effectués sur des animaux appartenant à des élevages de type laitier où ces veaux sont élevés avec leur mère et la plupart du temps au pré, pendant huit à dix mois. ce qui explique nos résultats avec un taux de prévalence relativement bas sur les animaux diarrhéiques.

Durant notre étude, nous avons enregistré une prévalence dans les trois régions estimée à 52.2 % avec la présence de *Cryptosporidium* dans toutes les fermes étudiées, nos résultats sont supérieurs à ceux trouvés par Ouchene et al [227]; Hocine et al. [20] avec des taux de (15.78 à 42.22%) et 27.1 % respectivement, par contre, nos résultats sont inférieurs à ceux trouvés par Benhouda et al. [21] avec un taux de 84 %

En utilisant diverses méthodes de diagnostic, la cryptosporidiose bovine a également été observée, principalement chez les veaux, en Egypte par Helmy et al.[228] ; à Madagascar par Bodager et al [229] ; au Nigeria par Ayinmode et al.[230] ; en Tunisie par Soltane et al [231] avec des taux de 32% ; 29% ; 52% et 87% respectivement.

Bien que la prévalence dans le troupeau soit de 100%, l'infestation à *Cryptosporidium* était beaucoup plus importante dans les fermes situées dans le centre-nord de l'Algérie en corrélation avec les conditions d'hygiène qui sont défavorables dans ces fermes.

Dans l'ensemble, les résultats que nous avons obtenus montrent bien que la cryptosporidiose bovine est endémique dans cette région, avec des variations de prévalence reflétant probablement des différences dans les pratiques de gestion des troupeaux et des fermes.

Pour un certain nombre d'auteurs, le facteur âge paraît être déterminant dans l'apparition de la cryptosporidiose, en effet, Portejoie [232] ; Chermette et al [233] lors de leurs travaux ont noté que la sensibilité du veau est liée à l'immaturation du système immunitaire.

Nos résultats montrent que la tranche d'âge la plus touchée se situe entre 2 à 15 jours pour les échantillons diarrhéiques ce qui correspond à un taux de 47.91% par contre, les animaux âgés de plus de 30 jours présentent plutôt des échantillons non diarrhéiques avec un taux de 72.91% ce qui peut être expliqué par la résistance au parasite des veaux au-delà de 30 jours ce qui rejoint les travaux de Khelaf et al [234] qui ont expliqué que le veau est infesté par *Cryptosporidium parvum* dès la 1<sup>ère</sup> semaine de sa vie. Dans la 2<sup>ème</sup> semaine, les animaux montrent une plus grande réceptivité pour le parasite, par ailleurs, l'excrétion parasitaire se maintient pendant la troisième semaine donc les animaux appartenant à cette tranche d'âge semblent en même temps les plus réceptifs. À partir d'un mois d'âge, l'infestation est moins importante, mais les animaux restent porteurs et excréteurs. Khelaf et al [234].

En outre, nos travaux corroborent les travaux de Pavlasek et al [235] ; Ouchene et al [227]; Akam et al [236] où la tranche d'âge la plus sensible est située entre (1 -14 jours) ; (4 -15 jours) ; (8 – 14) jours respectivement.

Cette notion d'âge serait essentiellement liée à l'état immunitaire des jeunes ruminants dont le système immunitaire ne serait pas encore totalement mature pour lutter contre l'infestation (disparition des anticorps maternels alors que l'immunité propre du veau n'est pas encore protectrice). Les oocystes de *Cryptosporidium sp* massivement excrétés par les jeunes ruminants peuvent alors favoriser et l'infection des animaux du même environnement et l'infection des personnes soit par contact avec les animaux ou par consommation de l'eau ou des aliments contaminés par les oocystes excrétés par les animaux malades. Fayer et al.[141]; Geurden et al.[157] ; Chartier, [237].

## 2. Le test ELISA

Sur un total de 240 échantillons fécaux testés positivement par la microscopie et qui ont été analysés par le test ELISA, 38 échantillons fécaux se sont révélés positifs avec un taux de 15.83 %.

Un taux faible a été retrouvé durant notre étude par le test ELISA par rapport aux travaux effectués en 2007 par Geurden et al [157] ; en 2014 par Al-Robaiee et al [238].

Ce taux faible pourrait être expliqué par une faible charge parasitaire ou encore par la difficulté à homogénéiser des échantillons non diarrhéiques. Ce qui a été signalé en 2003 par Johnson et al, [239] ; en 2015 par Ezzaty et al en [240].

L'âge semble être un facteur de risque important dans la propagation de la cryptosporidiose chez les veaux, ce qui a été rapporté en 2002 par Causape et al ; [241] ; en 2005 par Ryan et al [80].

Durant notre étude, une prévalence élevée a été observée avec un taux de 31,25 % dans les matières fécales de consistance diarrhéique chez des veaux âgés de 2 jours jusqu'à 3 mois et un taux de 5.55% de consistance non diarrhéique chez deux bovins âgés de 8 mois et 18 mois.

Nos résultats rejoignent les travaux de Foster et Smith [45]; House et al [242]. ; Santin M. ;[13]. NACIRI *et al* [144]. Robertson *et al*, [10] qui trouvent que la cryptosporidiose clinique est observée chez les veaux âgés de 7 à 30 jours et se poursuit pendant 4 à 17 jours.

Le *Cryptosporidium* semble être une cause majeure de diarrhée chez les veaux âgés de moins de 3 mois ce qui a été rapporté par les auteurs suivants.

De Graaf et al.[137] ; Noordeen et al. [129]; Paraud et Chartier [95]; Robertson et al,[10] ; Thompson et al [243] ; Silverlas et Blanco-Penedo [244] ; Santin M [13].

Les veaux nouveau-nés sont très sensibles aux infections à *Cryptosporidium* en raison de leur système immunitaire immature, nos résultats rejoignent les constatations faites par Foster et Smith, [45]; Murakoshi et al.,[245]; Björkman et al [246].

La seule immunité des premiers jours de vie est apportée par le colostrum, cette protection qui va diminuer dès le 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> jour. L'immunité propre du veau croît doucement après la naissance mais ne peut réellement pallier la protection colostrale qu'après la deuxième semaine de vie entre 7 et 11-12 jours de vie, c'est une période à risque pour le jeune veau, c'est le « trou immunitaire » (Appendice G). Il ne faut donc surtout pas relâcher la pression sur l'hygiène environnementale du veau sous prétexte qu'il est un peu plus grand.

Dans la dynamique de contamination, le veau représente l'élément moteur le plus important, à la naissance, son tube digestif ne présente aucun germe. Il va se coloniser avec les germes présents dans son environnement et absorbés par voie orale. Ces germes se multiplient, pour occuper la totalité de l'intestin. Ils sont ensuite, en partie expulsés dans le milieu extérieur, dans les fèces. En cas de présence de germes pathogènes, ceux-ci suivent le même développement et donc se trouvent en plus grand nombre (les veaux nés les premiers donc plus âgés jouent le rôle multiplicateur pour les plus jeunes). (Appendice G)

Dans un autre contexte, la diarrhée est le symptôme le plus caractéristique de la cryptosporidiose, mais le mécanisme spécifique par lequel *Cryptosporidium* induit la diarrhée n'a pas été identifié. Des études précédentes ont postulé que *Cryptosporidium* produirait une entérotoxine responsable de la diarrhée sécrétoire profuse. Plusieurs observations soutiennent cette idée. La diminution du flux d'anions en présence d'inhibiteurs de cyclo-oxygénase a mené à l'hypothèse d'une activité potentielle entérotoxigène de *Cryptosporidium*. Celle-ci impliquerait la sécrétion des prostaglandines par les cellules épithéliales intestinales infectées Okhuysen & Chappell, [247]

Durant notre étude, il ressort que la saison la plus touchée est l'hiver pour les sujets qui présentent des échantillons diarrhéiques et non diarrhéiques et l'automne pour les animaux présentant des échantillons non diarrhéiques, diarrhéiques c'est la période où les veaux sont en contact étroit avec la source d'infection ou leur résistance est faible ce qui facilite la contagiosité.

Nos résultats concordent avec les travaux de Huentink et al [209], Morin R, [211] qui ont expliqué que les variations de la prévalence retrouvées au cours des saisons à la concentration des naissances ce qui favorise l'entretien du parasite. Pour Naciri et al. [210] ainsi que Morin R [211], les veaux qui naissent en premiers

provoquent l'augmentation de la contamination de l'environnement et les derniers veaux reçoivent une dose importante et manifestent une forme grave de la cryptosporidiose.

Plusieurs auteurs ont étudié le facteur sexe, les femelles sont plus résistantes aux diarrhées, ceci peut être expliqué par le fait que ces dernières semblent avoir des taux sériques d'immunoglobulines (reflétant une absorption accrue de colostrum) significativement plus élevés que chez les mâles. Ce résultat étant certainement influencé par une facilité du vêlage. Cependant, les veaux mâles, généralement plus gros au moment du vêlage, souffrent davantage à ce moment, et tardent à se lever et téter ce qui a été cité par Selles et Niar [206]; ce qui rejoint nos résultats qui ont trouvé que le sexe male est plus touché que le sexe femelle.

Durant notre étude, les conditions d'hygiène étaient mauvaises à moyenne, avec une litière humide à sèche, les animaux sont logés en collectivité sur la paille avec un sol en terre. Plusieurs auteurs ont discuté les mauvaises conditions d'hygiène qui jouent un rôle important dans la propagation de la cryptosporidiose et la pérennité du parasite, ce qui rejoint les travaux de Castro-Hermida, et al [143], qui ont expliqué que les mauvaises conditions d'hygiène augmentent significativement le risque de cryptosporidiose.

D'autres réservoirs importants de *Cryptosporidium* sont les rongeurs principalement ceux qui vivent à proximité des fermes.

C'est pourquoi leur proximité des fermes, le partage des sites avec le bétail et la contamination de l'eau potable augmentent le risque de transmission de l'infection à *Cryptosporidium* (oocystes), non seulement entre animaux mais aussi aux humains Li et al. [67].

Un autre facteur de risque à ne pas négliger c'est le transport des oocystes vers les eaux de surface qui peut se faire par dépôt de fumier directement dans l'eau ou par ruissellement de surface. Par conséquent, les humains, les espèces sauvages et domestiques peuvent tous contribuer à la contamination dans les systèmes d'eau Ryan et al. [69].

## 7.4. Diagnostic moléculaire

### 7.4.1. Introduction :

Dans notre étude, l'intérêt de l'utilisation des méthodes moléculaires (PCR nested) et séquençage de GP60) sont de choix. Bien qu'elles soient onéreuses, leur sensibilité de détection et d'un grand intérêt pouvant détecter l'ADN d'un seul oocyste dans l'échantillon à analyser.

Un total de 240 échantillons analysés par la technique ELISA, 38 se sont révélés positifs qui sont ensuite analysés par la méthode PCR.

### 7.4.2. Matériel & Méthodes

#### 1. Extraction et purification d'ADN

L'ADN total a été extrait de 200 mg de chaque échantillon fécal par digestion alcaline et extraction au phénol-chloroforme, après que l'échantillon soit purifié à l'aide d'un mini kit de selles (QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne)

Brièvement, 66.6µl) de 1M KOH et 18.6 µl de 1M dithiothreitol ont été ajoutés dans un tube de 1.5 ml contenant 100 à 200 µl échantillon fécal.

Les échantillons ont été incubés à 65°C pendant 15 minutes, neutralisés avec 8.6 µl d'acide chlorhydrique (HCl) concentration 25% et tamponnés avec 160 µl de 2M Tris-HCl (avec un PH : 8.3)

L'ADN a été extrait avec 250 µl de phenol-chloroforme-isoamyl alcool (Invitrogen, Carlsbad, CA) mélanger et centrifuger avec une centrifugeuse (IEC. Micromax à 3.330 pendant 5 minutes

Le surnageant a été prélevé dans un Eppendorf de 2 ml contenant 1 ml de tampon ASL du mini kit QIAamp DNA stool (QIAGEN), L'ADN a été purifié (200 µl) selon les instructions du fabricant et conservé à – 20°C C jusqu' à l'analyse par PCR.

## 2. Détection moléculaire, typage et sous-typage d'isolats de *Cryptosporidium* sp

Les échantillons fécaux qui se sont révélés positifs (présence de *Cryptosporidium*) par la technique ELISA ont ensuite été confirmés par un protocole PCR nichée ciblant un fragment de 480 pb du gène de la petite sous-unité ssu de l'Acide Ribonucléique ribosomal (ARNr) du parasite [248]

L'amplification du gène ARNr par la PCR a été effectuée dans 50 µl de mélange réactionnel contenant l'ADN de *Cryptosporidium*, 200 µM de chaque dNTP, 10mM de Tris-Hcl, Ph : 8.3, 50 mM KCl ; 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 Taq ADN polymerase (Promega) et 0.2 µM de chaque amorce

### Les amorces de la PCR

CR-P1 : 5'-CAGGGAGGTAGTGACAAGAA-3'

CR-P2 : 5'-TCAGCCTTGCGACCATACTC-3'

Les échantillons positifs par la technique ELISA ont été analysés par la PCR nichée ciblant un fragment de 480 pb (paire de base) du gène de la petite sous unité SSU ARNr du parasite.

Les réactions d'amplification (50µl) se composent de 3 µl d'un échantillon d'ADN , 0.3 µM de chaque amorce ( CR-P1/ CR-P2) dans la réaction primaire et CR-P3/ CPB-DIAGR dans la réaction secondaire, 2.5 unités de ADN polymerase (Bioline GmbH) et 10 µl de tampon de 1 Mg TAQ™ contenant 5 mM de dNTP et 15mM de MgCl<sub>2</sub>

Les amorces de la réaction secondaire :

CR-P3 : 5'-ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG-3'

CPB-DIAGR :5'-TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3'

Les deux réactions de PCR ont été réalisées comme suit :

- ✚ un cycle à 94°C pendant 3 minutes
- ✚ 35 cycles
  - 94°C pendant 40 secondes
  - 50°C pendant 40 secondes
  - 50°C pendant 40 secondes
- ✚ 72°C pendant 1 minute
- ✚ Se terminant par une extension finale de 72°C pendant 10 minutes

Les produits secondaires de la taille attendue ont été digérés avec *Vspl* et *Sspl* (New England Biolabs) à 37°C durant toute la nuit. Les produits sont séparés par électrophorèse, colorés par le bromure d'ethidium, et visualisés sous illumination Ultraviolet (transluminateur).

Les isolats de *Cryptosporidium* identifiés comme *Cryptosporidium parvum* au locus de SSU ARNr ont été ensuite analysés au niveau du gène codant pour la glycoprotéine 60Kda (GP60) afin de déterminer le sous-type du parasite par séquençage.

Un protocole PCR nichée a été utilisé pour amplifier un fragment partiel de 870 pb du marqueur gp60 [89]. Brièvement, 3 à 2µL de l'ADN modèle ont été amplifiés dans la première et la deuxième phase de la PCR, respectivement, en utilisant 0,3µM de chaque amorce (AL-3531/AL-3535 dans la réaction primaire et AL-3532/AL-3534 dans la réaction secondaire, respectivement).

Le milieu réactionnel d'amplification (50µL) contenaient également 2,5 unités de MyTAQ™ ADN polymérase (Bioline GmbH) et 10µL de MyTAQ™ Reaction Buffer composé de 5mM dNTPs et 15mM MgCl<sub>2</sub>.

AL-3531 :5'-ATAGTCTCCGCTGTATTC-3'

AL-3532 :5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3'

AL-3534 : 5'-GCAGAGGAACCAGCATC-3'

AL-3535 :5'-GGAAGGAACGATGTATCT-3'

Les conditions de cycle primaire étaient les suivantes : 5min à 94°C suivi de 35 cycles de 45s à 94°C, 45s à 59°C et 1min à 72°C, avec une extension finale de 72°C pendant 10min. La PCR secondaire était similaire à celle décrite pour l'étape de la PCR primaire, à l'exception de la température de recuit de 50°C.

Toutes les réactions PCR ont été réalisées sur un thermocycleur 2720 (Applied Biosystems, Californie, USA).

Des échantillons d'ADN positifs et négatifs confirmés au laboratoire ont été systématiquement utilisés comme témoins et inclus dans chaque cycle de PCR. Les amplicons PCR ont été visualisés sur des gels d'agarose D5 à 2% (Conda, Madrid, Espagne) colorés avec la solution colorante d'acide nucléique Pronasafe (Conda).

Les produits PCR positifs ont été séquencés directement dans les deux directions à l'aide de l'ensemble d'amorces internes décrit ci-dessus. Le séquençage de l'ADN a été effectué par électrophorèse capillaire à l'aide de la chimie du BigDye® Terminator (Applied Biosystems).

#### 7.4.3. Analyses de données

Les données brutes de séquençage dans les directions avant et arrière ont été visualisées à l'aide du programme d'analyse séquentielle Chromaslite version 2.1 (<http://chromaslite.software.informer.com/2.1/>).

L'outil BLAST ([http : ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) a été utilisé pour comparer les séquences de nucléotides avec les séquences extraites de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). [ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) a été utilisé pour comparer les séquences de nucléotides avec les séquences extraites de la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Les séquences consensuelles d'ADN générées ont été alignées sur les séquences de référence appropriées à l'aide du logiciel libre MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) pour identifier les sous-types d'espèces de *Cryptosporidium* (Tamura et al. 2013) [293].

Pour l'identification des inférences phylogénétiques parmi les échantillons positifs identifiés, un arbre phylogénétique a été déduit à l'aide de la méthode Neighbor-Joining de MEGA 6. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode de Kimura à 2 paramètres et modélisées avec une distribution gamma. La fiabilité des analyses phylogénétiques à chaque nœud de branche a été estimée par la méthode Bootstrap en utilisant 1000 répliques. Les séquences obtenues dans le cadre de cette étude ont été déposées auprès de GenBank sous les numéros d'accès MF150290 à MF150295.

#### 7.4.4. Résultats :

Sur un total de 38 échantillons de matières fécales testés positifs par la Ziehl Neelson modifiée et le test ELISA, 29 ont été testés positifs par PCR nichée, ce qui correspond à un taux de 76,3% ayant donné des amplicons de la taille attendue (480pb) de la petite sous unité SSU ARNr-PCR

Une révélation des produits PCR suite à l'amplification par la première PCR nichée au locus ssu ARNr des 38 isolats d'ADN *Cryptosporidium* (figure 7.19)

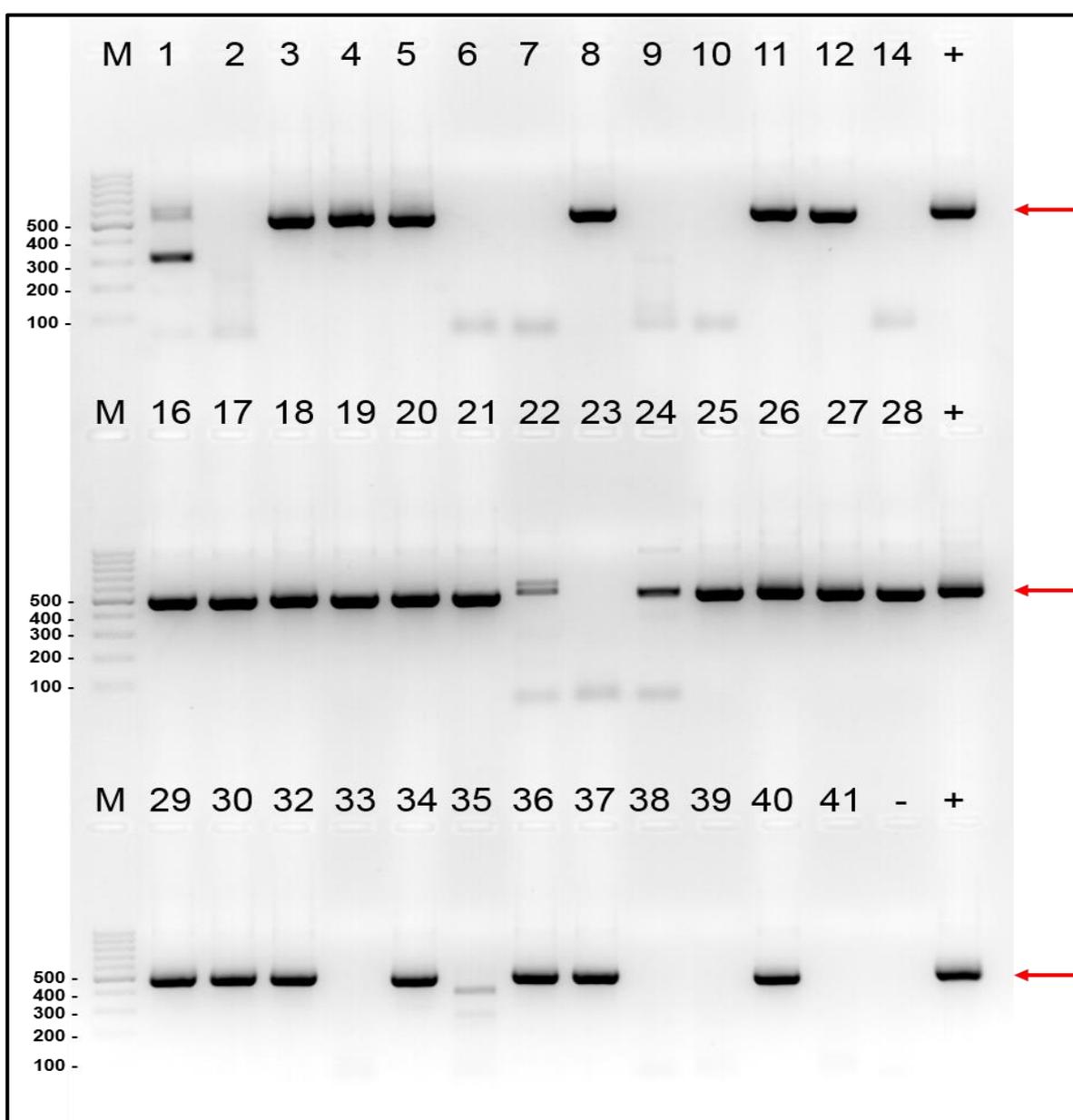


Figure 7.19 : Révélation des produits PCR suite à l'amplification par PCR

Les flèches rouges indiquent les produits d'amplification du fragment de 480 pb attendu (figure 7.19).

Ligne M = échelle de poids moléculaire de 100 pb;

Ligne - : contrôle négatif ; Ligne + : contrôle positif.

La révélation des produits PCR a montré par la 2<sup>ème</sup> PCR nichée du locus gp60 des 29 isolats d'ADN *Cryptosporidium* identifiés comme *Cryptosporidium parvum* confirmée par la première PCR pour préparer le séquençage

### 1. Analyse de séquençage :

Les analyses de séquençage ont permis d'identifier quatre espèces de *Cryptosporidium* présentes dans les échantillons fécaux des veaux étudiés, dont *C. parvum* avec un taux de 72,4% ( 1/29), *C. bovis* avec un taux de 13,8%, (4/29), *C. andersoni* avec un taux de 3,4%, (1/29), et *C. ryanae* avec un taux de 3,4% (1/29).

En outre, deux autres isolats *Cryptosporidium sp* avec un taux de 7,0 % ont été identifiés uniquement au niveau du genre en raison de la mauvaise qualité de la séquence (tableau 7.10).

Tableau 7.10 : Répartition des espèces et sous-génotypes de *Cryptosporidium*

(n=29) selon l'âge, la consistance des fèces

Age (jours)	Diarrhée	Isolats (n)	Espèces	Fréquence Relatives (%)	gp60sub-génotype(n)
2-15	Oui	10	<i>C.parvum</i>	90.9	IlaA16G2R1(10)
		1	<i>C.spp</i>	9.1	Inconnu
	Non	2	<i>C.parvum</i>	66.7	IlaA16G2R1(2)
		1	<i>C.ryanae</i>	33.3	-
16-30	Oui	7	<i>C.parvum</i>	87.5	IlaA16G2R1(7)
		1	<i>C.bovis</i>	12.5	-
	Non	2	<i>C.parvum</i>	66.7	Inconnu
		1	<i>C.bovis</i>	33.3	-
>30	Oui	2	<i>C.bovis</i>	66.7	-
		1	<i>C.spp</i>	33.3	-
	Non	1	<i>C.andersoni</i>	100	Inconnu

Dans la présente étude, les échantillons positifs par PCR sur SSU (SSU-PCR) ont été testés de nouveau par PCR sur GP60 (GP60-PCR), Le séquençage des amplicons GP60 obtenus a permis de déterminer le sous-génotype du parasite. Il est à noter que GP60-PCR est moins sensible que la petite sous unité SSU-PCR, il est à signaler aussi que GP60 est un gène à copie unique, alors que la petite sous unité SSU est un gène à copies multiples.

Nous tenons à préciser que les échantillons que nous appelons 'inconnus' (tableau 7.10), ceci est du à certains échantillons qui ont été testés positifs par la petite sous unité SSU-PCR soient négatifs par gp60-PCR.

Le sous-typage au niveau du locus GP60 n'est possible que pour un certain nombre d'espèces de *Cryptosporidium*, y compris *C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. ubiquitum* et *C. cuniculus*. Pour les espèces restantes de *Cryptosporidium*, cet outil de typage n'a pas encore été développé.

Dans la présente étude, la prévalence était beaucoup plus élevée chez les veaux âgés de moins de 30 jours. Par contre, une prévalence faible a été observée chez les animaux âgés de plus de 30 jours.

Nous avons enregistré que *Cryptosporidium parvum* a été identifié dans la majorité des échantillons testés positifs par la méthode de PCR avec un taux de 91 % dans des échantillons de nature diarrhéique et un taux de 68 %, dans des échantillons de consistance non diarrhéique chez des veaux âgés de 2 à 15 jours.

*Cryptosporidium parvum* a été identifié chez des veaux âgés de 16 à 30 jours dans des échantillons diarrhéiques et non diarrhéiques, aucune présence n'a été signalée concernant l'espèce *Cryptosporidium parvum* dans des échantillons appartenant à des veaux âgés de plus de 30 jours.

Une autre espèce *Cryptosporidium bovis* identifié chez des veaux âgés de 16 à 30 jours dans des échantillons diarrhéiques et non diarrhéiques, de même chez des veaux âgés plus de 30 jours dans des échantillons diarrhéiques.

L'espèce *Cryptosporidium ryanae* a été également identifiée dans un échantillon de consistance non diarrhéique chez un veau âgé de 12 jours.

Par ailleurs, *Cryptosporidium andersoni* a été trouvé dans un échantillon de consistance non diarrhéique chez une génisse âgée de 18 mois

Aucune différence apparente dans la répartition géographique des infections à *Cryptosporidium* n'a été observée. *C. parvum* et *C. bovis* a montré une répartition assez large, étant présent dans les trois régions de notre étude.

Les données de sous-génotypage des 27 séquences d'ARNr ssu attribuées sans ambiguïté à une espèce donnée de *Cryptosporidium* sont résumées au (tableau 7.11).

Tableau 7.11 : Diversité, fréquence et principales caractéristiques moléculaires des isolats de *Cryptosporidium* au locus ssu ARNr chez les bovins.

Espèces	Isolats (n)	Référence Séquence	Partie étirement	Polymorphismes d'un seul nucléotide	N° inscription GenBank
<i>C.andersoni</i>	1	AF093496	528–1021	633_634inrssT	MF150290
<i>C.bovis</i>	4	AY741305	311–770	Aucun	MF150291
<i>C.parvum</i>	21	AF112571	533–1030	A646G,T649G, 688-91deATTA, T693A	MF150292
<i>C.ryanae</i>	1	EU410344	314–771	Aucun	MF150293

Le seul isolat identifié comme étant *C. andersoni* contenait une insertion T entre les nucléotides 633 et 634 de la séquence de référence AF093496 dans un fragment de 494 pb (positions 528-1021).

Les quatre isolats de *C. bovis* ont montré une similitude de 100% avec un fragment de 460 pb (positions 311-770) de la séquence de référence AY741305

Il est intéressant de noter que les 21 séquences de *Cryptosporidium parvum* générées dans la présente étude étaient toutes identiques.

Les analyses d'alignement de séquence avec la séquence de référence AF112571 ont permis l'identification d'un fragment de 498 pb (positions 533-1030) avec un certain nombre de polymorphismes de nucléotides simples (SNP) incluant une délétion ATTA entre les nucléotides 688 et 691.

Enfin, le seul isolat attribué à *Cryptosporidium ryanae* était identique à un fragment de 458 pb (positions 314-771) de la séquence de référence EU410344.

Les recherches BLAST n'ont pas révélé la présence de nouvelles variantes génotypiques.

Les 21 isolats attribués à *Cryptosporidium parvum* au locus ssu ARNr ont ensuite été évalués au locus GP60 afin de déterminer le ou les sous-génotypes du parasite impliqué dans les infections.

Dans l'ensemble, des produits d'amplification de la taille attendue (~830 pb) ont été obtenus dans 38,1% (8/21) des isolats testés.

Les huit (8) séquences gp60 ont toutes été confirmées comme sous-génotype IIaA16G2R1.

Les sept (7) d'entre eux étaient identiques à la séquence GenBank KF128739 isolé chez un yak en Chine, alors que le dernier en diffère par un seul SNP (T à A) en position 377 de KF128739 et représente un variant génotypique non déclaré. Aucun site polymorphe (double pics) n'a été observé dans les séquences d'ARNr ssu ou de GP60 analysées.

### 7.5. La phylogénie moléculaire

Elle a pour but de reconstruire les relations de parenté entre des séquences de nucléotides ou d'acides aminés. La fiabilité des méthodes de reconstruction phylogénétique repose sur la compréhension des mécanismes d'évolution des séquences, un domaine qui a beaucoup progressé ces dernières années.

Pour construire une phylogénie, il faut disposer de caractères comparables entre tous les objets (c'est-à-dire gènes ou espèces) que l'on veut analyser. En d'autres termes, les objets analysés doivent être « suffisamment similaires » pour être comparés. Si c'est le cas, on dit de ces caractères qu'ils sont homologues c'est-à-dire qu'on formule l'hypothèse selon laquelle la similitude observée est due au fait que les caractères sont issus d'un ancêtre commun et qu'ils se sont progressivement modifiés au fil des générations. Pour les séquences de protéines ou d'ADN, cette étape de comparaison est celle de l'alignement.

La figure 7.20 montre la relation phylogénétique entre les sous-génotypes de *Cryptosporidium parvum* du locus gp60 produit par la méthode Neighbor-Joining. Comme prévu, les deux séquences IIaA16G2R1 générées dans le cadre de la présente étude ont été regroupées en un groupe bien défini avec des isolats bovins précédemment déclarés appartenant à la famille de sous-génotype IIa.

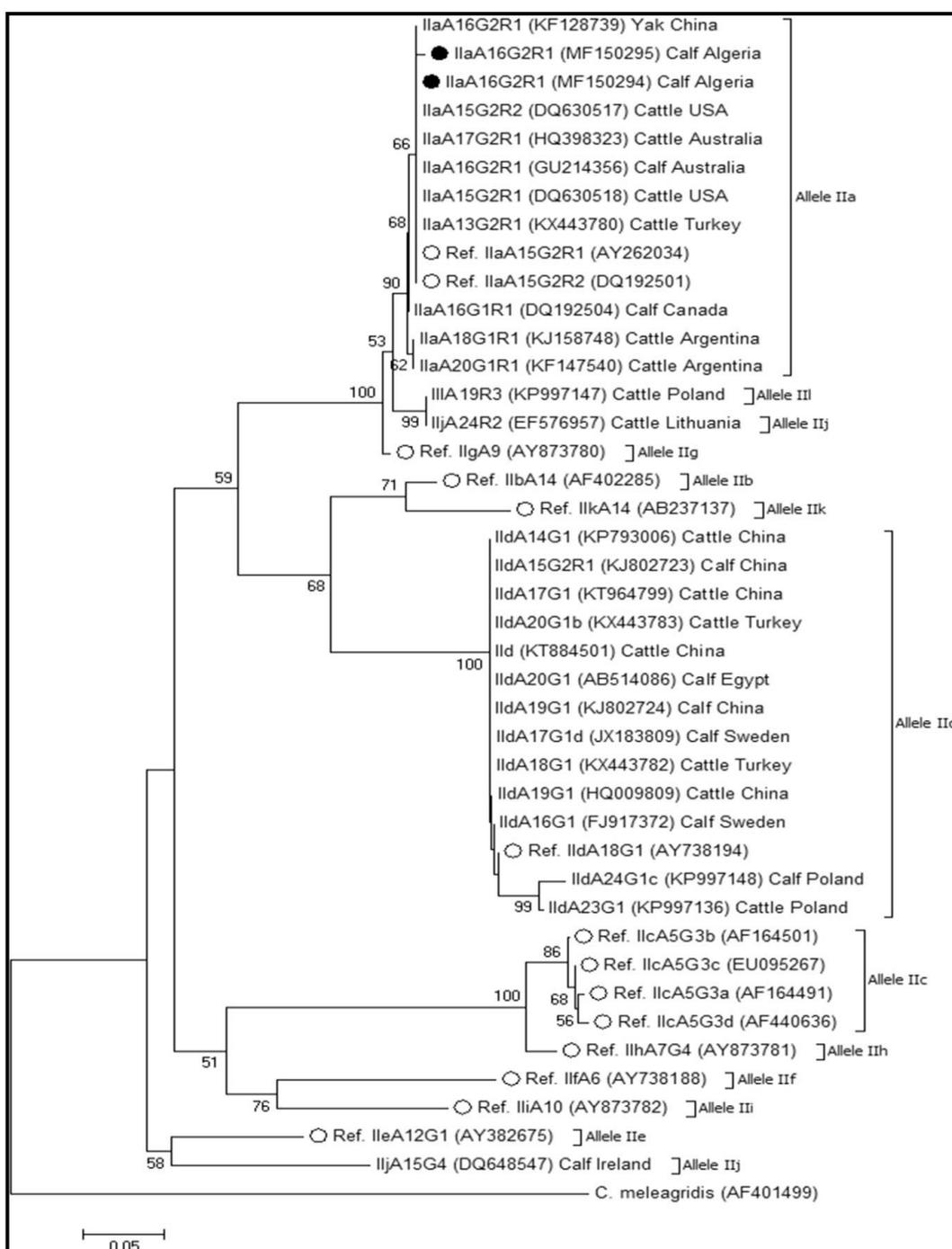


Figure 7.20 : Relations évolutives entre les sous-génotypes *Cryptosporidium parvum* du locus GP60 déduit par une analyse Neighbor-Joining.

Le pourcentage d'arbres répliqués dans lesquels les taxons associés se sont regroupés dans le test Bootstrap (1000 cycles) est indiqué à côté des branches. Les valeurs Bootstrap inférieures à 50% n'étaient pas affichées. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode de Kimura à 2 paramètres.

La variation du taux entre les sites a été modélisée avec une distribution gamma (paramètre de forme = 2). Les cercles remplis représentent les séquences Ila générées dans cette étude. Les cercles ouverts représentent des séquences de référence extraites de GenBank. Les séquences de *Cryptosporidium parvum* d'origine bovine précédemment signalées dans d'autres pays ont été incluses dans l'analyse à des fins de comparaison. *Cryptosporidium meleagridis* a été utilisé comme taxon hors groupe.

## 7.6. Discussion

Dans la présente étude, nous avons constaté que *Cryptosporidium parvum* est considéré comme étant la principale et la majeure espèce identifiée dans les prélèvements fécaux dont la majorité des échantillons étaient de nature diarrhéique pouvant jouer un rôle dans la transmission et augmenter la contamination car les animaux représentent toujours une source de contamination pour l'environnement puisqu'ils continuent à excréter de petites quantités de parasite.

Par ailleurs, les échantillons analysés par la méthode PCR s'est avéré la plus sensible et qui a permis de détecter l'ADN de *Cryptosporidium* de 29 échantillons (29/38). Ceci est en accord avec les travaux de [83] qui ont souligné que la détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans les matières fécales par microscopie et le test ELISA sont moins sensibles que la détection de l'ADN par la méthode PCR.

Les quatre espèces ont été identifiées durant notre étude, *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* et *Cryptosporidium ryanae* correspondant à des taux de 72.4%, 13.8%, 3.4%, 3.4% respectivement, nos résultats confortent les résultats trouvés par Xiao et Feng [249], Robertson LJ et al.[10] ; Fayer et al., [11] ; Xiao et al. [75] ; Santin. M [250]; qui expliquent que la cryptosporidiose bovine est généralement causée par quatre *Cryptosporidium* notamment *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni* et *Cryptosporidium ryanae* bien que *Cryptosporidium felis* signalé par Cardona et al. [138]. *Cryptosporidium hominis* signalé par Smith et al. [251] ; *Cryptosporidium suis* signalé par Fayer et al., [252]; Bodager et al., [229];, et *Cryptosporidium pig* génotype II signalé par Langkjaer et al [253] aient également été signalés sporadiquement comme infectant le bétail ce qui n'a pas été signalé durant notre étude.

Nous avons enregistré que *Cryptosporidium parvum* a été l'espèce la plus dominante dans les échantillons appartenant à des veaux âgés de 2 à 30 jours, pour cela, nos résultats rejoignent les travaux de Santin et al. [153]; Fayer R, et al.

[96] qui ont signalé que *Cryptosporidium parvum* présente une affinité marquée liée à l'âge de l'hôte.

Dans la présente étude, il est à signaler, que *Cryptosporidium parvum* était responsable de la majorité des infestations chez les veaux âgés de 2 à 30 jours avec un taux de 84 % ceci est en concordance avec les résultats trouvés en 1999 par De Graaf et al [137] en 2012 par Noordeen et al, [129]; Paraud et Chartier, [95] ; Robertson et al, [10]. Thompson et al, (2016) [243]. Silverlas et Blanco-Penedo, [244]; Chalmers et Katzer, [254] qui ont souligné que *Cryptosporidium parvum* est considéré comme une cause de diarrhée chez les veaux âgés de moins de 3 mois.

*Cryptosporidium parvum* étant presque exclusivement trouvé chez les veaux pré-sevrés et qui a été identifié comme l'espèce la plus dominante infectant les veaux avant le sevrage, en particulier par le sous-type IlaA15G2R1, dans diverses études menées dans le monde entier par Santín et al.[153]; Geurden et al. [157] ; Rieux et al. [255]

Ces résultats montrent l'importance des veaux au pré-sevrage comme source d'infection pour l'homme. Il convient donc d'accorder une attention particulière à la gestion de ce groupe d'âge pour prévenir la propagation de l'infection dans les élevages et prévenir la transmission de l'infection à l'homme et éviter la contamination et la pollution de l'environnement.

Durant notre étude, il est important de noter que tous les isolats de *Cryptosporidium parvum* ont été attribués à IlaA16G2R1, un sous-génotype moins fréquemment signalé comme cause d'infections bovines mais déjà décrit chez les bovins en Algérie en 2017 par Baroudi et al. [22] . En Belgique Geurden et al. 2007,[157] .En Espagne en 2008 par Quilez et al[256], et en 2013, chez les yaks en Chine par Mi et al.[257].

Des infections humaines par IlaA16G2R1 ont également été signalées en clinique chez les adultes et les enfants en République démocratique de São Tomé et Príncipe en 2014 par Lobo et al.[258] ; et en Iran en 2015 par Sharbatkhori et al.[259] . En 2016 par Ranjbar et al. [260] soulignant le potentiel zoonotique de ce sous-génotype de *Cryptosporidium parvum*.

Il convient également de mentionner que les autres membres de la famille de sous-type Ila qui infectent les bovins en Algérie comprennent le sous type IlaA13G2R1 enregistré par Benhouda et al [21] et le sous type IlaA17G3R1 par Baroudi et al., [22] alors que IlaA15G2R1 n'a pas été identifié dans des isolats d'origine humaine ou animale dans le pays jusqu'à ce jour.

En outre, *Cryptosporidium bovis* était présent, après *Cryptosporidium parvum*, il s'agit de la deuxième espèce de *Cryptosporidium* la plus répandue circulant chez les bovins, qui a été identifiée seulement chez les veaux âgés de plus de 15 jours.

Ceci est en opposition avec les données moléculaires obtenues chez des veaux âgés moins de 2 mois dans une étude effectuée par Benhouda et al., [21] dans la wilaya de Batna au nord-est de l'Algérie où *Cryptosporidium bovis* (n=14) était l'espèce la plus répandue, suivie de *Cryptosporidium ryanae* (n=6) et *Cryptosporidium parvum* (n=4).

Dans la présente étude, nous avons enregistré la présence de *Cryptosporidium ryanae* et *Cryptosporidium andersoni* dans un échantillon non diarrhéique appartenant à un veau et une génisse. Ceci est en accord avec des études effectuées par Santín et al.[153]; qui ont déclaré que les deux espèces causent généralement des infections subcliniques chez les bovins âgés de plus d'un mois .

## CONCLUSION

Dans la présente étude, Il a été démontré que les bovins infectés en général et les veaux en particulier contribuent de manière importante à excréter des oocystes de *Cryptosporidium parvum* et polluer l'environnement.

Peu de données sur la présence, la distribution géographique et la diversité moléculaire des infections à *Cryptosporidium* affectant les populations bovines en Algérie. Durant notre étude, nous avons identifié quatre espèces parasitaires *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium bovis*, *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium ryanae* avec une prédominance de *Cryptosporidium parvum* qui entraîne une immunodépression favorable au développement d'autres pathogènes, lui-même étant pathogène.

En outre, notre étude a souligné que les plus jeunes sont les plus sensibles à cette infection avec une prédominance en premier *Cryptosporidium parvum*, en second lieu *Cryptosporidium bovis* et *Cryptosporidium ryanae*, par contre *Cryptosporidium andersoni* a été identifié chez une génisse de 18 mois.

Ce qui nous a permis de présenter un aperçu sur la fréquence de cette espèce zoonotique dans nos élevages, qui s'avère importante avec un taux de 52.2 % avec une prédominance de *Cryptosporidium parvum*. Ceci suggère d'inclure ce parasite parmi les principaux germes en pathologie bovine. Quant au *Cryptosporidium andersoni*, il est faiblement retrouvé lors de notre recherche, mais il est généralement admis que c'est une espèce importante dans les élevages bovins.

Les méthodes moléculaires utilisées dans notre étude conviennent le mieux car elles permettent l'identification du genre, de l'espèce / génotype et des sous-types. En parallèle, les méthodes conventionnelles permettent de renforcer le diagnostic et l'adaptation d'une méthodologie de recherche rapide et de routine pour une suspicion de cette espèce zoonotique, qui sera ultérieurement tranchée par les méthodes moléculaires.

Actuellement, avec l'utilisation de ces méthodes de diagnostic suffisamment sensibles, une certaine précision sur la susceptibilité aux espèces parasitaires, en

rapport avec l'âge des animaux, est possible. On peut signaler que *Cryptosporidium parvum* atteint les plus jeunes animaux au stade nouveau-né. Plus tard, c'est *Cryptosporidium bovis* qui prend le relais, par la suite c'est *Cryptosporidium ryanae*; et au stade adulte, la sensibilité est plus élevée à *Cryptosporidium andersoni*, *Cryptosporidium parvum* au stade nouveau-né, *Cryptosporidium raynae* et/ou *Cryptosporidium bovis* au sevrage, et *Cryptosporidium andersoni* chez les veaux plus âgés.

## RECOMMANDATIONS

À la lumière des résultats obtenus lors de notre étude sur la situation de la cryptosporidiose bovine dans les fermes situées dans les wilayas du nord de l'Algérie Aïn Defla, Blida, Sétif et Tizi Ouzou.

Nous voudrions apporter quelques recommandations dans le but d'essayer de minimiser l'impact de cette pathologie sur nos élevages car les diarrhées néonatales des veaux à *Cryptosporidium sp* prennent de plus en plus d'ampleur et deviennent une préoccupation majeure tant pour l'éleveur que pour le vétérinaire voire pour les services de santé publique en raison du caractère zoonotique de la maladie.

La cryptosporidiose représente le type de pathologie pour lequel la résolution de la problématique est nécessairement préventive.

Au terme de nos résultats, et étant donné les caractéristiques épidémiologiques de ce parasite, nous prônons les mesures suivantes :

- Une bonne gestion du troupeau au niveau de l'exploitation dont le but de réduire le risque de la cryptosporidiose. Pour cela, il faut que l'éleveur s'assure que le veau reçoit un colostrum de qualité et en quantité suffisante après la naissance, avec un suivi d'une alimentation de qualité. De même les femelles gestantes doivent recevoir une bonne alimentation équilibrée. Il est conseillé de faire attention à l'hygiène générale du troupeau, du matériel, surveiller la température, l'humidité, l'aération et la densité animale. D'autre part, l'eau peut être une source de contamination qui doit être contrôlée. Il est conseillé aussi d'éviter de mélanger les espèces entre elles (bovins, ovins), et aussi lutter contre les rongeurs.
- L'hygiène joue un rôle important dans un élevage. Ce qui oblige l'éleveur de nettoyer la salle ou l'endroit de maternité, et les boxes des nouveau-nés, les bâtiments doivent être nettoyés à l'eau bouillante sous pression et désinfectés. Il est donc souhaitable que l'éleveur commence par un curetage suivi d'une désinfection et de préférence, un vide sanitaire au moins le temps de permettre un séchage complet des bâtiments car les oocystes sont sensibles à la dessiccation.

- Empêcher ou réduire l'absorption des parasites par la voie oro-fécale par un nettoyage et une désinfection des boxes contenant des animaux malades, de même, un nettoyage régulier des abreuvoirs souillés par les fèces, et des boxes en utilisant une litière suffisante et sèche.
- Pour empêcher le contact du parasite avec le veau juste après la naissance, on conseille à l'éleveur de placer le veau dès sa naissance dans un environnement sain propre et isolé en évitant la surpopulation, surtout ne pas mélanger les animaux de classes d'âge différentes.
- Pour éviter la propagation de la maladie, l'éleveur doit obligatoirement séparer les animaux malades des nouveau-nés dans des bâtiments différents, il est préférable de s'occuper au début des animaux sains ensuite des animaux malades, pour ne pas véhiculer les oocystes par le biais des bottes ou des vêtements. Sans oublier d'insister sur la réhydratation orale ou parentérale lors du traitement du veau diarrhéique, complétée par une antibiothérapie adéquate.
- Nous recommandons aussi aux vétérinaires de prévenir l'éleveur du caractère zoonotique de la pathologie ; en prônant la réduction du risque de pollution environnementale par les oocystes de *Cryptosporidium sp.* En outre le vétérinaire doit informer les médecins humains étant donné les lacunes dans la connaissance de la cryptosporidiose chez l'homme.
- Nous souhaiterions que la recherche de *Cryptosporidium sp* soit vulgarisée au niveau des laboratoires de parasitologie et que le dépistage systématique de la cryptosporidiose doit être une première démarche dans le cas d'apparition de diarrhée au sein d'un élevage.
- En conclusion, ces mesures ne provoquent pas la disparition de la pathologie mais néanmoins réduisent considérablement la charge parasitaire dans l'environnement proche du veau. D'un autre côté, l'éleveur doit faire part d'une réelle intention pour avoir de bons résultats.

Vu l'importance de la cryptosporidiose et les pertes causées par cette pathologie. Beaucoup d'éléments restent encore à étudier sur cette maladie en Algérie, notamment d'autres facteurs d'épidémiologie, tels que, l'influence du sexe, la

souche en élevage, le déséquilibre alimentaire, les sources de contamination et les modalités de transmission à l'homme.

Par ailleurs sachant que la cryptosporidiose touche toutes les espèces, il serait judicieux d'étendre les études à d'autres espèces telles que le cheval, l'ovin, le dromadaire et les caprins afin de mieux cerner cette pathologie.

Enfin, nous terminerons par un conseil sur la sensibilisation des éleveurs, vétérinaires et techniciens de laboratoire sur le risque de contamination de cette zoonose.

Ainsi, l'élevage : c'est de l'hygiène en application.

## **APPENDICE A**

### **LISTE DES ABREVIATIONS**

**GENN** : Gastro entérites du nouveau-né

**S** : Salmonella

**Ig** : Immunoglobuline

**C** : *Cryptosporidium*

**ARN** : Acide ribonucléique

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**Sp** : espèce au singulier

**Spp** : espèce au pluriel

**INF $\alpha$**  : Interferon  $\alpha$

**INF  $\gamma$**  : Interferon  $\gamma$

**IL-12** : Interleukine 12

**APC** : Antigène présentant des cellules

**NK** : cellules tueuses

**TH1** : Lymphocyte de type 1 ( Lymphocyte auxiliaire )

**TH2** : Lymphocyte de type 2 ( Lymphocyte auxiliaire )

## APPENDICE B

### Mode opératoire des différentes techniques

#### A-Technique d'Anderson, la plus couramment utilisée

Mode opératoire :

- Diluer 1 à 5 grammes de selles dans 20 ml d'eau physiologique à 9%.
- Filtrer sur plusieurs épaisseurs de gaze ou sur tamis à mailles de 30 microns puis centrifuger le filtrat pendant 10 minutes à 500 g.
- Jeter le surnageant, ajouter au culot 10 ml de solution de saccharose et bien agiter.
- Remettre le culot en suspension et centrifuger de nouveau pendant 10 minutes à 500 g.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine la surface du liquide (ménisque superficiel)
- Examiner entre lame et lamelle à x 25 et à x 40 pour repérer les oocystes, puis à x100 (immersion) pour confirmer l'identification.

Les oocystes apparaissent sous forme d'éléments arrondis à ovoïdes de 4 à 6  $\mu$  de diamètre, finement granuleux et renfermant une tache brune saillante qui correspond au reliquat oocystal. Ils sont variables du rose au bleu gris suivant les optiques des microscopes, réfringents et contenant 2 à 4 points noirâtres qui correspondent aux sporozoïtes (Photo 1).

Avantages : c'est une technique fiable, peu coûteuse et sensible. Elle a l'avantage également de mettre en évidence d'autres éléments parasites tels que les coccidies et les œufs de nématodes et de cestodes.

Inconvénients : c'est une technique un peu lourde à réaliser et la recherche de cryptosporidies est difficile en présence de nombreuses cellules végétales. De plus, la lecture des préparations doit être faite rapidement car les oocystes sont détruits en moins d'une heure.

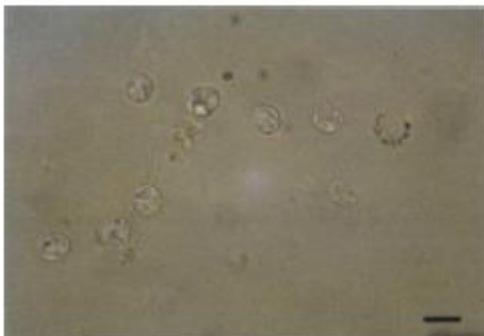


Photo 1 : Flottaison sur lame et lamelle au sucre de Sheather. Les oocystes de *Cryptosporidium* apparaissent teintés en rose sous l'examen à l'immersion (barre = 5  $\mu$ m) (Ma et Soave 1983).

## B-Flottaison rapide sur lame, modifiée par Naciri

### Mode opératoire :

- Déposer sur une lame de microscope une goutte de fèces.
- Mélanger avec une goutte de solution dense de saccharose de densité 1,27 composée de 454 g de sucre, 355 ml d'eau et 6,7 ml de phénol à 5%. La solution est préparée avec 500 g de sucre, 320 ml d'eau et 0,2 g/l d'azide de sodium.
- Couvrir d'une lamelle.
- Observer au microscope à l'objectif x 25, x 40 ou x 63.

Les oocystes de *Cryptosporidium* apparaissent, au grossissement x 25, légèrement rosés. Les levures ne prennent pas cette teinte. Au grossissement x 63, ils perdent leur coloration et on peut observer une à quatre granulations noirâtres qui correspondent aux sporozoïtes. En microscopie à contraste de phase, les oocystes apparaissent réfringents et rétractiles (Current et Garcia, 1991).

Avantages : cette méthode a l'avantage d'être simple, rapide, sensible (seuil de détection des oocystes : 10.000 opg) et peu coûteuse. Entre autres, on peut visualiser les oocystes d'*Eimeria*.

Inconvénients : la préparation doit être lue rapidement. Au-delà de 15 à 30 mn, la solution dense hypertonique détruira les oocystes, et de ce fait les lames ne peuvent pas être conservées.

D'autres techniques de flottaison sont aussi courantes au laboratoire mais très peu utilisées pour identifier *Cryptosporidium* chez les animaux :

- Solution saturée de NaCl (technique de Willis)
- Solution de sulfate de zinc (ZnSO<sub>4</sub>)
- Iodo-mercurate de potassium (Janesko-Urbanyi)
- Solution de bichromate de potassium

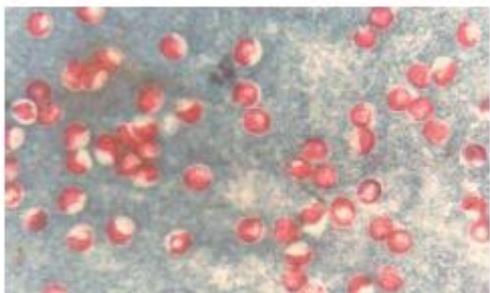


Photo 2 : Oocystes de *Cryptosporidium* concentrés par flottaison dans une solution de ZnSO<sub>4</sub> à 33% et colorés par la technique de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (x1000) (Gati, 1996).

### 3-Méthodes de détection et de quantification des oocystes :

- Déliter 0,25 g de matières fécales dans 0,75 ml d'eau.
- Ajouter 4 ml de solution dense de saccharose.
- Agiter vigoureusement.
- Remplir une cellule de Thoma ou de Neubauer et compter les oocystes. La numération obtenue est corrigée en fonction de la taille de la cellule utilisée, de la dilution effectuée et du volume fécal de départ.

Cette méthode est utilisée dans les laboratoires de recherche pour des essais cliniques. Son inconvénient est qu'elle est longue et fastidieuse et, de ce fait, ne peut être utilisée en routine

La purification peut être effectuée sur des oocystes concentrés. Les oocystes purifiés sont nécessaires pour la recherche fondamentale et appliquée, pour étudier leur infectiosité chez les animaux et chez l'homme, pour vérifier l'efficacité de la désinfection et pour les études de traitement de l'eau, ainsi que pour d'autres fins .La plupart des procédures de purification consistent à enlever les débris fécaux et éliminer les graisses et les lipides fécaux par tamisage en série. Ceci permettra la concentration des oocystes. La purification des oocystes peut être effectuée en utilisant des méthodes de flottaison fondées sur le saccharose et le sel, le gradient Percoll-isopicnique, le sucre discontinu, le chlorure de césium, de l'eau, le formol-éther et avec une immuno-séparation magnétique.

#### Mode opératoire :

Déposer 1 ml de la suspension contenant les oocystes sur le Percoll gradient discontinu (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). Ce gradient est composé de 4 couches de 2,5 ml d'une densité de 1,13 (Percoll non diluée), 1,09 (1,5 ml de Percoll + 0,5 ml d'eau), 1,05 (0,7 ml de Percoll + 1,3 ml d'eau), et 1,01 g/ml (0,1 ml de Percoll + 1,9 ml d'eau), qui ont été soigneusement superposées avec une pipette dans un tube en verre transparent de 15 ml (diamètre critique 17 mm) et centrifugées à 650 g pendant 15 mn. Les deux bandes qui contiennent les oocystes purifiés entre les couches de 1,13 et 1,05 g/ml sont aspirées et lavées trois fois en phosphate-buffer-saline (PBS) à 1.800 g pendant 10 mn et le culot est remis en suspension dans du PBS .

#### 4-Coloration négative de Heine (1982)

Mode opératoire :

- Déposer sur une lame de microscope une goutte (3 µl) de fèces ou son équivalent si les fèces sont solides.
- Mélanger avec une goutte (3 µl) de fuchsine de Ziehl.
- Faire un étalement mince.
- Laisser sécher à l'air.
- Recouvrir d'une goutte d'huile à immersion dès que le séchage est obtenu.
- Déposer une lamelle.
- Observer au microscope (Objectif x 400) ou, sans lamelle, au microscope à Immersion (objectif x 1000), ou avec un microscope à contraste de phase de préférence. Les oocystes apparaissent comme des éléments ronds à ovoïdes, de 4 à 6 µm de diamètre, incolores, biréfringents, avec une tache rouge sombre (reliquat oocystal) sur un fond coloré en rouge (Photo 3).

Avantage : technique facile à réaliser, peu coûteuse et rapide (plus rapide que la coloration de Ziehl Neelsen modifiée) et est recommandée comme le premier choix de détection.

Inconvénient : Pour être plus facile, la lecture nécessite un microscope à contraste de phase, ce qui n'est pas disponible dans tous les laboratoires. De plus, la lecture doit être faite dans les 15 minutes qui suivent la préparation. Au-delà, les oocystes se déforment ou prennent la coloration du fond et de ce fait les lames ne peuvent pas être conservées

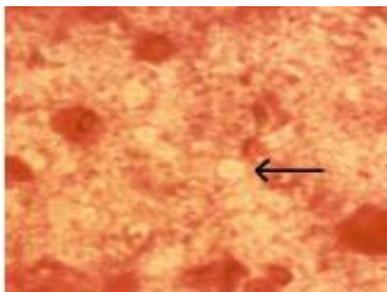


Photo 3 : Frottis fécal coloré par la technique de Heine. Les oocystes du *Cryptosporidium* spp (flèches), non colorés, sont très réfringents sur le fond rose de la préparation (x1000)(Gati,1996).

### 5-Coloration au lugol

Une goutte de selles mélangée avec une goutte de lugol est examinée au microscope optique à l'objectif x400. La lecture montre les levures qui apparaissent en jaune brun et les cryptosporidies incolores (Bailanger, 1986).

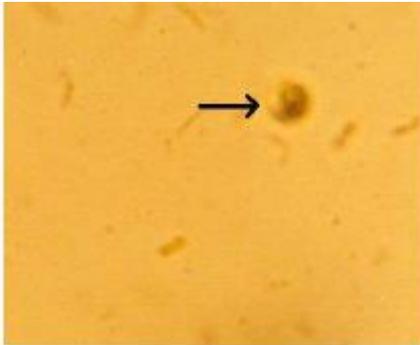


Photo 4 : Oocyste de *Cryptosporidium* spp (flèche) dans un frottis fécal coloré par le lugol à 2% (x1000).

### 6-Coloration de B-Coloration de Ziehl Neelsen modifiée par Angus

- Fixer le frottis à l'éthanol à 95°C pendant 5 minutes.
- Flamber la lame.
- Recouvrir immédiatement la lame, encore chaude, de fuchsine de Ziehl.
- Rincer à l'eau de robinet.
- Asperger la lame d'une ou deux giclées avec de l'acide chlorhydrique 3% dans de l'éthanol à 95% (en brefs contacts séparés d'un court rinçage à l'eau du robinet) pour différencier *Cryptosporidium* des autres microorganismes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Contre-colorer en recouvrant la lame avec du vert de malachite à 0,25% pendant 30 secondes (ou avec du bleu de méthylène à 0,1 - 0,3% pendant 60 secondes).
- Rincer à l'eau du robinet.
- Sécher à l'air libre.
- Observer à l'aide d'un objectif x 400 ou à immersion (x 1000). Les oocystes apparaissent de couleur rose à rouge vif sur un fond vert et/ou sur un fond bleu si la contre-coloration est faite au bleu de méthylène, ceux matures peuvent avoir les 4 sporozoïtes discernables

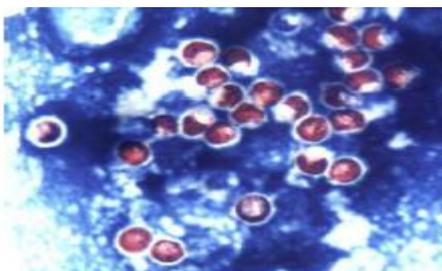


Photo5 : Oocystes de *Cryptosporidium* colorés par la technique de Ziehl-Neelsen modifiée (x1000) (Bourdais, 2008)

## 7-Coloration au Giemsa

Mode opératoire :

- Fixer le frottis au méthanol ou à l'alcool absolu pendant 5 mn et laisser sécher à l'air libre.
- Colorer pendant 10 à 30 mn dans du Giemsa rapide dilué au 1/20<sup>ème</sup>.
- Rincer à l'eau de robinet.
- Sécher à l'air libre.
- Observer directement à l'objectif x 100.

Les oocystes apparaissent ronds à ovoïdes, de 2 à 5 µm de diamètre, avec un cytoplasme bleuté et granuleux et un centre clair contenant jusqu'à 6 corpuscules rouges. Les parasites sont souvent entourés d'un halo clair

Avantage : c'est une technique facile, rapide et peu coûteuse.

Inconvénient : cette technique a tendance à être abandonnée en raison des difficultés rencontrées lors de la lecture. Les oocystes peuvent être confondus avec les levures dont la taille est très voisine et qui se colorent aussi en bleu. De plus, il y a peu de contraste de couleur entre le parasite et les autres particules fécales.

8- Méthode rapide de Baxby et Blundell : C'est une technique très peu utilisée.

### A-Technique au bleu de méthylène fuchsine basique

Mode opératoire :

- Les frottis fixés à l'éthanol sont recouverts d'une solution de bleu de méthylène à 0,5%, chauffés pendant 3 minutes puis 3 minutes de coloration et enfin rinçage.
- Colorer avec de la fuchsine basique pendant 1 minute.
- Rinçage à l'eau puis séchage à l'air libre.

Les oocystes apparaissent colorés en bleu sur fond rose.

Cette technique à l'avantage d'être rapide et spécifique

Principe :

Cette méthode est une variante des méthodes de Ziehl-Neelsen modifiées par Henriksen et Pohlenz et par Angus. Elle est largement utilisée pour colorer les mycobactéries. Son principe est basé sur la capacité des cryptosporidies à fixer un colorant malgré un alcool et un acide fort, ce qu'on appelle l'acido-alcool-résistance. Ici, c'est la fuchsine phéniquée de Kinyoun qui est utilisée à froid (Ma *et al.*, 1984) .

### Préparation de la solution

- a. Fuchsine phéniquée de Kinyoun : Dissoudre 4 g de fuchsine basique pour bactériologie dans 20 ml d'éthanol à 95°C, agiter, verser petit à petit 1 ml d'eau tout en continuant d'agiter, ajouter 8 g de phénol.
- b. Solution de bleu de méthylène ou de vert de malachite : Préparer au choix une solution aqueuse à 0,5% de bleu de méthylène ou de vert de malachite

### Mode opératoire

- Réaliser et fixer le frottis,
- Couvrir la lame de fuchsine phéniquée de Kinyoun pendant 3 à 5 minutes,
- Rincer à l'eau de robinet,
- Décolorer avec l'acide sulfurique à 1% pendant 1 à 2 secondes,
- Laver rapidement à l'eau,
- Recouvrir la lame avec la solution de bleu de méthylène ou de vert de malachite  
Pendant quelques minutes,
- Rincer à l'eau,
- Sécher et observer au microscope à l'objectif x 1000 à immersion.

Lecture : les oocystes apparaissent roses à rouges sur un fond bleu (Photo 12) .

Avantage : Méthode rapide, sensible et très spécifique.

Inconvénient : Le temps de décoloration est délicat, il est donc important d'en maîtriser la technique (Mathan *et al.*, 1985. Collins *et al.*, 1992).

### 9-Mesure d'oocystes par microscope à fond clair, à contraste de phase et à contraste différentiel interférentiel

La détection des oocystes peut être réalisée directement par ces microscopes. Pour obtenir des mesures précises, les oocystes doivent être mis en suspension dans un milieu tel que l'eau, qui ne provoque pas leur engorgement, expansion, contraction ou distorsion. Les mesures doivent être prises avec l'objectif x 1000. Les microscopes à contraste interférentiel différentiel permettent une visualisation appréciée des objets avec un dédoublement inférieur à la limite de résolution de l'objectif. Ils donnent des images avec un pseudo relief typique du procédé .Le CID est très performant pour les sujets biologiques transparents, d'indice de réfraction proche de celui du milieu environnant. Il est dépourvu de l'artefact en

halo lumineux des images en contraste de phase. Mais, il n'est pas utilisable pour les sujets épais et colorés comme des coupes de tissu.

#### Mode opératoire

- Insérer le micromètre oculaire, avec son échelle déjà établie, au microscope, en s'assurant de sa compatibilité avec l'échelle du repère de visée.
- Choisir l'objectif avec le plus faible grossissement (par exemple  $\times 100$ ) et orienter le microscope sur le micromètre-objet, tourner l'oculaire et le positionner sur le micromètre objet de telle manière que les échelles des deux soient parallèles et proches, voire superposées.
- Compter le nombre de divisions de l'échelle du micromètre-objet qui correspond à un nombre entier de divisions de l'échelle du micromètre oculaire.
- Diviser la valeur observée sur l'échelle du micromètre-objet par le nombre de divisions comptabilisées sur l'échelle du micromètre oculaire afin de déterminer la valeur de chaque division de l'échelle du micromètre oculaire.
- Répéter la même opération pour chaque objectif.
- Conserver de manière permanente et à proximité du microscope, voire attaché à lui (par exemple sur un morceau de carton collé sur le devant du microscope) le calcul de la valeur de chacune des divisions du micromètre oculaire pour chaque objectif.

Exemple : Pour chaque objectif,  $x$  divisions de l'oculaire =  $y$   $\mu\text{m}$  (au niveau du micromètre-objet). Une division oculaire =  $y/x$   $\mu\text{m}$ .

#### 10-Mesure d'oocystes par micromètre

C'est la plus utilisée en routine. Le principe est de veiller à ce que la morphométrie (dimensions et forme) des oocystes de *Cryptosporidium* soit comprise dans la fourchette admise des paramètres standards pour l'espèce en cause. L'unité de mesure standard est le micron ( $\mu = 0,001$  mm). Les mesures sont réalisées à l'aide d'un micromètre oculaire inséré sur un des oculaires du microscope binoculaire. Le micromètre oculaire est un disque de verre ou de plastique portant une échelle graduée sous-divisée en millimètres.

## Mode opératoire

- Insérer le micromètre oculaire, avec son échelle déjà établie, au microscope, en s'assurant de sa compatibilité avec l'échelle du repère de visée.
- Choisir l'objectif avec le plus faible grossissement (par exemple  $\times 100$ ) et orienter le microscope sur le micromètre-objet, tourner l'oculaire et le positionner sur le micromètre objet de telle manière que les échelles des deux soient parallèles et proches, voire superposées.
- Compter le nombre de divisions de l'échelle du micromètre-objet qui correspond à un nombre entier de divisions de l'échelle du micromètre oculaire.
- Diviser la valeur observée sur l'échelle du micromètre-objet par le nombre de divisions comptabilisées sur l'échelle du micromètre oculaire afin de déterminer la valeur de chaque division de l'échelle du micromètre oculaire.
- Répéter la même opération pour chaque objectif.
- Conserver de manière permanente et à proximité du microscope, voire attaché à lui (par exemple sur un morceau de carton collé sur le devant du microscope) le calcul de la valeur de chacune des divisions du micromètre oculaire pour chaque objectif.

Exemple : Pour chaque objectif,  $x$  divisions de l'oculaire =  $y$   $\mu\text{m}$  (au niveau du micromètre-objet). Une division oculaire =  $y/x$   $\mu\text{m}$

## APPENDICE C

### Questionnaire

N° de l'Enquête

Zone d'étude

Les caractéristiques de l'exploitation :

La surface de l'exploitation

Le type de production

Existence d'autres espèces (préciser)

Taille du troupeau (nombre des animaux)

Type d'alimentation :

Nettoyage de l'exploitation : Fréquent    Régulier    Rare    Inexistant

Etat d'hygiène de l'étable : Bon    Moyen    Médiocre

Type de stabulation : Libre    Semi entravé    Entravé

Hygiène des animaux adultes : Propre    Sale    Très sale

Conditions de vêlage : (existence de local spécial , préciser)

Utilisation de vaccin contre les diarrhées    Oui    Non

Source de l'eau d'abreuvement : Citerne    Sonde    Eau de robinet

Désinfection des bâtiments d'élevage : Oui (préciser)    Non

Fiche signalétique du veau :

Age :    Sexe

Période de naissance (préciser la saison) :

Prise de colostrum : 2H - 4H    6H    24H

Modalités de distribution : Bidon    Biberon    Sous-mère

Existe-il de diarrhée à la naissance :

Préciser la tranche d'âge :

Consistance : Molle    Liquide    Aqueuse    présence de sang

Le taux de mortalités ( préciser la cause )

**APPENDICE D : ANALYSE STATISTIQUE**

**Corrélations**

		freq	sexe	saison	distcolostrum	hygetabl	age
freq	Corrélation de Pearson	1	,964**	-,699*	-,084	-,971**	,886**
	Sig. (bilatérale)		,002	,036	,830	,000	,001
	N	9	6	9	9	9	9
sexe	Corrélation de Pearson	,964**	1	-,975**	,373	-,994**	,966**
	Sig. (bilatérale)	,002		,001	,467	,000	,002
	N	6	6	6	6	6	6
saison	Corrélation de Pearson	-,699*	-,975**	1	-,490	,565	-,322
	Sig. (bilatérale)	,036	,001		,180	,113	,398
	N	9	6	11	9	9	9
distcolostrum	Corrélation de Pearson	-,084	,373	-,490	1	,259	-,393
	Sig. (bilatérale)	,830	,467	,180		,502	,295
	N	9	6	9	9	9	9
hygetabl	Corrélation de Pearson	-,971**	-,994**	,565	,259	1	-,935**
	Sig. (bilatérale)	,000	,000	,113	,502		,000
	N	9	6	9	9	9	9
age	Corrélation de Pearson	,886**	,966**	-,322	-,393	-,935**	1
	Sig. (bilatérale)	,001	,002	,398	,295	,000	
	N	9	6	9	9	9	9

\*\* . La corrélation est significative au niveau 0.01 (bilatéral). \* La corrélation est significative au niveau 0.05 (bilatéral)

**APPENDICE E :**  
**Technique de concentration de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley (1970)**



Mélanger les matières fécales avec du formol, laisser sédimenter et verser dans les tubes coniques et centrifuger



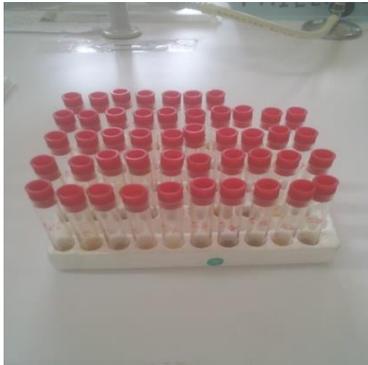
Jeter les 3 couches et prendre une goutte avec pipette Pasteur sur une lame ensuite étaler le frottis, laisser sécher ensuite colorer les lames



Les lames sont colorées par la coloration de Ziehl Neelson modifiée, laisser sécher et observer au microscope (x 40 ; x 100)

## APPENDICE F

### Mode opératoire du test immuno-enzymatique de Co-Antigène à l'enzyme CpAg-ELISA (Photos Personnelles)



Echantillons à tester



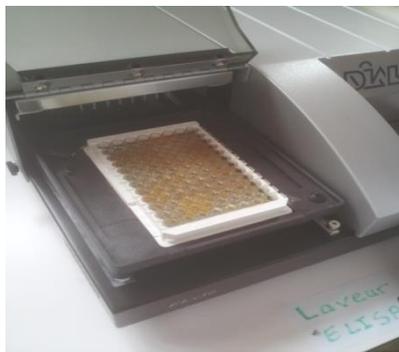
Tampon de dilution



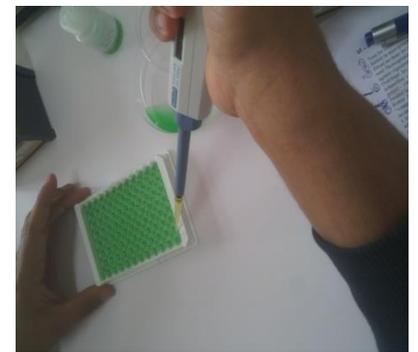
Distribution des échantillons dilués



Couvrir, incuber pendant  
1 heure à 21°C



Rincer la plaque



Distribuer le conjugué



Couvrir, incuber pendant  
1 heure à 21°C



Rincer la plaque



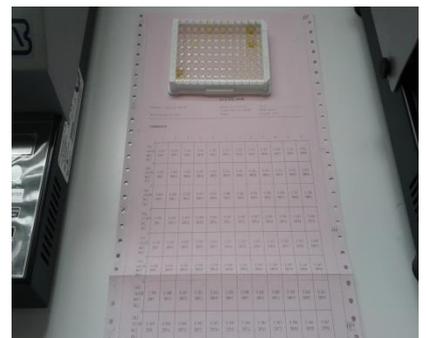
Distribuer le révélateur  
Incuber pendant 10 mn



Distribuer la solution d'arrêt

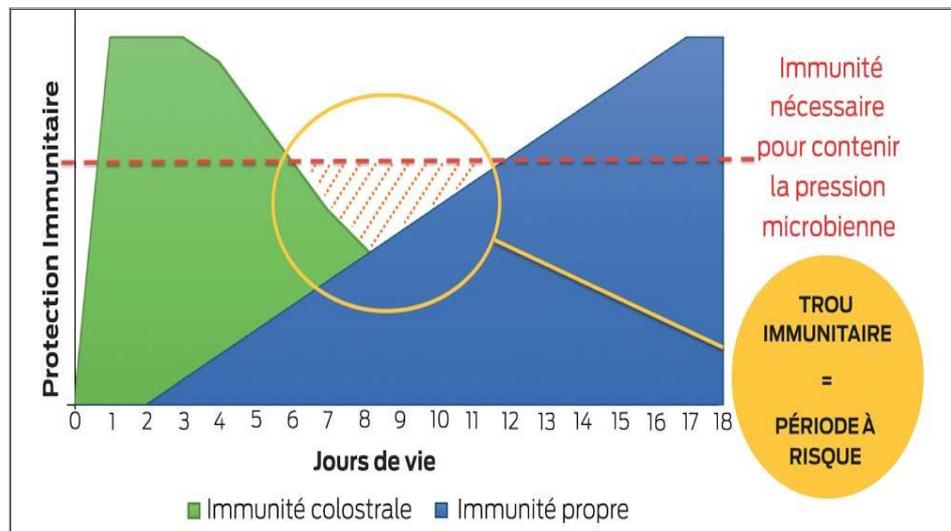
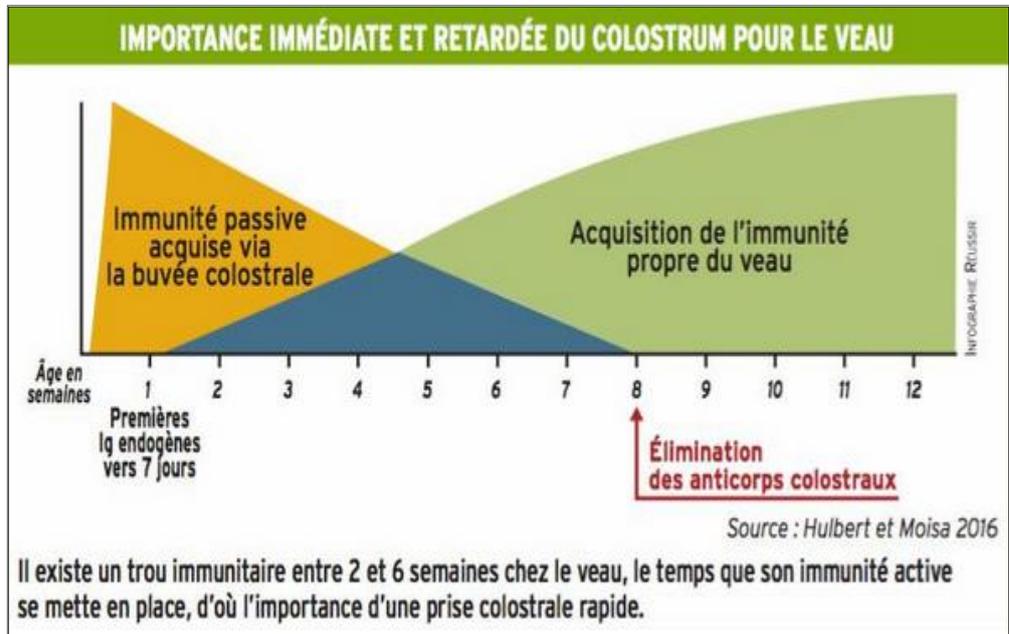
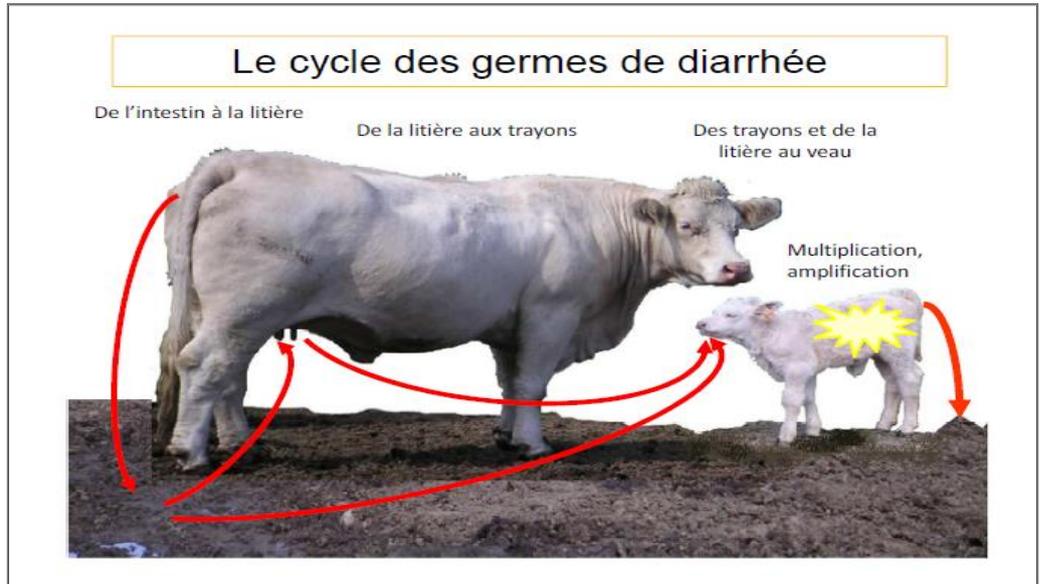


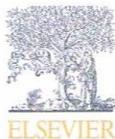
Apparition de couleur bleu



Apparition de couleur jaune  
ensuite la lecture

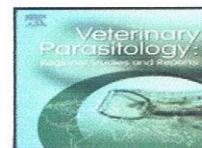
## APPENDICE G





Contents lists available at ScienceDirect

## Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

journal homepage: [www.elsevier.com](http://www.elsevier.com)

Original article

### *Cryptosporidium*-associated diarrhoea in neonatal calves in Algeria

Nadia Ouakli<sup>a</sup>, Aouatif Belkhiria<sup>a</sup>, Aida de Lucio<sup>c</sup>, Pamela C. Köster<sup>c</sup>, Mustapha Djoudi<sup>a</sup>, Aness Dadda<sup>d</sup>, Djamel Khelef<sup>e</sup>, Rachid Kaidi<sup>a, b</sup>, David Carmena<sup>c, \*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Veterinary Science, Laboratory of Biotechnology in Animal Reproduction, University of Blida 1, PO Box 270, Ouled Yaich, 9000 Blida, Algeria

<sup>b</sup> School of Veterinary Medicine and Science, University of Nottingham, College Road, Sutton Bonington, Leicestershire LE12 5RD, United Kingdom

<sup>c</sup> Parasitology Reference and Research Laboratory, National Centre for Microbiology, Carlos III Health Institute, Ctra. Majadahonda-Pozuelo Km 2, 28220, Majadahonda, Madrid, Spain

<sup>d</sup> Institute of Veterinary Science, University of Souk Ahras, 41000 Souk Ahras, Algeria

<sup>e</sup> High National School of Veterinary, BP 161 Hacene Badi, EL Harrach, Algeria

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
*Cryptosporidium*  
 Calves  
 Neonatal  
 Algeria  
 Epidemiology  
 Genotyping  
 gp60  
 ELISA

## ABSTRACT

Neonatal calf diarrhoea triggered by the enteric protozoan parasite *Cryptosporidium* is a leading cause of morbidity and mortality in calves aged 1-month-old or younger globally. Infected cattle in general and calves in particular have also been demonstrated as major contributors of zoonotic *C. parvum* oocysts in the environment and have been linked to a number of waterborne outbreaks of human cryptosporidiosis. Little is known on the occurrence, geographical distribution, and molecular diversity of *Cryptosporidium* infections affecting bovine populations in Algeria. In this study faecal specimens were randomly collected from 460 cattle aged between two days and 18 months on 10 farms located in the provinces of Ain Defla, Blida, Sétif, and Tizi Ouzou between the autumn of 2015 and the spring of 2016. Faecal samples were microscopically examined using the modified Ziehl-Neelsen acid-fast technique as screening method. Microscopy-positive samples were confirmed by a commercial coproantigen enzyme-linked immunosorbent assay (Bio-X Diagnostics). The identification of *Cryptosporidium* species and sub-genotypes in confirmed samples was conducted by PCR and sequence analyses of the small subunit ribosomal RNA (*ssu rRNA*) and the 60kDa glycoprotein (*gp60*) genes of the parasite. Overall, 52.2% (240/460) of the investigated cattle tested positive to *Cryptosporidium* by microscopy. The infection was widespread in all 10 farms surveyed, but was significantly more prevalent in those from Blida in the central part of the country. Bovine cryptosporidiosis affected cattle of all age groups but with different outcomes. Pre-weaned (up to one month old) calves typically presented with diarrhoea, whereas older animals mostly harboured sub-clinical infections. The commercial ELISA used only detected 15.8% (38/240) of the samples that previously tested positive by microscopy, demonstrating a poor performance in field epidemiological surveys. Sequence analysis of the 29 isolates generated at the *ssu rRNA* loci confirmed the presence of four *Cryptosporidium* species including *C. parvum* (72.4%), *C. bovis* (13.8%), *C. andersoni*, (3.4%), and *C. ryanae* (3.4%). Two additional isolates (7.0%) could only be identified at the genus level. Eight out of the 21 isolates assigned to *C. parvum* were identified as sub-genotype IIA16G2R1 at the *gp60* locus. *C. parvum* was almost exclusively found infecting pre-weaned calves, whereas *C. ryanae* and *C. andersoni* were only detected in asymptomatic animals. Bovine cryptosporidiosis is highly endemic in the surveyed area and represents a veterinary public health concern that should be adequately tackled by Algerian veterinary health authorities and policy makers.

## 1. Introduction

The enteric protozoan parasite *Cryptosporidium*, the ethiological agent of cryptosporidiosis, is a major diarrhoeal pathogen in humans

and livestock with a global distribution (Ryan et al., 2014). In humans, cryptosporidiosis is the second cause of diarrhoea and death in children under five years of age after rotavirus (Striepen, 2013). In immunocompetent individuals the disease is self-limited, but it can be severe and life-threatening among immunocompromised subjects such as

\* Corresponding author.

Email address: [dacarmena@isciii.es](mailto:dacarmena@isciii.es) (D. Carmena)

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.02.005>

Received 27 October 2017; Accepted 19 February 2018

Available online xxx

2405-9390/© 2017.

AIDS patients or those undergoing cancer chemotherapy or solid organ transplantation (Marcos and Gotuzzo, 2013). Cryptosporidiosis is also regarded as a significant cause of acute diarrhoea in farm ruminants affecting primarily neonatal animals (de Graaf et al., 1999). The clinical presentation of the infection vary from asymptomatic to deadly and, if improperly managed, can cause important economic losses associated to grow retardation, reduced productivity, and mortality (Santín, 2013).

The genus *Cryptosporidium* comprises at least 26 taxonomically valid species and over 40 genotypes of unknown species status characterized by marked differences in host range and specificity (Ryan et al., 2014). Of them, anthroponotic *C. hominis* and zoonotic *C. parvum* are responsible for the vast majority of human infections documented globally (Xiao and Feng, 2008). Similarly, cattle are a primary reservoir for four *Cryptosporidium* species, namely *C. parvum*, *C. bovis*, *C. ryanae*, and *C. andersoni*, and are considered a major contributor of *Cryptosporidium* oocysts in the environment via manure spreading in farmlands or grazing on watersheds (Xiao and Feng, 2008). Bovine infections seem to follow an age-related distribution pattern, with *C. parvum* primarily detected in pre-weaned calves, *C. bovis* and *C. ryanae* in asymptomatic animals aged between one and 6 months, and *C. andersoni* in older cattle (Santín et al., 2004, 2008).

*Cryptosporidium* is prevalent in both humans and domestic animals in Africa, although the molecular diversity and geographical distribution of the parasite is still largely unknown in many regions of the continent (Squire and Ryan, 2017). In Algeria, microscopy-based studies have documented the presence of *Cryptosporidium* infections in 0.1% to 30% of the human populations surveyed (Benouis et al., 2013; Hamaidi-Chergui et al., 2013). Using the same diagnostic method, bovine cryptosporidiosis has been reported at infection rates varying from 19% to 84% in a limited number of epidemiological investigations conducted in the provinces of Bejaia, Setif, and Souk Ahras (Ouchene et al., 2014), Annaba and Eltarf (Hocine et al., 2016), and Batna (Benhouada et al., 2017) in the North-eastern part of the country. Molecular information on the presence and relative frequency of *Cryptosporidium* species are also scarce, with few studies reporting infections by *C. bovis*, *C. ryanae*, *C. parvum*, and *C. andersoni* in cattle (Baroudi et al., 2017; Benhouada et al., 2017), by *C. baileyi* and *C. meleagridis* in poultry and wild birds (Baroudi et al., 2013; Laatamna et al., 2017), and by *C. erinacei*, *C. parvum*, *C. hominis*, and *C. muris* in horses and donkeys (Laatamna et al., 2013, 2015). Although no molec-

ular data from human isolates are currently available, taken together this information indicates that *Cryptosporidium* infections seem common in Algeria and transmission of the parasite may involve a number of different pathways. In order to clarify this epidemiological scenario, we present here novel data on the presence, molecular diversity and frequency of *Cryptosporidium* in neonatal calves from three geographically different Algerian regions. We used genotyping and subtyping tools for the molecular investigation of the obtained *Cryptosporidium* isolates.

## 2. Material and methods

### 2.1. Study herds and sample collection

A total of 20 dairy farms (herd size range 16–273 animals; age range two days to 18 months) belonging to private producers and with an unknown history of *Cryptosporidium* infection were selected and invited to participate in the study, of which 10 (50.0%) agreed to be enrolled. The farms belonged to the provinces of Ain Defla, Blida, Sétif, and Tizi Ouzou and were geographically distributed into 3 regions as follows: region 1 included north-western Algeria ( $n = 1$ ); region 2, north-central Algeria ( $n = 2$ ); and region 3, north-eastern Algeria ( $n = 7$ ) (Fig. 1). Farms were visited once during autumn of 2015 and spring 2016 and individual faecal specimens were collected from 460 cattle randomly selected for sampling. At least 5 g of faecal material were directly obtained from the rectum of each calf using a single pair of latex gloves and placed in screw-topped specimen containers. Cups were labelled with a unique identification number and accompanied by a form recording the date of sampling, the farm of origin, and the animal's sex, age, and breed. Information regarding animal housing, management, and feeding routines were also gathered and carefully recorded. Samples were shipped to the laboratory in refrigerated boxes and processed within 12 h of collection.

### 2.2. Microscopy

Microscopic examination for the presence of *Cryptosporidium* oocysts was conducted on faecal suspensions after formol-ether concentration (Allen and Ridley, 1970). Modified Ziehl-Neelsen acid-fast staining was performed on the obtained concentrates. Briefly, a drop of

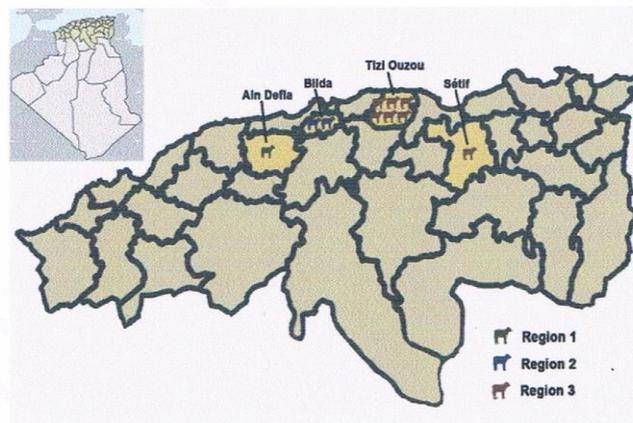


Fig. 1. Map showing the location and geographical distribution of the dairy farms investigated in the present study. The map of Input Administrative Unit Boundaries for Algeria was downloaded from the NASA Socioeconomic Data and Applications Center (SEDAC) at <http://sedac.ciesin.columbia.edu/data/collection/groads/maps/gallery/search>. Accessed on 21 May 2017.

faecal suspension was placed on a glass slide to form a thin smear. Slides were fixed in methanol for 5 min and then flooded with carbol fuchsin for 1 h. After rinsing off in tap water, the slides were decolorized in 25% sulphuric acid for 60–90 s, washed, and counterstained with 5% malachite green for 10 min. The slide was rinsed with tap water, allowed to dry, and examined under a microscope at 400× and 1000× magnification.

### 2.3. Coproantigen enzyme-linked immunosorbent assay (CpAg-ELISA)

*Cryptosporidium*-positive samples at microscopic examination were subsequently confirmed using a commercially available test based on a two-site sandwich ELISA format (BIO K 346 ELISA, Bio-X Diagnostics, Rochefort, Belgium) on freshly preserved, unconcentrated faecal specimens following the manufacturer's recommendations. The assay relies on monoclonal antibodies directed against cell wall antigens of the parasite oocyst. Optical densities were measured at a wavelength of 450 nm in a 96-well microplate reader (Dialab, Neudorf, Austria). This kit has, according to the manufacturer, a diagnostic specificity and sensitivity of 90.9% and 97.1%, respectively. Samples that tested positive both by microscopy and ELISA were preserved in 70% ethanol and aliquots shipped to the Spanish National Centre for Microbiology, Majadahonda (Spain) for downstream molecular analyses.

### 2.4. DNA extraction and purification

Total DNA was extracted from ~200 mg of each faecal specimen using the QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Purified DNA samples (200 µL) were stored at 4°C until PCR analysis.

### 2.5. Molecular detection, typing and sub-typing of *Cryptosporidium* spp. isolates

Faecal samples that tested positive for *Cryptosporidium* oocysts by any of the screening methods used were subsequently confirmed by a nested-PCR protocol targeting a 587-bp fragment of the small subunit (*ssu*) rRNA gene of the parasite (Tiangtip and Jongwutiwes, 2002). Amplification reactions (50 µL) consisted of 3 µL of DNA sample, 0.3 µM of each primer (CR-P1/CR-P2 in the primary reaction and CR-P3/CPB-DI-AGR in the secondary reaction, respectively), 2.5 units of MyTAQ™ DNA polymerase (Bioline GmbH), and 10 µL of MyTAQ™ Reaction Buffer containing 5 mM dNTPs and 15 mM MgCl<sub>2</sub>. Both PCR reactions were carried out as follows: one cycle of 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 40 s, 50°C for 40 s and 72°C for 1 min, concluding with a final extension of 72°C for 10 min.

*Cryptosporidium* isolates identified as *C. parvum* at the *ssu* rRNA locus were subsequently investigated at the gene coding for the 60 kDa glycoprotein (*gp60*) in order to ascertain the sub-type of the parasite. A nested-PCR protocol was used to amplify a 870-bp partial fragment of the *gp60* marker (Feltus et al., 2006). Briefly, 3 and 2 µL of template DNA were amplified in the first and second round of PCR, respectively, using 0.3 µM of each primer (AL-3531/AL-3535 in the primary reaction and AL-3532/AL-3534 in the secondary reaction, respectively). Amplification reaction mixes (50 µL) also contained 2.5 units of MyTAQ™ DNA polymerase (Bioline GmbH), and 10 µL of MyTAQ™ Reaction Buffer consisting of 5 mM dNTPs and 15 mM MgCl<sub>2</sub>. Primary cycling conditions were as follow: 5 min at 94°C followed by 35 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 59°C and 1 min at 72°C, with a final extension of 72°C for 10 min. The secondary PCR was similar to that described for

the primary PCR step with the exception that the annealing temperature was 50°C.

All PCR reactions were carried out on a 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, California, USA). Laboratory-confirmed positive and negative DNA samples were routinely used as controls and included in each round of PCR. PCR amplicons were visualized on 2% D5 agarose gels (Conda, Madrid, Spain) stained with Pronasafe nucleic acid staining solution (Conda). Positive-PCR products were directly sequenced in both directions using the internal primer set described above. DNA sequencing was conducted by capillary electrophoresis using the BigDye® Terminator chemistry (Applied Biosystems).

### 2.6. Data analyses

The chi-square test was used to compare *Cryptosporidium* infection rates in the bovine herds under study by age group and farm of origin. The same test was also used to ascertain the frequency of *Cryptosporidium*-associated diarrhoea according to the age group of the cattle. A probability (*P*) value < 0.05 was considered evidence of statistical significance.

Raw sequencing data in both forward and reverse directions were viewed using the Chromas Lite version 2.1 sequence analysis program (<http://chromaslite.software.informer.com/2.1/>). The BLAST tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to compare nucleotide sequences with sequences retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. Generated DNA consensus sequences were aligned to appropriate reference sequences using the MEGA 6 free software (<http://www.megasoftware.net/>) to identify *Cryptosporidium* species sub-types (Tamura et al., 2013).

For the identification of the phylogenetic inferences among the identified positive samples, a phylogenetic tree was inferred using the Neighbor-Joining method in MEGA 6. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method, and modelled with a gamma distribution. The reliability of the phylogenetic analyses at each branch node was estimated by the bootstrap method using 1000 replications. The sequences obtained in this study have been deposited in GenBank under accession numbers MF150290 to MF150295.

## 3. Results

The prevalence of bovine cryptosporidiosis in the three Algerian regions investigated was estimated at 52.2% (95% confidence interval: 47.6–56.7%) by microscopy, with *Cryptosporidium* oocysts being detected in 240/460 of the faecal samples examined (Table 1). The parasite was present in all 10 farms surveyed, where 67.1% (460/686) of cattle present at the time of the study were sampled. Marked differences in prevalence, ranging from 17% to 100%, were observed among the investigated farms. Farms located in north-central Algeria harboured significantly higher infection rates of bovine cryptosporidiosis than those in the north-western ( $\chi^2 = 33.5$ ;  $P < .00001$ ) and north-eastern ( $\chi^2 = 52.5$ ;  $P < .00001$ ) regions of the country.

Out of the 240 *Cryptosporidium* infections detected, 26.3% occurred in calves aged two to 15 days old, 22.1% in calves aged 16 to 30 days old, 37.1% in cattle aged > 1 month to 12 months old, and 14.5% in cattle older than 12 months. Regarding the presence of clinical symptoms, 30.8% (74/240) of the animals with cryptosporidiosis presented with diarrhoea at the moment of the survey, with the remaining 69.2% (166/240) harbouring sub-clinical infections (Table 2). Diarrhoeic samples were significantly more frequently detected in infected calves in the 2–15 days ( $\chi^2 = 117.9$ ;  $P < 0.00001$ ) and 16–30 days ( $\chi^2 = 21.9$ ;  $P < 0.00001$ ) age groups than in older animals, respectively. The commercial CpAg-ELISA assay only confirmed the presence of *Cryptosporidium* oocysts in 15.8% (38/240) of the faecal samples that previously

**Table 1**  
*Cryptosporidium* spp. infection rates determined by microscopic examination of cattle faecal specimens (n = 460) according to the farm and region of origin, Algeria, 2015–2016.

Region	Province	Farm code	Cattle at farm	Sampled cattle	Microscopy (+)	Percentage
North-western Algeria	Ain Defla	1	273	120	60	50.0
North-central Algeria	Blida	2	30	30	30	100
		3	47	40	34	85.0
North-eastern Algeria	Sétif	4	16	16	16	100
		5	130	100	38	38.0
		6	30	26	13	50.0
		7	45	35	19	54.3
		8	38	25	14	56.0
		9	50	45	10	22.2
Total		10	27	23	6	17.1
			686	460	240	52.2

**Table 2**  
 Performance of a coproantigen enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cattle faecal specimens that tested positive to the parasite at microscopic examination (n = 240). Results by animal's age group and faeces consistency are indicated, Algeria, 2015–2016.

Age (days)	No. samples	Diarrhoeal samples			Non-diarrhoeal samples		
		n	+	%	n	+	%
2–15	63	52	16	30.8	11	3	27.3
16–30	53	16	11	68.7	37	3	8.1
>30	124	6	3	50.0	118	2	1.7
Total	240	74	30	40.5	166	8	4.8

tested positive by microscopic examination. Positive CpAg-ELISA results were more often obtained in diarrhoeal samples from calves up to 1 month-old (Table 2).

Out of the 38 faecal specimens with a *Cryptosporidium*-positive result by both microscopy and ELISA, 76.3% (29/38) yielded amplicons of the expected (~480 bp) size at the *ssu* rRNA-PCR. Sequencing analyses allowed the identification of four *Cryptosporidium* species circulating in the surveyed calf population, including *C. parvum* (72.4%, 21/29), *C. bovis* (13.8%, 4/29), *C. andersoni* (3.4%, 1/29), and *C. ryanae* (3.4%, 1/29). Two additional isolates (7.0%) were only identified at the genus level due to poor sequence quality (Table 3). The occurrence of these *Cryptosporidium* species followed a clear age-related pattern. *C. parvum* was the almost only species found in both symptomatic (91%) and asymptomatic (68%) calves in the 2–15 days age group, although a sub-clinical infection by *C. ryanae* was also identified in a 12-day-old, asymptomatic calf. *C. parvum* infections prevailed in calves in the 16–30 days age group too, with the exception of two (one symptomatic, one asymptomatic) calves infected by *C. bovis*. However, *C. parvum* infections were absent in calves older than 30 days, where *C.*

*bovis* was the most prevalent (67%) species found. Additionally, a single infection by *C. andersoni* was found in an 18-month-old, asymptomatic heifer (Table 3). No apparent differences in the geographical distribution of *Cryptosporidium* infections were noted. Both *C. parvum* and *C. bovis* evidenced a rather wide distribution, being present in the three Algerian regions under study. *C. parvum* was present in all exploitations investigated except farms 1 and 3, whereas *C. bovis* was found in farms 1, 3, 8, and 9. *C. andersoni* was only reported in farm 1 (Western Algeria) and *C. ryanae* in farm 5 (Eastern Algeria). No *Cryptosporidium* isolates from farm 10 could be genotyped (Table 3).

Sub-genotyping data of the 27 *ssu* rRNA sequences unequivocally assigned to a given *Cryptosporidium* species are summarized in Table 4. The only isolate identified as *C. andersoni* contained a T insertion between nucleotides 633 and 634 of reference sequence AF093496 within a 494-bp (positions 528–1021) fragment. All four *C. bovis* isolates showed 100% homology to a 460-bp fragment (positions 311–770) of reference sequence AY741305. Interestingly, all 21 *C. parvum* sequences generated in the present study were identical among them. Sequence alignment analyses with reference sequence AF112571 allowed the identification of a 498-bp fragment (positions 533–1030)

**Table 3**  
 Distribution of *Cryptosporidium* species and sub-genotypes (n = 29) according to the age group, faeces consistency, and farm of origin of the infected cattle, Algeria, 2015–2016.

Age (days)	Diarrhoea	Farm code	Isolates (n)	Species	Relative frequency (%)	gp60 sub-genotype (n)
2–15	Yes	4, 5, 8, 9	10	<i>C. parvum</i>	90.9	IlaA16G2R1 (4)
		4	1	<i>Cryptosporidium</i> spp.	9.1	Unknown
	No	5, 6	2	<i>C. parvum</i>	66.7	IlaA16G2R1 (1)
		5	1	<i>C. ryanae</i>	33.3	–
16–30	Yes	5, 7, 8	7	<i>C. parvum</i>	87.5	IlaA16G2R1 (3)
		9	1	<i>C. bovis</i>	12.5	–
	No	2, 5	2	<i>C. parvum</i>	66.7	Unknown
		8	1	<i>C. bovis</i>	33.3	–
>30	Yes	1, 3	2	<i>C. bovis</i>	66.7	–
		4	1	<i>Cryptosporidium</i> spp.	33.3	Unknown
	No	1	1	<i>C. andersoni</i>	100	–

**Table 4**  
Diversity, frequency, and main molecular features of *Cryptosporidium* isolates at the *ssu* rRNA locus in cattle, Algeria 2015–2016. GenBank accession numbers of representative sequences were provided.

Species	No. isolates	Reference sequence	Stretch	Single nucleotide polymorphisms	GenBank accession no.
<i>C. andersoni</i>	1	AF093496	528–1021	633_634insT	MF150290
<i>C. bovis</i>	4	AY741305	311–770	None	MF150291
<i>C. parvum</i>	21	AF112571	533–1030	A646G, T649G, 688_691delATTA, T693A	MF150292
<i>C. ryanae</i>	1	EU410344	314–771	None	MF150293

with a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) including an ATTA deletion between nucleotides 688 and 691. Finally, the only isolate assigned to *C. ryanae* was identical to a 458-bp fragment (positions 314–771) of reference sequence EU410344. BLAST searches did not reveal the presence of novel genotypic variants.

The 21 isolates assigned to *C. parvum* at the *ssu* rRNA locus were subsequently assessed at the *gp60* locus in order to ascertain the sub-genotype(s) of the parasite involved in the infections. Overall, amplification products of the expected (~830bp) size were obtained in 38.1% (8/21) of the tested isolates. All eight *gp60* sequences were confirmed as sub-genotype IIaA16G2R1. Seven of them were identical to GenBank sequence KF128739 isolated in a yak in China, whereas the remaining one differed from them by a single SNP (T to A) at position 377 of KF128739 and represented an unreported genotypic variant. No polymorphic sites (double peaks) were observed in any of the *ssu* rRNA or *gp60* sequences analysed. Fig. 2 shows the phylogenetic relationship among *C. parvum* sub-genotypes at the *gp60* locus produced by the Neighbour-Joining method. As expected, the two IIaA16G2R1 sequences generated in the present study grouped together in a well-defined cluster with previously reported bovine isolates belonging to the sub-genotype family IIa.

#### 4. Discussion

*Cryptosporidium*, together with enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus and coronavirus, is a major contributor to the burden of diarrhoeal disease in neonatal calves globally (Foster and Smith, 2009). Neonatal morbidity and mortality due to cryptosporidiosis also represents a major economic concern to the livestock industry (de Graaf et al., 1999). In addition, infected calves have been identified as important sources of environmental contamination with zoonotic *C. parvum* oocysts, a fact with serious public health implications (Wielinga et al., 2008). Given this scenario, accurate identification of cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species at the herd level is important not only to adopt adequate treatment and preventive measures to reduce *Cryptosporidium* burden on farm, but also to minimize the zoonotic risk involved (Hoek et al., 2008; Kinross et al., 2015; Suler et al., 2016).

In the present survey, one in two cattle were found infected by *Cryptosporidium*, a prevalence rate well in the range with those (23%–84%) previously reported in similar microscopy-based epidemiological surveys conducted in Algeria (Ouchene et al., 2014; Hocine et al., 2016; Benhouda et al., 2017). Using a variety of diagnostic methods, bovine cryptosporidiosis has also been documented, mainly in calves, at 32% in Egypt (Helmy et al., 2015), 29% in Madagascar (Bodager et al., 2015), 52% in Nigeria (Ayinmode et al., 2010), and 87% in Tunisia (Soltane et al., 2007). Despite the fact that herd prevalence was 100%, *Cryptosporidium* infections were significantly more common in farms located in north-Central Algeria. Overall, these findings strongly suggest that bovine cryptosporidiosis is endemic in the country, with spatial variations of prevalence probably reflecting differences in herd and farm management practices. Our results also revealed that *Cryptosporidium*-associated diarrhoea primarily affects pre-weaned (up to one month-old) calves, with older animals mostly har-

bouring sub-clinical infections. This is in agreement with previous studies showing that neonatal calves are highly susceptible to *Cryptosporidium* infections because of their immature immune system and high exposure to manure or equipment contaminated with oocysts of the parasite (e.g. Foster and Smith, 2009; Murakoshi et al., 2013; Björkman et al., 2015).

A puzzling finding was the poor performance delivered by the commercial CpAg-ELISA used in the present study, which was able to detect only a small fraction (16%) of the microscopy-positive samples. This very same test has been previously used in similar veterinary epidemiological surveys conducted in Iran (Badiei et al., 2011) and Iraq (Al-Robaiee and Al-Farwachi, 2014). Unfortunately, no other comparative diagnostic methods were simultaneously used in those investigations, making impossible to evaluate the actual diagnostic sensitivity of the CpAg-ELISA in field conditions. A number of commercial and in-house CpAg-ELISA tests have been developed for the detection of *Cryptosporidium* in faecal material from human (Garcia and Shimizu, 1997; Chalmers et al., 2011) or animal (Kuhnert-Paul et al., 2012; Ezzaty Mirhashemi et al., 2015) origin. When compared against PCR as gold standard, enzyme immunoassays typically achieved diagnostic sensitivities in the range of 91–93%, significantly higher than those provided by the modified Ziehl-Neelsen microscopy (Chalmers et al., 2011; Kuhnert-Paul et al., 2012). Although some surveys have reported reduced capacity of ELISA to identify the presence of *Cryptosporidium* antigens in samples with low numbers of oocysts in human (Johnston et al., 2003) and animal (Ezzaty Mirhashemi et al., 2015) faecal specimens, this does not seem to be the case of our study, where a large proportion of the samples corresponded to symptomatic calves, expected to have high parasite burdens.

Bovine cryptosporidiosis is typically caused by four *Cryptosporidium* species, including *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni*, and *C. ryanae* (Xiao and Feng, 2008; Ryan et al., 2014), although *C. felis* (Cardona et al., 2015), *C. hominis* (Smith et al., 2005), *C. suis* (Fayer et al., 2006; Bodager et al., 2015), and *Cryptosporidium* pig genotype II (Langkjaer et al., 2007) have also been sporadically reported infecting cattle. Among them, *C. parvum* shows a marked host age-related susceptibility and has been identified as the most dominant *Cryptosporidium* species infecting pre-weaned calves, particularly by the subtype IIaA15G2R1, in different studies worldwide (Santin et al., 2004, 2008; Geurden et al., 2007; Wielinga et al., 2008; Rieux et al., 2013). This was indeed the case of our study, where *C. parvum* was responsible for the majority (84%) of the infections in calves in the 2–30 days age group. Interestingly all *C. parvum* isolates were assigned to IIaA16G2R1, a sub-genotype less frequently documented causing bovine infections but already described in cattle in Algeria (Baroudi et al., 2017), Belgium (Geurden et al., 2007), and Spain (Quilez et al., 2008), and in yaks in China (Mi et al., 2013). Human infections by IIaA16G2R1 have also been reported in clinical and paediatric populations in Democratic Republic of São Tomé and Príncipe (Lobo et al., 2014) and Iran (Sharbatkhori et al., 2015; Ranjbar et al., 2016), highlighting the zoonotic potential of this *C. parvum* sub-genotype. It is also worth mentioning that other members of the sub-type family IIa found infecting Algerian cattle include IIaA13G2R1 (Benhouda et al., 2017) and IIaA17G3R1 (Baroudi

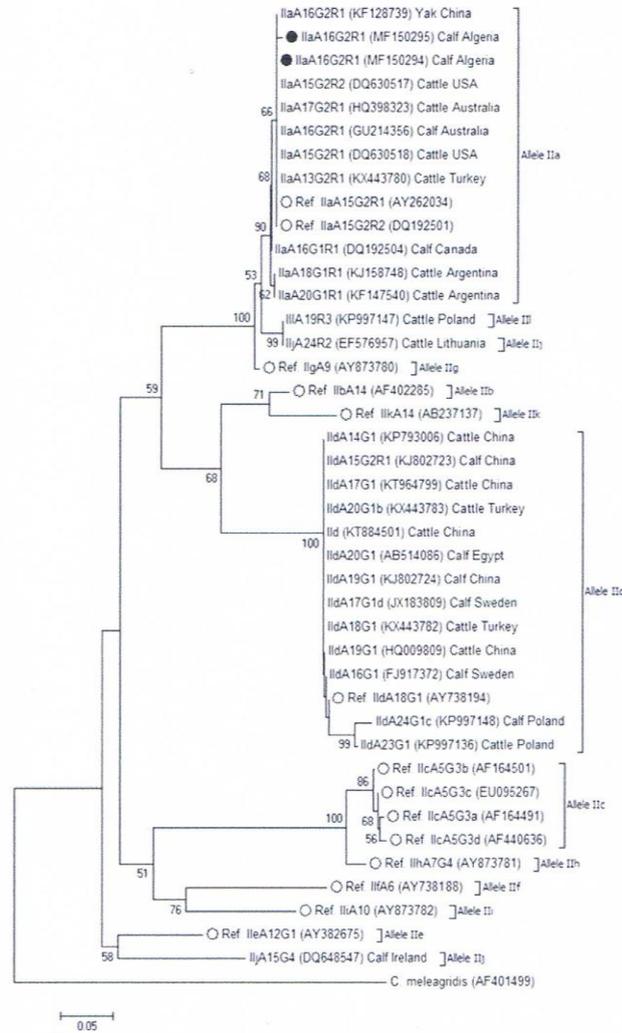


Fig. 2. Evolutionary relationships among *C. parvum* sub-genotypes at the *gp60* locus inferred by a Neighbor-Joining analysis. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 iterations) is indicated next to the branches. Bootstrap values lower than 50% were not displayed. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. The rate variation among sites was modelled with a gamma distribution (shape parameter = 2). Filled circles represent Ila sequences generated in this study. Open circles represent reference sequences extracted from GenBank. *C. parvum* sequences of bovine origin previously reported in other countries were included in the analysis for comparative purposes. *C. meleagridis* was used as outgroup taxa.

et al., 2017), whereas IlaA15G2R1 has not been identified in isolates of human or animal origin in the country to date.

In the present study *C. bovis* was, after *C. parvum*, the second most prevalent *Cryptosporidium* species circulating in cattle, being only identified in calves older than 15 days of age. This is contrast with the molecular data available in young calves (<2 months) from the province of Batna in north-eastern Algeria (Benhouada et al., 2017), where *C. bovis* (n = 14) was the most common *Cryptosporidium* species found, fol-

lowed by *C. ryanae* (n = 6) and *C. parvum* (n = 4). Additionally, we confirmed the presence of *C. ryanae* and *C. andersoni* in an asymptomatic calf and heifer, respectively. This is in line with previous surveys demonstrating that both species typically cause sub-clinical infections in cattle older than one month of age (Santin et al., 2004, 2008).

In conclusion, our results seem to indicate that bovine cryptosporidiosis is endemic in Algeria. *Cryptosporidium* infection greatly contributes to the burden of diarrhoeal disease in neonatal calves, very

likely causing severe (although still unquantified) economic losses due to morbidity and mortality. Generated molecular data evidenced the presence of potentially zoonotic *C. parvum* sub-genotypes, a finding of public health relevance taking into account the extremely high environmental load of oocysts generated by calves at the peak of the infection. This situation highlights the importance of implementing proper farm management practices to effectively reduce the *Cryptosporidium* burden on affected farms.

#### Conflict of interest

None.

#### Ethical statement

This study was carried out in compliance with the national animal welfare regulations. Diagnostic veterinary procedures are not within the context of relevant EU legislation for animal experimentation (Directive 86/609/EC) and may be performed in order to diagnose animal diseases and improve animal welfare. Faecal samples were collected by trained personnel who ensured owners consent and caused neither harm nor suffering to the investigated animals.

#### Acknowledgments

This study was funded by the Health Institute Carlos III, Ministry of Economy and Competitiveness under project CP12/03081. The authors gratefully acknowledge Dr. Anita Ginter (Bio-X Diagnostics, Rochefort, Belgium) for kindly providing the ELISA kit used in the study.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.02.005>.

#### References

- Allen, A.V., Ridley, D.S., 1970. Further observations on the formal-ether concentration technique for faecal parasites. *J. Clin. Pathol.* 23, 545–546.
- Al-Robaice, I., Al-Farwachi, M., 2014. Direct ELISA aided coprological diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection in diarrheic neonatal calves in Mosul city, Iraq. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* 1, 8–10.
- Ayinmode, A.B., Olakunle, F.B., Xiao, L., 2010. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in native calves in Nigeria. *Parasitol. Res.* 107, 1019–1021.
- Badiel, K., Pourjafar, M., Ghane, M., 2011. Detection of faecal *Cryptosporidium parvum* antigen in diarrheic Holstein dairy cows. *Trop. Biomed.* 28, 382–388.
- Baroudi, D., Khelif, D., Goucem, R., Adjou, K.T., Adamu, H., Zhang, H., Xiao, L., 2013. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Vet. Parasitol.* 196, 334–340.
- Baroudi, D., Khelif, D., Hakem, A., Abdelaziz, A., Chen, X., Lysen, C., Roellig, D., Xiao, L., 2017. Molecular characterization of zoonotic pathogens *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in calves in Algeria. *Vet. Parasitol.* 8, 66–69.
- Benhoua, D., Hakem, A., Sannella, A.R., Benhoua, A., Cacciò, S.M., 2017. First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria. *Parasite* 24, 15.
- Benouis, A., Bekkouche, Z., Benmansour, Z., 2013. Epidemiological study of human intestinal parasitosis in the Hospital of Oran (Algeria). *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 2, 613–620.
- Björkman, C., Lindström, L., Oweson, C., Ahola, H., Troell, K., Axén, C., 2015. *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves. *Parasitology* 142, 1108–1114.
- Bodager, J.R., Parsons, M.B., Wright, P.C., Rasambainarivo, F., Roellig, D., Xiao, L., Gillespie, T.R., 2015. Complex epidemiology and zoonotic potential for *Cryptosporidium suis* in rural Madagascar. *Vet. Parasitol.* 207, 140–143.
- Cardona, G.A., de Lucio, A., Bailo, B., Cano, L., de Fuentes, I., Carmena, D., 2015. Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle in Northern Spain. *Vet. Parasitol.* 209, 258–263.
- Chalmers, R.M., Campbell, B.M., Crouch, N., Charlett, A., Davies, A.P., 2011. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J. Med. Microbiol.* 60, 1598–1604.
- Ezzaty Mirhashemi, M., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F.E., Mulcahy, G., De de Waal, T., 2015. Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. *Exp. Parasitol.* 151–152, 14–20.
- 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.* 135, 105–112.
- Feltus, D.C., Giddings, C.W., Schneck, B.L., Monson, T., Warshauer, D., McEvoy, J.M., 2006. Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4303–4308.
- Foster, D.M., Smith, G.W., 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25, 13–36.
- García, L.S., Shimizu, R.Y., 1997. Evaluation of nine immunoassay kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1526–1529.
- Geurden, T., Berkvens, D., Martens, C., Casaert, S., Vercurryse, J., Claerebout, E., 2007. Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology* 134, 1981–1987.
- de Graaf, D.C., Vanopdenbosch, E., Ortega-Mora, L.M., Abbassi, H., Peeters, J.E., 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29, 1269–1287.
- Hamaidi-Chergui, F., Hamaidi, M.S., Benkhetar, M., Mahieddine, A.O., 2013. Intestinal infections in Boufarik hospital (Blida) Algeria. *Rev. Ind. Microbiol. Sanit. Environ.* 7, 73–87.
- Helmy, Y.A., Von Samson-Himmelstjerna, G., Nöckler, K., Zessin, K.H., 2015. Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals and children in the Ismailia province of Egypt. *Epidemiol. Infect.* 143, 1208–1218.
- Hocine, A.R., Bouzid, R., Ladjama, M., Khalef, D., 2016. Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in calves in two areas from Eastern Algeria. *Glob. Vet.* 17, 335–342.
- Hoek, M.R., Oliver, I., Barlow, M., Heard, L., Chalmers, R., Paynter, S., 2008. Outbreak of *Cryptosporidium parvum* among children after a school excursion to an adventure farm, south west England. *J. Water Health* 6, 333–338.
- Johnston, S.P., Ballard, M.M., Beach, M.J., Causser, L., Wilkins, P.P., 2003. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41, 623–626.
- Kinross, P., Beser, J., Troell, K., Axén, C., Björkman, C., Lebbad, M., Winiecka-Krusnell, J., Lindh, J., Löfdahl, M., 2015. *Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 143, 2748–2756.
- Kuhnert-Paul, Y., Bangoura, B., Dittmar, K., Dausgshies, A., Schmäschke, R., 2012. *Cryptosporidiosis*: comparison of three diagnostic methods and effects of storage temperature on detectability of cryptosporidia in cattle faeces. *Parasitol. Res.* 111, 165–171.
- Laatama, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Aissi, M., Rost, M., Kváč, M., 2013. Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium hedgehog* genotype in Algeria. *Vet. Parasitol.* 197, 350–353.
- Laatama, A.E., Wagnerová, P., Sak, B., Květoňová, D., Xiao, L., Rost, M., McEvoy, J., Saadi, A.R., Aissi, M., Kváč, M., 2015. Microsporidia and *Cryptosporidium* in horses and donkeys in Algeria: detection of a novel *Cryptosporidium hominis* subtype family (Ik) in a horse. *Vet. Parasitol.* 208, 135–142.
- Laatama, A.E., Holubova, N., Sak, B., Kvac, M., 2017. *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria. *Folia Parasitol.* 64.
- Langkjaer, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L., Maddox-Hyttel, C., 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology* 134, 339–350.
- Lobo, M.I., Augusto, J., Antunes, F., Ceita, J., Xiao, L., Codices, V., Matos, O., 2014. *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bieneusi* and other intestinal parasites in young children in Lobata province, Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. *PLoS One* 9, e97708.
- Marcos, L.A., Gotuzzo, E., 2013. Intestinal protozoan infections in the immunocompromised host. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 26, 295–301.
- Mi, R., Wang, X., Li, C., Huang, Y., Zhou, P., Li, Z., Lei, M., Cui, J., Chen, Z., 2013. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* in yaks in Qinghai Province of China. *PLoS One* 8, e74985.
- Murakoshi, F., Tozawa, Y., Inomata, A., Horimoto, T., Wada, Y., Kato, K., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Ishikari District, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 837–840.
- Ouchene, N., Ouchene-Khelif, N.A., Zeroual, F., Benakhlia, A., Adjou, K., 2014. Study of *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Elmeria* spp. infections in dairy cattle in Algeria. *J. Parasitol. Vector Biol.* 6, 61–65.
- Quilez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Robinson, G., Del Cacho, E., Sanchez-Acedo, C., 2008. *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology* 135, 1613–1620.
- Ranjbar, R., Baghaei, K., Nazemalhosseini Mojarad, E., 2016. Genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. among patients with gastrointestinal complaints. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.* 9, 301–307.
- Rieueux, A., Parraud, C., Pors, I., Chartier, C., 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. *Vet. Parasitol.* 197, 7–12.
- Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141, 1667–1685.
- Santin, M., 2013. Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *N. Z. Vet. J.* 61, 1–10.

- 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.* 122, 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.* 155, 15–23.
- Sharbatkhori, M., Nazemalhosseini Mojarad, E., Taghipour, N., Pagheb, A.S., Mesgarian, F., 2015. Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic children from Gonbad Kavous City, Iran. *Iran. J. Parasitol.* 10, 441–447.
- Smith, H.V., Nichols, R.A., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W.J., Browning, L.M., Gray, D., Reid, S.W., Wastling, J.M., 2005. Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. *Vet. Rec.* 156, 710–711.
- Soltane, R., Guyot, K., Dei-Cas, E., Ayadi, A., 2007. *Cryptosporidium parvum* (Eucoccidiorida: Cryptosporidiidae) in calves: results of a longitudinal study in a dairy farm in Sfax, Tunisia. *Parasite* 14, 309–312.
- Squire, S.A., Ryan, U., 2017. *Cryptosporidium* and *Giardia* in Africa: current and future challenges. *Parasit. Vectors* 10, 195.
- Striepen, B., 2013. Time to tackle cryptosporidiosis. *Nature* 503, 189–191.
- Suler, D., Mullins, D., Rudge, T., Ashurst, J., 2016. *Cryptosporidium parvum* infection following contact with livestock. *N. Am. J. Med. Sci.* 8, 323–325.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipjki, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Tiangtip, R., Jongwutiwes, S., 2002. Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Tropical Med. Int. Health* 7, 357–364.
- Wielinga, P.R., de Vries, A., van der Goot, T.H., Mank, T., Mars, M.H., Kortbeek, L.M., van der Giessen, J.W., 2008. Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in humans and cattle in The Netherlands. *Int. J. Parasitol.* 38, 809–817.
- Xiao, L., Feng, Y., 2008. Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 52, 309–323.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mallet, R., «Adaptation du traitement des diarrhées néonatales du veau à l'évaluation clinique» Veta.gro Sup Campus Vétérinaire (Novembre 2016) Thèse N°098.
2. Bendali F., Bichet H., Schelcher F., Sanaa M. «Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France». Vet. Res.; (1999).30: 61-74.
3. Scott CA, Smith HV, Mtambo MM, Gibbs HA. « An epidemiological study of *Cryptosporidium parvum* in two herds of adult beef cattle». Vet Parasito. (1995) 57(4):277-88.
4. Upton SJ, Curent WL, «The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa : Cryptosporidiidae) infecting mammals». J Parasitol. (1985); 71(5):625-9.
5. Fayer R., Ungar B.L.P, «*Cryptosporidium spp* and cryptosporidiosis» Microbiol..Rev. (1986).50(4): 458-483.
6. Monis PT, Thompson RC, «*Cryptosporidium* and Giardia-zoonoses: fact or fiction»? Infect Genet E vol. (2003) 3:233-244.
7. Ryan, U. et Power, M. «*Cryptosporidium* species in Australian wild life and domestic animals». Parasitology (2012).139, 1673–1688.
8. Ryan, U., Fayer. R., Xiao. L. «*Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs». Parasitology. (2014).141, 1667-1685.
9. Villeneuve A. «Les zoonoses parasitaires». Les Presses de l'Université de Montréal. (2003) 499 pp.
10. Robertson LJ, Bjorkman C, Axen C, Fayer R. «Cryptosporidiosis in Farmed Animals» In: CACCIO SM, WIDMER G *Cryptosporidium* : parasite and disease.(2014).Springer.
11. Fayer R, Santín M, Trout JM «*Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*) ». Vet Parasitol.(2008) 156:191–198
12. Xiao, L., Fayer, R., Ryan, U., Upton, S.J. «*Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health». Clinical Microbiology Reviews. (2004). 17, 72–97.
13. Santin., M «Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals», N. Z. Vet. J.(2013). 61, 1–10.

14. Office International des Épizooties (OIE), «Cryptosporidiose». In: Manuel Terrestre, (2008).pp. 1307-1331 (chapitre 2. 9. 4).
15. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC, Narsin D, Farag TH, Panchalingham S, Wu Y, Sow SO, Sur D, Breiman RF. «Burden and etiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries the Global Enteric Multicenter Study, GEMS» a prospective, case-control study. Lancet.(2013) 382:209–211
16. Adamu, H., Petros, B., Zhang, G., Kassa, H., Amer, S., Ye, J., Feng, Y. and Xiao, L. «Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia». PLOS Neglected Tropical diseases. (2014). 8, -2831
17. Petros B ; Wegayehu T ; Adamu H. «High Prevalence of Diarrhoeogenic Intestinal Parasite Infections among Non-ART HIV Patients in Fitcha Hospital, Ethiopia» Volume 8 ;(2013), Issue 8 - 72634.
18. Benouis, A., Bekkouche, Z., Benmansour, Z. «Epidemiological study of human intestinal parasitosis in the Hospital of Oran (Algeria)». Int. J. Innov. Appl. Stud.(2013) 2, 613–620.
19. Hamaidi-Chergui, F., Hamaidi, M.S., Benkhattar, M., Mahieddine, A.O., «Intestinal infections in Boufarik hospital (Blida) Algeria». Rev. Ind. Microbiol.Sanit. environ. (2013). 7,73–87.
20. Hocine, A.R., Bouzid, R., Ladjama, M., Khalef, D. «Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in calves in two areas from Eastern Algeria». Glob. Vet.(2016) 17, 335–342.
21. Benhouda, D., Hakem, A., Sannella, A.R., Benhouda, A., Cacciò, S.M., «First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria». Parasite (2017).24, 15.
22. Baroudi, D., Khelef, D., Hakem, A., Abdelaziz, A., Chen, X., Lysen, C., Roellig, D., Xiao, L. «Molecular characterization of zoonotic pathogens *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in calves in Algeria». Vet. Parasitol. (2017) 8, 66–69.
23. Chatelain E. «Polycopie d'anatomie : Appareil Digestif des mammifères domestiques». (1996).
24. Argenzio A. «Pathophysiology of neonatal calf diarrhea». Vet. Clin. North .Am. Food. Anim Pract.(1985). 1, 461- 469.

25. Freeman .HS, Thomson .ABR. «L'intestin grêle.In: Shaffer EA(editors). Principes Fondamentaux de Gastro-entérologie». 5ème éd, Toronto. The Medecine Group Ltd.,(2005). 199 - 292.
26. Journal JP, Besnier P, Reisdorffer L, Vallet D. «Fluidothérapie chez le Jeune veau diarrhéique». Dépêche Vet. (supplément technique),(2010). 118,35.
27. Legrand C. «Les gastro-entérites du veau» Action vét. cah. clin.(cahier clinique n°51), (2000) pp. 2-6.
28. Marcillaud S. «Lactates plasmatiques chez le veau : validation d'une technique de dosage. Intérêt dans les gastroentérites paralysantes».Thèse Méd. Vét. Toulouse. (1998), 162 p.
29. Negny V. «Acidose métabolique sans déshydratation avec accumulation de D-lactates chez le veau nouveau-né». Thèse Méd. Vét. Toulouse.(2002). 54p.
30. Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E. «Enterobacteriaceae. In: Veterinary microbiology and microbiology disease». Carlton (Victoria, Australia): Blackwell Science Ltd., (2002) 106-123.
31. Smith, H., «Diagnostics. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis». CRC Press, Boca Raton, FL, (2008).pp. 173–207.
32. Ravary B., Sattler N. & Roch N. «Troubles de l'adaptation à la vie aérienne : anoxie, hypoxie et hypothermie néonatales» Dans : Néonatalogie du veau. Rueil-malmaison : Editions du point vétérinaire, (2006). pp. 81-103
33. Izzo M, Gunn AA, Housse JK. «Neonatal diarrhea. In : SMITH BP Large animal internal medicine». 5th edition. Elsevier. (2015). 1661 p.
34. Ravary-Plumioen B, «Maladies Intestinales du veau en période néonatale. In FRANCOZ D, COUTURE Y Manuel De médecine des bovins ». Med'com. (2014) 672--685.
35. Spieser F. «Utilisation des tests rapides diagnostiques en clientèle bovine : Intérêts et limites ». In: Journées Nationales des GTV–REIMS, 21-23 Mai (2014), 125-133.
36. Assies. S, Douart. A. « Les points clés sur les diarrhées virales des veaux». Nouv Prat vét élevage et santé, (2007). (4), 9-12.
37. Millemann Y., Maillard R., «Les agents entéropathogènes du veau». Point Vét., (2007). 38,53 - 60.
38. Blanchard. PC «Diagnostics of dairy and beef cattle diarrhea». Vet Clin North Am Food Anim Pract., (2012).(28), 443-464.

39. Royal.S. «Détection et caractérisation moléculaire de *Cryptosporidium* lors de diarrhées chez le veau non sevré dans une clientèle allaitante». VetaGro Sup Campus vétérinaire de Lyon. thèse docteur vétérinaire.(2015).
40. Chauvin A, Assie S. «La Giardiose et les diarrhées néonatales des veaux». Nouv. Prat. Vét. élevages et santé, (2007). (4), 21-22.
41. Trout JM, Santin M, Greiner E, Fayer R. « Prevalence of *Giardia duodenalis* genotypes in pre-weaned dairy calves». Vet Parasitol., (2004) .124(3-4), 179-186.
42. Halos L, Polack B. «Parasitoses digestives du veau de la naissance au sevrage». Point Vét., 38, Numéro Spécial.(2007). 35-43.
43. Wyatt CR, Riggs MW, Fayer R. «Cryptosporidiosis in neonatal calves». Vet.Clin. North.Am.Food.Anim.Pract., (2010). 26,89–103.
44. Mele R, Gomez Morales MA, Tosini F, Pozio E. «Cryptosporidium parvum a different developmental stages modulates host cell apoptosis in vitro». Infect. Immun.(2004) 72, 6061–6067.
45. Foster DM, Smith GW. « Pathophysiology of diarrhea in calves». Vet. Clin North. Am: Food. Anim. Pract., (2009).25,13–36.
46. Blikslager A, Hunt E, Guerrant R, Rhoads M, Argenzio R. «Glutamine transporter in crypts compensates for loss of villus absorption in bovine! cryptosporidiosis». Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver.Physiol.,(2001). 281,645-53.
47. Argenzio RA, Lecce J, Powell DW. « Prostanoids inhibit intestinal NaCl absorption in experimental porcine cryptosporidiosis». Gastroenterology,(1993).104,440–447.
48. Klein, P., Kleinova, T., Volek, Z., Simunek, J., « Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves ». Veterinary Parasitology (2008). 152, 53- 59.
49. Tzipori S. « Introduction Cryptosporidiosis: current trends and challenges». Microbes Infect .(2002) 4:1045.
50. Clark, D.P., Sears, C.L. «The pathogenesis of cryptosporidiosis». Parasitology Today (1996) 12, 221-225.
51. Tyzzer EE . « A sporozoan found in the peptic glands of Common mouse». Proc Soc Exp Biol Med., (1907). 5, 1907, 12-13.

52. Fayer R. «*Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite». Vet Parasitol.,(2004). 126, 37-56.
53. Tzipori S, Widmer G. «A hundred-year retrospective on Cryptosporidiosis». Trends Parasitol.,(2008)24(4), 184-189.
54. Fayer R. «Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*». Exp. Parasitol., (2010) 124, 90-97.
55. O'Donoghue PJ. «*Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in Man and Animals». Int. J. Parasitol., (1995) 25, 139-195.
56. Bonnin A, Camerlynck P. «Cryptosporidiose humaine - Aspects épidémiologiques et cliniques». Méd. Maladies Infect., (1989)19, 35-41.
57. Guyot K, Sarfati C, Deroui F. « Actualités sur l'épidémiologie et le diagnostic de la cryptosporidiose ». Feuilles Biol., (2012).304, 21-29.
58. Xiao L. «Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update». Exp Parasitol (2010) 124:80-89.
59. Carreno RA, Martin DS, Barta JR. «*Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences». Parasitol Res., (1999).85, 899-904.
60. Templeton TJ., Enomoto S, Chen WJ, Huang CG, Lancto CA, Abrahamsen S «A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*». Mol Biol Evol., (2010). 27(2), 235-248.
61. Zahedi, A., Papparini, A., Jian, F., Robertson, I., Ryan, U.«Public health significance of zoonotic *Cryptosporidium* species in wildlife: critical insights into better drinking water management ». International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. (2016) 5, 88–109.
62. Ryan, U., Xiao, L. «Taxonomy and Molecular Taxonomy. *Cryptosporidium*: parasite and disease». Springer Vienna. Springer Link,; (2014). 3-41.
63. Leander, B.S, Clopton, R.E, Keeling, P.J. «Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin ». Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (2003). 53, 345-354.
64. Barta, J.R., Thompson, R.C.A. « What is *Cryptosporidium*? Reappraising its biology and phylogenetic affinities». Trends Parasitol.(2006) 22, 463–468.

65. Valigurova, A., Hofmannova, L., Koudela, B., Vavra, J., «An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*». J. Eukaryot. Microbiol. (2007)54, 495-510.
66. Leconte M. «Le point sur la cryptosporidiose des Ruminants et les risques zoonotiques». Thèse Méd. Vét., Alfort.(2013).
67. Li, X., Pereira, Md., Larsen, R., Xiao, C., Phillips, R., Striby, K., McCowan, B., Atwill, E.R. «*Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple *Spermophilus* ground squirrel species ». International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. (2015).4, 343-350.
68. Costa, J., Cristina, C., Eiras, J.C., Saraiva, A. «Characterization of a *Cryptosporidium* scophthalmi-like isolate from farmed turbot (*Scophthalmus maximus*) using histological and molecular tools». Dis. Aquat. Org. (in press).(2016)
69. Ryan, U., Paparini, A., Tong, K., Yang, R., Gibson-Kueh, S., O'Hara, A., Lymbery, A., Xiao, L., «*Cryptosporidium huwin*. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*) ». Exp Parasitol .( 2015). 150, 31-35.
70. Holubova, N., Sak, B., Horcickova, M., Hlaskova, L., Kvetonova, D., Menchaca, S., McEvoy, J., Kvac, M. «*Cryptosporidium avium* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds». Parasitol. Res. ( 2016) .115 (6), 2243-2251.
71. Kváč M, Havrdová N, Hlásková L, Daňová T, Kanděra J, Ježková J, Vítovec J, Sak B, Ortega Y, Xiao L, Modrý D, Chelladurai JR, Prantlová V and McEvoy J «*Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals». PLoS ONE.(2016) 11, 0147090.
72. Wang, R., Qiu, S., Jian, F., Zhang, S., Shen, Y., Zhang, L., Ning, C., Cao, J., Qi, M. and Xiao, L. « Prevalence and molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in pigs in Henan, China ». Parasitology Research.(2010 b). 107,1489-1494
73. Morgan UM, Deplazes P, Forbes DA, Spano F, Hertzberg H, Sargent KD, Elliot A, Thompson RCA. «Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed Spacers of the rDNA repeat unit isolates of *Cryptosporidium* from different hosts». Parasitol.(1999); 118:49-58.

74. Xiao, L., Bern, C., Arrowood, M., Sulaiman, I., Zhou, L., Kawai, V., Vivar, A., Lal, A.A., Gilman, R.H., «Identification of the *Cryptosporidium pig* genotype in a human patient » J. Infect. Dis. (2002) 185, 1846–1848.
75. Xiao, L., Ryan, U. M., «Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology». Curr. Opin. Infect. Dis.(2004) 17, 483-490.
76. Fayer, R., Santin, M., Xiao, L. «*Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*) ». J Parasitol (2005) 91, 624-629.
77. Pedraza-Díaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley PJ, McLauchlin J. Unusual «*Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* "dog type" from patients in England». J Med Microbiol. (2001); 50:293-296.
78. Lindsay, D.S., Upton, S.J., Owens, D.S., Morgan, U.M., Mead, J.R., Blagburn, B.L. «*Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cattle, *Bos taurus*». J Eukaryot Microbiol (2000).47, 91-95.
79. Angus KW. «Cryptosporidiosis in man, domestic animals and birds». J R Soc Med.(1983); 76(1):62-70.
80. Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, Mcinnes L, Traub R, Besier B. «Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites». Appl Environ Microbiol. (2005); 71(9):4992–7.
81. Anderson BC. « Abomassal cryptosporidiosis in cattle». Vet Parasitol. (1987); 24:235-8.
82. Bornay-Llinares, F.J., da Silva, A.J., Moura, I.N., Myjak, P., Pietkiewicz, H., Kruminis-Lozowska, W., Graczyk, T.K., Pieniazek, N.J. «Identification of *Cryptosporidium felis* in a cow by morphologic and molecular methods». 1Appl. Environ. Microbiol. (1999). 65, 1455-1458.
83. Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, G., Thompson, R.C. «Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens» clinical trial. J.Clin. Microbiol.(1998) 36, 995-998
84. Santín M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R. «Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves». Vet Parasitol (2004) .122:103–117.

85. Ong C, Eisler DL, Alikhani A, Fung VWK, Tomblin J, Bowie WR, Isaac-Renton, JL. Novel .«*Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype». Emerg Infect Dis.(2002);8(3):263-8.
86. Kvac M, Ditrich O, Kouba M, Sak B, Vitovec J, Kvetonova D. «Failed attempt of *Cryptosporidium andersoni* infection in lambs. Fol Parasitol (Praha)». (2004), 51(4):373-4.
87. Akiyoshi DE, Dilo J, Pearson C, Chapman S Turnwine J, Tzipori S.« Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species». Infect Immun. (2003);71(4):1828-32.
88. Kváč, M., Kestřánová, M., Pinková, M., Květoňová, D., Kalinová, J., Wagnerová, P., Kotková, M., Vitovec, J., Ditrich, O., McEvoy, J., Stenger, B., Sak, B. «*Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*)». Vet. Parasitol. (2013)191, 218-227.
89. Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM. «Evidence Supporting Zoonotic Transmission of *Cryptosporidium spp.* in Wisconsin». J Clin Microbiol.(2006); 44(12):4303-8.
90. Satoh M, Hikosaka K, Sasaki T,utama Y, Yanai T, Ohta M, Nakai Y. «Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni* ». Appl Environ Microbiol. (2003); 69(1):691-2.
91. Xiao, L., Fayer, R. «Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission ». Int. J. Parasitol. (2008). 38, 1239-1255.
92. Chartier, C., Paraud, C., «La cryptosporidiose des ruminants». Bulletin des GTV, Février (2010).n° 52.
93. Carey, C. M., H. Lee, And J. Revors T. T. « Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts». Water Research (2004).38: 818–862.
94. Fayer, R., Santin, M. «*Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (Ovisaries) » Vet. Parasitol. (2009) 164, 192-200.
95. Paraud, C., Chartier, C. « Cryptosporidiosis in small ruminants». Rumin. Res. (2012) 103, 93-97.

96. Fayer R, Santin M, Dargatz D. « Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States». *Vet. Parasitol.* (2010) 164,192- 200.
97. Chalmers, R.M., Elwin, K., Hadfield, S.J., Robinson, G. «Sporadic human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom»,. *Emerg. Infect. Dis.* 2007-2008. (2011 a) 17, 536-538.
98. Fayer, R., Xiao, L., «*Cryptosporidium* and cryptosporidiosis» .Second ed. CRC Press, Boca Raton. (2007).
99. Fujino Matsui T, Kobayashi F, Haruki K, Yoshino Y, Kajima J, Tsuji M. «The effect Of heating against *Cryptosporidium* oocysts ». *J Vet Med Sci.*(2003);64(3):199-200.
100. Fayer R, Graczyk TK, Cranfield MR, Trout JM. Gaseous. « desinfection of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* (1996); 62(10):3908-9.
101. Current, W.L., Garcia, L.S. « Cryptosporidiosis ». *Clin. Lab. Med.* (1991a). 11,873 897.
102. Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V. «Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures». *Appl. Environ. Microbiol.* (1992) 58, 3494-3500.
103. Faubert GM, Litvinski Y. «Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm». *J Parasitol.*; (2000) 83(3):495-500.
104. Scott, C.A., Smith, H.V., Gibbs, H.A., «Excretion of *Cryptosporidium parvum* oocysts by a herd of beef suckler cows». *Vet Rec.* (1994); 134:172.
105. Wade SE, Mohammed HO, Schaaf SL. «Prevalence of *Giardia* sp., *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium muris* in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York » *Vet. Parasitol.* (2000) .93:1-11.
106. Centers for disease control and prevention «Cycle biologique de *Cryptosporidium*»..(2015). <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp>.
107. Current W, Garcia LS.« Cryptosporidiosis. ». *Clin. Microbiol. Rev* 4:325–358.Modifié par Bouzid, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., «*Cryptosporidium* pathogenicity and virulence».. *Clin. Microbiol. Rev.* (2013). 26, 115–134.

108. Chalmers, R.M., Davies, A.P. «Minireview: clinical cryptosporidiosis». *Exp. Parasitol.* (2010).124, 138-146.
109. Borowski H., Thompson R.C.A., Armstrong T. ; Clode P. L. «Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an in vitro model system». (2009) p :16
110. Certad G. « De la caractérisation génétique et phénotypique de *Cryptosporidium* (Alveolata : Apicomplexa) à la mise en évidence du rôle de *Cryptosporidium parvum* dans l'induction de néoplasie digestive». (2008) Université de Lille 2.
111. Valigurova A, Jirků M, Koudela B, «Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane». *International journal for parasitology*, (2008) 38 (8-9), 913–22.
112. Leitch GJ and He Q. «Cryptosporidiosis-an overview» *Journal of biomedical research*, (2012) 25(1), 1–16.
113. Jenkins, M. B., Liotta, J. L., Lucio-Forster, A. and Bowman, D. D. «Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal plain Watersheds of Georgia. ». *Applied and Environmental Microbiology*, (2010). 76, 5757–5763.
114. DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W.«The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy Volunteers» *N. Engl. J. Med.*(1995). 332, 855-859.
115. Matsui, T, Fujino, T, Tsuji, M.«Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*». *J. Vet. Med. Sci.*(1999) . 61, 471-4.
116. Iseki, M. « *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat. ». *Jpn. J. Parasitol.*(1979) 28, 285-307.
117. Current, W.L., Reese, N.C., «A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice».. *J. Protozool.* (1986).33, 98-108.
118. Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO. «Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia spp* cysts shed by dairy calves after natural infection». *Am J Vet Res* (2001). 62:1612–1615.

119. Zambriski JA, Nydam DV, Bowman DD, Bellosa ML, Burton AJ, Linden TC, Liotta JL, Ollivett TL, Tondello-Martins L, Mohammed HO. «Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves». Parasitol Res.(2013) 112:1247–1254
120. O’Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Ols ME. «Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis dairy calves and their association with diarrhea. ». J Am Vet Med Assoc. (1999); 214(3):391-6.
121. Campbell, I., Tzipori, S., Hutchinson G., Angus, K.W. « Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts». Vet. Rec. . (1982) 111, 414-415.
122. Chalmers RM, Giles M. « Zoonotic cryptosporidiosis in the UK-challenges for control. ». J Appl Microbiol (2010) 109:1487–1497
123. Atwill, E.R., Hou, L., Karle, B.M., Harter, T., Tate, K.W., Dahlgren, R.A. «Transport of *Cryptosporidium parvum* oocysts through vegetated buffer strips and estimated filtration efficiency ». Appl. Environ. Microbiol. (2002). 68, 5517-5527
124. Betancourt, W.Q., Rose, J.B.,. «Microbiological assessment of ambient waters and proposed water sources for restoration of a Florida wetland». J. Water. Health. .(2005) 3, 89-100.
125. Ripert, C., Guyot, K. «Cryptosporidiose. In Epidémiologie des maladies parasitaires». vol. 3, (2003). pp. 269-297. Editions médicales internationales
126. López-Vélez, R., Tarazona, R., Garcia Camacho, A., Gomez-Mampaso, E., Guerrero, A., Moreira, V., Villanueva, R. «Intestinal and extra-intestinal cryptosporidiosis in AIDS patients ».J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. (1995). 14, 677-681
127. De Souza Ldo, R., Rodrigues, M.A., Morceli, J., Kemp, R., Mendes, R.P., «Cryptosporidiosis of the biliary tract mimicking pancreatic cancer in an AIDS patient ». Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (2004).37, 182-185.
128. O’Handley RM, Olson ME. «Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants».. Vet Clin Food Anim., (2006).22, 623–643
129. Noordeen, F., Rajapakse, R.P.V.J., Horadagoda, N.U., Abdoul Careem, Arulkanthan, A., M.F. «*Cryptosporidium*, an important enteric pathogen in goats».-A review. Small..Rumin. Res. (2012) 106, 77-82.

130. Certad, G., Benamrouz, S., Guyot, K., Mouray, A., Chassat, T., Flament, N., Delhaes, L., Coiteux, V., Delaire, B., Praet, M., Cuvelier, C., Gosset, P., DeiCas, E., Creusy, C., «Fulminant cryptosporidiosis after near-drowning: a human *Cryptosporidium parvum* strain implicated in invasive gastrointestinal adenocarcinoma and cholangiocarcinoma in an experimental model». *Appl. Environ. Microbiol.* (2012).78, 1746-1751
131. Abdou, A.G., Harba, N.M., Afifi, A.F., Elnaidany, N.F. «Assessment of *Cryptosporidium parvum* infection in immunocompetent and immunocompromised mice and its role in triggering intestinal dysplasia». *Int. Infect. Dis.* (2013). 17, 593-600.
132. Afssa. « Rapport sur les infections à protozoaires liées aux aliments et à l'eau: évaluation scientifique des risques associés à *Cryptosporidium sp.* ». ,( 2002)
133. King, B.J., Monis, P.T. « Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment»... *Parasitology* (2007)134, 309 e 323
134. Fayer R, Morgan U and Upton SJ. « Epidemiology of *Cryptosporidium* : transmission, detection and identification. ». *International Journal for Parasitology*, (2000) 30(12-13), 1305–1322.
135. Pohlenz, J., H.W. Moon, N.F. Cheville, and W.J. Bemrick. « Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves». *J. Am. Vet. Med. Assoc.* .(1978). 172 : 452- 457
136. Ralston, B., Thompson, R.C., Pethick, D., McAllister, T.A., Olson, M.E.,. «*Cryptosporidium andersoni* in Western Australian feedlot cattle. ». *Aust. Vet. J.* (2010) 1430,88, 458–460.
137. De Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. A. «Review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals».. *Int J Parasitol.* (1999). 29 (8):1269-87.
138. Cardona GA, De Lucio A, Bailo B, Cano L, De Fuentes I, Carmena D. «Unexpected finding of feline-specific *Giardia duodenalis* assemblage F and *Cryptosporidium felis* in asymptomatic adult cattle». In Northern Spain.*Vet Parasitol.*, (2015). 209, 258-263.
139. Sanford SE, Josephson GKA. «Bovine cryptosporidiosis: clinical and pathological findings in 42 scouring neonatal calves. ». *Can Vet J.* (1982); 23(12):343-7.

140. Naciri M, Lefay M-P, Mancassola R, Poirier P, Chermette R. « Role of *Cryptosporidium parvum* as a pathogen in neonatal diarrhoea complex in suckling and dairy calves in France. ». Vet Parasitol. (1999); 85:245-57.
141. Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, Canals A, Almeria S, Zarlenga D. « *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns». Int J Parasitol. (1998); 28:49-56
142. Castro-Hermida JA, González-Losada YA, Ares-Mazàs E. «Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine cryptosporidiosis in Galicia (N.W.Spain) ». Vet Parasitol.( 2002); 106:1-10.
143. Castro-Hermida JA, Yolanda A, González-Losada YA, Mercedes M-M, Ares-Mazàs E. «A study of cryptosporidiosis in a cohort of neonatal calves. ». Vet Parasitol. (2002);106:11-7.
144. Naciri M, Lacroix-Lamande S, Laurent F. « La cryptosporidiose chez les jeunes ruminants non sevrés le pouvoir pathogène de *Cryptosporidium parvum*. ». Nouv Pract Vét élevage et santé, (2007). (4), 15-20.
145. Barnes, D.A., Bonnin, A., Huang, J.X., Gousset, L., Wu, J., Gut, J., Doyle, P., Dubremetz, J.F., Ward, H., Petersen, C. «A novel multi-domain mucin-like glycoprotein of *Cryptosporidium parvum* mediates invasion».. Mol Biochem Parasitol (1998). 96, 93-110.
146. Cevallos, A.M., Zhang, X., Waldor, M.K., Jaison, S., Zhou, X., Tzipori, S., Neutra, M.R.,Ward, H.D.«Molecular cloning and expression of a gene encoding *Cryptosporidium parvum* glycoproteins gp40 and gp15. ».Infect Immun.(2000) 68, 4108-4116.
147. Thompson, R.C.A. « Molecular epidemiology of Giardia and *Cryptosporidium* infections». J. Parasitol. (2003) 89, S134–S140.
148. McDonald, V., Deer, R., Uni, S., Iseki, M., Bancroft, G.J. « Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice».Infect Immun (1992). 60,3325- 3331
149. Riggs, M. W. « Recent advances in cryptosporidiosis: the immune response». Microbes Infect.(2002). 4(10),1067-80
150. Bailenger, J. « Diagnostic pratique de la cryptosporidiose». Feuillet de Biologie XXVII, »..(1986) 45-48.

151. Trotz-Williams, L.A., Wayne Martin, S., Leslie, K.E., Duffield, T., Nydam, D.V., Peregrine, A.S. «Calf level risk factors for neonatal diarrhea and shedding of *Cryptosporidium parvum* in Ontario dairy calves». *Prev. Vet. Med.* (2007).82,12-28
152. Delafosse A., Chartier C., Dupuy M.C., Dumoulin M., Pors I., Paraud C. «*Cryptosporidium parvum* infection and associated risk factors in dairy calves in Western France. ». *Prev Vet Med.*, (2015). 118, 406-412.
153. Santín, M., Trout, J.M., Fayer, R., « A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age». *Vet. Parasitol.* (2008). 155, 15-23.
154. Fayer, R., Santin, M. « *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*) » *Vet. Parasitol.* (2009). 164, 192–200
155. Paraud, C., Pors, I., Chartier, C. « Evaluation of oral tilmicosin efficacy against severe cryptosporidiosis in neonatal kids under field conditions». *Vet. Parasitol.* (2010) 170, 149–152.
156. Silverlås, C., de Verdier, K., Emanuelson, U., Mattsson, J.G., Björkman, C. «*Cryptosporidium* infection in herds with and without calf diarrhoeal problems». *Parasitol. Res.* (2010 b) 107, 1435-1444.
157. Geurden, T., Berkvens, D., Martens, C., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E. «Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium » *Parasitology.* (2007) 134, 1981-1987
158. Becher, K.A., Robertson, I.D., Fraser, D.M., Palmer, D.G., Thompson, R.C.,. «Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy Calves originating from three sources in Western Australia» *Vet. Parasitol.* (2004)123,1-9
159. Mendonça, C., Almeida, A., Castro,A., Delgado, M.L., Soares, S., Correia da Costa, J.M., Canada, N.,. «Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal » (2007). *Vet. Parasitol.* 147, 47–50
160. Paraud, C., Guyot, K., Chartier, C., «.Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium sp.* infection in calves, lambs and goat kids reared in a same farm in France. III International *Giardia* and *Cryptosporidium*» Conference, 11-15 October (2009), Orvieto, Italy.
161. Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., Greiner, E., «.Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States » (2006). *Vet. Parasitol.* 135, 105-112.

162. Alves M, Xiao L, Sulaiman I, Altaf A, Lal OM, Antunes F. «Subgenotype Analysis of *Cryptosporidium* Isolates from Humans, Cattle, and Zoo Ruminants in Portugal». J Clin Microbiol. (2003); 41(6):2744-7.
163. Xiao, L., Zhou, L., Santín, M., Yang, W., and Fayer, R.,. «Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in eastern United States» Parasitol. Res. (2007). 100, 701-706.
164. Tanriverdi, S., Markovics, A., Arlsan, M.O., Itik, A., Shkap, V., Widmer, G., «Emergence of distinct genotypes of *Cryptosporidium parvum* in structured host population. » Appl. Environ. Microbiol. (2006) 72, 2507-2513.
165. Wielinga, P.R., de Vries, A., van der Goot, T.H., Mank, T., Mars, M.H., Kortbeek, L.M., van der Giessen, J.W.,.Molecular epidemiology of *Cryptosporidium* in human and cattle in the Netherlands» Int. J.parasitol. (2008). 38, 809-817.
166. Fayer, R, Ungar, B.L.P, Blagburn, B,. «Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves» J. Parasitol. (1989). 75, 393- 397.
167. Moore, D.A., Atwill, E.R., Kirk, J.H., Brahmbhatt, D., Alonso, L.H., Hou, L., Singer, M.D., Miller, T.D., «Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves » J of the Am. Vet. Med. Ass. (2003). 223, 839-845.
168. Anderson BC. «Cryptosporidiosis in bovine and human health». J Dairy Sci. (1998) ;81: 3038-41
169. Paoletti, A «Données récentes sur la transmission des cryptosporidioses animales à l'Homme» Thèse Méd. Vét., Toulouse. (2002).
170. Maldonado-Camargo S, Atwill ER, Saltijeral-Oaxaca JA, Herrera-Alonso LC. «Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Friesian dairy calves in central Mexico». Prev Vet Med.(1998);36:95-107.
171. Barwick RS, Mohammed HO, White, ME, Bryant RB. «Factors associated with The likelihood of Giardia spp. and *Cryptosporidium spp.* in soil from dairy farms». J of Dairy Sci. (2003); 86:784-91.
172. Clavel A, Doiz O, Santiago M, Varea M, Seral C, Castillo FJ, Fleita J, Rubio C,Gomez-Lus R. «House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*. » Folia Parasitol. (2002); 49:163-4.

173. Allen, A.V.H, Ridley, D.S, «Further observations on the formol ether concentration technique for fecal parasites» J. Clin. Pathol. (1970). 23, 545-546.
174. Casemore, D.P, Armstrong, M, Sands, R.L, «Laboratory diagnosis of Cryptosporidiosis» J. Clin. Pathol. (1985)..38, 1337-1341.
175. Achir, I,. «La coprologie parasitaire. Grand cours, » Institut Pasteur d'Algérie. Laboratoire de parasitologie mycologie Pr. B. Hamrioui, CHU Mustapha. (2004),
176. Abbassi, H, Wyers, M, Cabaret, J, Naciri, M,. «. Rapid detection and quantification of *Cryptosporidium baileyi* oocysts in feces and organs of chickens using a microscopic slide flotation method». Parasitol. Res. (2000) 86, 179-187.
177. Henriksen, S.A, Pohlenz, J.F.L,. «.Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. » Acta Vet. Scand. (1981) 22, 594-6.
178. Tounsi, L, « Recherche de *Cryptosporidium* dans les diarrhées du CHU de Beni Messous. » (2001).Mémoire de Résidanat
179. Ma, P, Villanueva, T.G, Kaufman, D, Gillooley, J.F, «..Respiratory cryptosporidiosis in the acquired immunodeficiency syndrome. Use of modified cold Kinyoun and hemacolor strains for rapid diagnoses » J. Am. Med. Assoc. (1984). 252, 1298-1301.
180. Current, W.L, «.Technique and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In : Cryptosporidiosis of man and animals» (Ed. Dubey JP, Speer CA, Fayer R).CRC. Press. Boston : (1990). 31-50.
181. Aarnaes SL, Blanding J, Speier S, Forthal D, de la Maza LM, Peterson EM. «.Comparison of the ProSpec T and Color Vue enzyme-linked immunoassays for the detection of *Cryptosporidium* in stool specimens. Diagn microbiol infect» dis. (1994);19(4):221-5.
182. Acha, P.N, Szyfres, B,. «.Cryptosporidiose. Zoonoses et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux» Office International des Épizooties, 2ème éd. (1989). 634-637.
183. Mosele, D,. « Les cryptosporidioses aviaires: Synthèse bibliographique» Thèse de Doctorat Vétérinaire. ENV-Alfort, Université de Créteil, (1998). 89 p.

184. Hallier-Soulier S, Guillot E. «.Detection of cryptosporidia and *Cryptosporidium parvum* oocysts in environmental water samples by immunomagnetic separation-polymerase chain reaction». J Appl Microbiol. (2000); 89 (1):5-10.
185. Bialek R, Binder N, Dietz K, Joachim A, Knobloch J, Zelck UE. «.Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. Diagn microbiol infect dis. » (2002); 43:283-8.
186. David F et Urlotte T « An Isothermal Amplification Methodes ». comptes-rendu de l'Académie des Sciences. (2002) ; 321 :909-914.
187. Ecole Doctorale Sciences de la Vie et Santé ULP Opération OpenLAB 1 PCR (Polymerase Chain Reaction)
188. Juzan L., Pernelle.J. J., Dabert P. «. Les outils de la biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées» (2012) Sciences Eaux & Territoires n°09
189. Magniez Frédéric. «. La PCR. Biotechnologies », (25 Février 2008)
190. Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thomson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., «.Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. » Appl. Environ. Microbiol. (1999). 65, 3386-3391
191. Feng, Y., Ortega, Y., He, G., Das, P., Xu, M., Zhang, X., Fayer, R., Gatei, W., Cama, V., Xiao, L., «.Wide geographic distribution of *Cryptosporidium parvum* and deer like genotype in bovines. » (2007) Vet. Parasitol.144, 1-9.
192. Vincent Ranwez «.Méthodes efficaces pour reconstruire de grandes phylogénies suivant le principe du maximum de vraisemblance, ». (2013)
193. Robertson LJ, Bjorkman C, Axen C, Fayer R. «Cryptosporidiosis in Farmed Animals. In: CACCIO SM, WIDMER G *Cryptosporidium*: parasite and disease. » Springer.(2014),
194. Fayer, R, Ungar, B.L.P, Blagburn, B,. «. Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves» J. Parasitol. (1989). 75, 393- 397.
195. Vallet A ; Houdoy D. «Le logement des veaux nouveau-nés en élevage allaitant» Bulletin GTV .2B : (1985) 33-45.135
196. Boussena S ; Sfaksi A. «.Incidence et étiologie des entérites néonatales du veau nouveau-né dans l'Est Algérien. » Sciences & technologie. C. Biotechnologies. Volume O, N° 30, (Décembre 2009) p :16-21

197. Rousseau F. «Comité interprofessionnel "veau sous la mère» (Décembre 2006) p :2
198. Navetat H., Rizet C. ; Meyus A., Foucras G. ; Schelcher. «La réhydratation du veau : présentation d'un système expert » Bull. Acad. Vet .France .V.160, N° 4, (2007) 325-330
199. Trou G. « Comprendre les facteurs de risques dans son propre élevage, mortalité des veaux pas de fatalité mais des solutions » dossier 19 ; Agriculteurs de Bretagne, chambre d'agriculture du Finistère. (16 novembre 2016)
200. Waltner –Toews D ; Martin SW ; Meek AH. «Dairy calf managment, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds » Prev. vet. Med . (1986).4 : 103-171
201. Bonal C ; Moussa A. «Les entérites néonatales virales du veau. Le point Vétérinaire. » (1993). 25 : 33-38.
202. Schelcher F. ; De Rycke J., Martel JL Valarcher JF. ; Espinasse J. «.Diarrhées colibacillaires néonatales du veau» .Le point vétérinaire.(1993) 25 : 19-31
203. Roy JHB . «.The calf» .5th Edit. Vol.1 : Managment of the Health . Birtsh Library Cataloguing in Publication Data . Vol 1 : (1990) 1-117
204. Clement J.C. ; King ME. ; Salman MD. ; Wittum TE. ; Casper HH. ; Oddek KG. ; «Use of epidemiologic priciples to identify risk factors associated with the development of diarrhea in calves in five beef herd» I. Am. Vet. Med. Assoc. (1995). 207 (10): 1334-1338.
205. Constable P.D; «.Antimicrobial use in the treatment of calf diarrhoea » j.vet.Intern. Med., (2004). 18, 8-17
206. Selles S.M.A., Niar A, « Prévalence de quelques agents entéropathogènes associés aux diarrhées néonatales du veau âgé de 1 à 30 jours dans la région de Tiaret », Les Maladies Infectieuses des Bovins E.N.S.V. (2009). 18- 19 .
207. Guy M. A., Mcfadden T. B., Cockrell D. C., Besser T. E. '« Regulation of colostrums formation in beef and dairy cows» (1994). J. Dairy Sci., 77, 3002.
208. Atwill, E.R., Johnson, E., Klingborg, D.J., Vesperat, G.M.,Markegard, G., Jensen,W.A., Pratt, D.W., Delmas, R.E.,George, H.A., Forero, L.C., Phillips, R.L., Barry S.J. ;McDougald, N.K., Gildersleeve, R.R., Frost,W.E. « Age geographic and temporal distribution of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cow–calf herds ». Am. J. Vet. Res. (1999). 60, 420–425.

209. Huetink R.E.C., Giessen J.W. Bvd., Noordhuizen J.P.T.M., Ploeger H.W «Epidemiology of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* on a dairy farm » Vet. Parasitol., (2001).102 , 53- 67
210. Naciri M., Lacroix S., Laurent F. « La Cryptosporidiose des ruminants.1ère partie. ». L'Action Vétérinaire, (2000). n° 1536. 17-23
211. Morin, R.,. «.Cryptosporidiose chez les ruminants. » [www.bibli.vet-nantes.fr.thèse](http://www.bibli.vet-nantes.fr.thèse). (2002) 02-148. biblio.Pdf.
212. Heath, H.E. « Neonatal diarrhea in calves: investigation of herd management practices ». Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. (1992),14, 385–395.
213. Garber, L.P., Salman, M.D., Hurd, H.S., Keefe, T., Schater, J.L. «Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves ». J. Am. Vet. Med. Assoc. (1994).205, 86–91.
214. Quigley, J.D., Martin, K.R., Bemis, D.A., Potgiete, L.N.D., Reinemeyer, C.R., Rohrbach, B.W., Dowlen, H.H.,Lamar, K.C. « Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves ». J. Dairy Sci. (1994).77, 3124–3131.
215. Mohammed, H.O., Wade, S.E., Schaaf, S. « Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in south eastern New York State ». Vet. Parasitol. (1999).83, 1–13.
216. Lorenz I . « Diarrhoea of the young calfan update » In Proceeding of the XXIVth World Buiatrics Congress, Nice. France, ,(2006)pp. 130-138
217. Kinross, P., Beser, J., Troell, K., Axén, C., Björkman, C., Lebbad, M., Winiecka-Krusnell, J., Lindh, J., Löfdahl, M., «.*Cryptosporidium parvum* infections in a cohort of veterinary students in Sweden». Epidemiol. Infect.( 2015).143, 2748–2756.
218. Kuhnert-Paul, Y., Bangoura, B., Dittmar, K., Daugshies, A., Schmäschke Suler, D., Mullins, D., Rudge, T., Ashurst, J., «*Cryptosporidium parvum* infection following contact with livestock. ».N. Am. J. Med. Sci. (2016) .8, 323–325.
219. Checkley, W., White, A.C., Jaganath, D., Arrowood, M.J., Chalmers, R.M., Chen, X., Fayer, R., Griffiths, J.K., Guerrant, R.L., Hedstrom, L., Huston, C.D., Kotloff, K.L., Kang, G., Mead, J.R., Miller, M., Petri, W.A. Jr., Priest, J.W., Roos, D.S., Striepen, B., Thompson, R.C., Ward, H.D., Van Voorhis, W.A., Xiao, L., Zhu, G., Houpt, E.R. « A review of the global burden, novel

- diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. » *Lancet Infect. Dis.* Jan; ( 2014) 15(1),85 -94.
220. Bartels C.J.M., Holzhauser M., Jorritsma R., Swart W.A.J.M., Lam T.J.G.M. «Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves » *Preventive veterinary Medicine*: (2010).162-169 p :164.
221. Akam A., Khelef D., Kaidi R., Lafri M., Cozma V., Suteu E. « Cryptosporidiose bovine dans certaines fermes laitières de la Mitidja d'Algérie ». Communication: la 2ème journée des sciences vétérinaires .E.N.V.A . 19 Avril(2005).
222. Singh B.B., Sharma R., Kumar H., Banga H.S., Aulakh R.S., Gill J.P.S., Sharma J.K.«Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in Punjab (India) and its association with diarrhea in neonatal dairy calves » *Veterinary Parasitology* (2006). 140.162-165
223. Lise, A.T.W., Brenna, D.J., Martin, S.W., Kenneth, E.L., Andrew S.P, « Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infections in southwestern Canada and its association with diarrhea in neonatal dairy calves ». *Can. Vet. J.* (2005).46 (4), 349–351
224. Baroudi D. « La cryptosporidiose bovine dans certaines fermes du centre d'Algérie et l'impact sur la santé humaine » Mémoire de Magister option : Zoonose parasitaire E.N.V.S El Harrach.(2005).
225. Amedeo J., Goillandeau P., Roger M.F. « Etiologie des affections néonatales du veau. Incidence de la cryptosporidiose ». *Bulletin des GTV*, n° 1. . (1995).35-41
226. Otto, V.P., Elschner, M., Gu Ènther, H., Schulze, F. « Vergleichende Untersuchungen zum nachweis von Rotaviren, Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxigen en E. coli im Kot durchfallkranker Ka Èlber ». *Tiera Èrztl Umschau* .(1995).50, 80±86
227. Ouchene, N., Ouchene-Khelifi, N.A., Zeroual, F., Benakhla, A., Adjou, K., « Study of *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.* and *Eimeria spp.* Infections in dairy cattle in Algeria. » *J. Parasitol. Vector Biol.* (2014). 6, 61–65.
228. Helmy, Y.A., Von Samson-Himmelstjerna, G., Nöckler, K., Zessin, K.H., «Frequencies and spatial distributions of *Cryptosporidium* in livestock animals

- and children in the Ismailia province of Egypt » *Epidemiol. Infect.* .(2015).143, 1208-1218.
229. Bodager, J.R., Parsons, M.B., Wright, P.C., Rasambainarivo, F., Roellig, D., Xiao, L., Gillespie, T.R.,. «Complex epidemiology and zoonotic potential for *Cryptosporidium suis* in rural Madagascar» *Vet Parasito.* (2015). 207, 140-143
230. Ayinmode, A.B., Olakunle, F.B., Xiao, L., «Molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* in native calves in Nigeria». *Parasitol. Res.* (2010).107, 1019– 1021.
231. Soltane, R., Guyot, K., Dei-Cas, E., Ayadi, A., «*Cryptosporidium parvum* (Eucoccidiorida:Cryptosporiidae) in calves: results of a longitudinal study in a dairy farm in Sfax,Tunisia » *Parasite* (2007).14, 309–312.
232. Portejoie Y. « Etiologie des diarrhées néonatales, commentaires des résultats d'analyses de différentes régions ».In : Pathologies et chirurgies néonatales, Journées Nationales des GTV. Edite par SNGTV, Paris, (1995). 175-177.
233. Chermette., Boufassa-Ouzrout S. «Cryptosporidiose : une maladie animale et humaine cosmopolite». Série technique n° 5, 2eme edition. Edite par l'Office International des Epizooties, (1988). 127 pages, 527 références. Paris,
234. Khelaf D., Saib M.Z., Akam A., Kaidi R., Chiilla V., Cozma V., Adjou K.T. «Epidémiologie de la cryptosporidiose chez les bovins en Algérie » *Rev. Méd. Vét.* (2007). 158(5): 260-264.
235. Pavlasek I. «.Effect of disinfectant in infectioiness of oocysts of *Cryptosporidium sp*» *Cs.Epidem.*, (1984) 33,2,97-101
236. Akam, A., Lafri, M., Khelef, D., Kaidi, R., Bouchène, Z., Cozma, V. & Suteu, E. «.Cryptosporidiose bovine dans la région de la Mitidja (Algérie) ». *Bulletin USAMV-CN* (2007). 64(1-2): 344-350.
237. Chartier C., Mallereau-Pellet MP., Mancassola R., Nussbaum D., « Détection des ookystes de *Cryptosporidium* dans les fèces de caprins: comparaison entre un test d'agglutination au latex et trois autres techniques conventionnelles», *Veterinary research*, (2002),33 (2), 169-177
238. Al-Robaiee I and Al-Farwachi M. « Direct ELISA aided coprological diagnosis of *Cryptosporidium parvum* infection in diarrheic neonatal calves in Mosul city, Iraq » *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, March (2014) 1(1): 8-10,
239. Johnston, S.P, Ballard, M.M, Beach, M.J, Causer, L, Wilkins, P.P, «.Evaluation Of three commercial assays for detection of *Giardia* and

- Cryptosporidium* organisms in fecal specimens». J. Clin. Microbiol. (2003). 41, 623-626.
240. Ezzaty Mirhashemi, M., Zintl, A., Grant, T., Lucy, F.E., Mulcahy, G., De de Waal, T. «.Comparison of diagnostic techniques for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in animal samples. » Exp. Parasitol. (2015) 151–152, 14–20.
241. Causapé, A.C., Quílez, J., Sanchez-Acedo, C., del Cacho, E., Lopez-Bernard, F., «Prevalence and analysis of potential risk factors for *Cryptosporidium parvum* infection in lambs in Zaragoza (Northeastern Spain). » Vet. Parasitol. (2002). 104, 287-298.
242. House J., Lester G. & Vaala W. « Initial management and physical examination of the neonate. » Dans : Smith B.P., Large animal internal medicine. 4ème éd., Saint Louis : Mosby Elsevier, (2009). pp. 262-280
243. Thompson R.C., Ash. A., « Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections» Infect. Genet. Evol. 40 (2016) 315–323.
244. Silverlås, C., Blanco-Penedo, I. « *Cryptosporidium spp.* in calves and cows from organic and conventional dairy herds » Epidemiol. Infect, (2012) 8, 1-11.
245. Murakoshi, F., Xiao, L., Matsubara, R., Sato, R., Kato, Y., Sasaki, T., Fukuda, Y., Tada, C., Nakai, Y., «.Molecular characterization of *Cryptosporidium spp.* in grazing beef cattle in Japan » Vet. Parasitol. (2012). 187,123-128.
246. Björkman, C., Lindström, L., Oweson, C., Ahola, H., Troell, K., Axén, C., « *Cryptosporidium* infections in suckler herd beef calves». Parasitology (2015). 142, 1108–1114
247. Okhuysen, P.C. and Chappell, C.L.. «*Cryptosporidium* virulence determinants-are we there yet? » International journal for parasitology, (2002) 32 (5), 517–525.
248. Tiangtip, R., Jongwutiwes, S.,. « Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand» Tropical Med. Int. Health. (2002). 7, 357–364.
249. Xiao, L., Feng, Y., « Zoonotic cryptosporidiosis» FEMS Immunol. Med. Microbiol. (2008). 52, 309–323.
250. Santín, M., « Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals» N.Z. Vet. J. (2013),61, 1–10.

251. Smith, H.V., Nichols, R.A., Mallon, M., Macleod, A., Tait, A., Reilly, W.J., Browning, L.M., Gray, D., Reid, S.W., Wastling, J.M., «Natural *Cryptosporidium hominis* infections in Scottish cattle. » *Vet. Rec.* (2005) 156, 710–711.
252. Fayer, R., Santín, M., Trout, J.M., Greiner, E., « Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States» *Vet. Parasitol.* (2006). 135, 105-112.
253. Langkjaer, R.B., Vigre, H., Enemark, H.L., Maddox-Hyttel, C., «.Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark » *Parasitology* Lobo, M.L., Augusto, J., Antunes, (2007).134, 339–350.
254. Chalmers, R.M., Katzer F. «Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis» *Trends.Parasitol.* (2013).29,237-251.
255. Rieux, A., Paraud, C., Pors, I., Chartier, C. « Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pre-weaned calves in western France in relation to age. » *Vet. Parasitol.*(2013) 197, 7–12
256. Quilez, J., Torres, E., Chalmers, R.M., Robinson, G., Del Cacho, E., Sanchez-Acedo, C., «*Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain » *Parasitology* (2008). 135, 1613–1620.
257. Mi, R., Wang, X., Li, C., Huang, Y., Zhou, P., Li, Z., Lei, M., Cai, J., Chen, Z., « Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* in yaks in Qinghai Province of China» *PLoS One* (2013). 8, e74985.
258. Lobo, M.L., Augusto, J., Antunes, F., Ceita, J., Xiao, L., Codices, V., Matos, O., «*Cryptosporidium spp.*, *Giardia duodenalis*, *Enterocytozoon bienersi* and other Intestinal parasites in young children in Lobata province, Democratic Republic of São Tomé and Príncipe. » *PLoS One* (2014) 9, e97708.
259. Sharbatkhori, M., Nazemalhosseini Mojarad, E., Taghipour, N., Pagheh, A.S., Mesgarian, F., «Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium spp.* in diarrheic children from Gonbad Kavoos City, Iran. Iran. » *J. Parasitol.* (2015) 10, 441–447.
260. Ranjbar, R., Baghaei, K., Nazemalhosseini Mojarad, E.. «Genetic characterization of *Cryptosporidium spp.* among patients with gastrointestinal complaints *Gastroenterol. Hepatol.* » *Bed Bench.* (2016) 9, 301–307.