

POPULAR AND DEMOCRATIC REPUBLIC OF ALGERIA

MINISTRY OF HIGHER EDUCATION
AND SCIENTIFIC RESEARCH

ZIANE ACHOUR UNIVERSITY OF DJELFA
NATURAL SCIENCES AND LIFE FACULTY



Exploration and Development Laboratory
Steppe Ecosystems

THESIS

for obtaining the degree of

THIRD CYCLE DOCTOR

Subject : Biologic Sciences

Option :

Impact of parasitic zoonoses on public health via water, food and the environment

Presented by :

Mrs BENHOUDA Djahida

Theme

**ZOONOTIC POTENTIAL RISKS OF SOME PARASITIC
PROTOZOA IN CHILDHOOD AND ADULT POPULATIONS
LIVING IN URBAN AND RURAL AREAS THROUGH PETS**

Publicly presented before the jury composed of:

President : M. SOUTTOU K. ;	Professor ; Ziane Achour University, Djelfa
Examiner: M. HOUALI K. ;	Professor ; Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou
Examiner: M. LAATAMNA A. ;	MCA ; Ziane Achour University, Djelfa
Examiner: M. AIT BELKACEM A. ;	MCA ; Ziane Achour University, Djelfa
Examiner: M. BITAM I. ;	MCA ; Preparatory school, Alger
Examiner: M. BAROUDI D. ;	MCA ; E.N.S.V., Alger
Supervisor : M. HAKEM A.;	Professor ; Ziane Achour University, Djelfa
Co-supervisor : M. Xiao L. ;	Professor ; Subdivision Director, CDC, ATLANTA, USA

Academic year : 2019-2020

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE ZIANE ACHOUR DJELFA
FACULTE SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE



Laboratoire d'Exploration et Valorisation

des Ecosystèmes Steppiques

THESE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT TROISIEME CYCLE

Filière : Sciences Biologique

Option :

Impact des zoonoses parasitaires sur la santé publique via l'eau, les aliments et
l'environnement

Présenté par :

M^{me} BENHOUDA Djahida

Thème

**RISQUES DU POTENTIEL ZONOTIQUE DE CERTAINS
PROTOZOAIRE PARASITES CHEZ LES POPULATIONS
INFANTILES ET ADULTES VIVANTS EN ZONE URBAINE ET
RURALE VIA LES ANIMAUX DOMESTIQUES**

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

Président : M. SOUTTOU K. ;	Professeur ;	Université Ziane Achour, Djelfa
Examineur: M. HOUALI K. ;	Professeur ;	Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou
Examineur: M. LAATAMNA A. ;	MCA ;	Université Ziane Achour, Djelfa
Examineur: M. AIT BELKACEM A. ;	MCA ;	Université Ziane Achour, Djelfa
Examineur: M. BITAM I. ;	MCA ;	Ecole préparatoire, Alger
Examineur: M. BAROUDI D. ;	MCA ;	E.N.S.V., Alger
Rapporteur : M. HAKEM A.;	Professeur ;	Université Ziane Achour, Djelfa
Co-rapporteur : M. Xiao L. ;	Professeur ;	Directeur Subdivision, CDC, ATLANTA, USA

Année universitaire : 2019-2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

La louange est à Allah, celui qui glorifie ce qui dans les cieux et dans la terre, c'est Allah, le pur le puissant le sage et qui la prière et le salut de mon seigneur soient sur son prophète.

Au terme de cette étude et Avant tout nous remercions Dieu qui nous avons donné la santé, le courage, la volonté, d'achever notre travail et notre étude.

*Nous donnons une place particulière à mon encadreur le **Professeur : HAKEM Ahcène**, pour sa générosité et sa grande patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.*

*Une mention très spéciale a notre co-encadreur **Pr. Xiao L.** Directeur Subdivision, CDC, ATLANTA, USA,*

*Une mention très spéciale et un grand remerciement pour un professeur qui dépasse les limites de la générosité, **Dr.Simone M.Caccio**, et qui m'a accueilli dans son laboratoire en Italie pour réaliser les techniques de biologie moléculaire tous les mots ne peuvent pas exprimer nos vifs remerciements.*

*Il nous est aussi agréable de remercier à **M.SOULTOU K;** professeur à la faculté SNV de l'université de Djelfa pour nous fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à **Mr.HOUALI K,** professur à l'université de TIZI OUAZOU pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger en qualité de membre de jury.*

Nos vifs remerciement s'adressent aussi à M. BAROUDI D., MCA à l'E.N.S.V .d'Alger, M.BITAMI, MCA à l'école préparatoire d'Alger, M. LAATAMNA, MCA à l'université de Djelfa, et M.AIT'BELKACEM A., MCA à l'université de Djelfa pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et pour le grand honneur qu'ils me font en acceptant de le juger.

Je présente mes remerciements à Dr HAMOUDA Ouannassa, Médecin spécialiste en parasitologie au CHU de Batna et à Dr BENHOUDA Afaf, MCB à l'université de BATNA-2- pour leurs précieuse aide, et de m'avoir fait profiter de leurs compétence.

Merci pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans mon travail, Laura RINALDI, Giuseppe CRINGOLI Anna Rosa SANNELLA, Fabio TOSINI.

Je remercie tendrement ma famille et mon mari Ali ADOUANE qui m'ont toujours soutenue et encouragé même dans les périodes les plus difficiles, merci pour votre soutient inépuisable. Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

Sommaire

Liste des figures.....	(i)
Liste des tableaux	(ii)
Liste des abréviations.....	(iii)

Introduction générale.....	01
----------------------------	----

PREMIERE PARTIE (RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE)

Chapitre I. Anatomie et physiologie de l'appareil digestif

I. Anatomie et physiologie de l'appareil digestif.....	03
I.1. Appareil digestif chez l'humain.....	03
I.1.1. Paroi du tube digestif	03
I.1.2. Intestin grêle.....	05
I.2. Physiologie de la diarrhée chez les humains.....	07
I.2.1. Définition de la diarrhée.....	07
I.2.2. Diagnostique étiologique.....	08
I.3. Appareil digestif chez les bovins	11
I.4. Diarrhée chez les bovins	13
I.4.1. Définition.....	13
I.4.2. Agents causaux de la diarrhée.....	14

Chapitre II. Parasites intestinaux (protozoaires intestinaux)

II. Parasites intestinaux.....	15
II.1. <i>Cryptosporidium</i> spp.....	15
II.1.1. Historique.....	15
II.1.2. Taxonomie.....	15
II.1.3. Morphologie et cycle de vie.....	17
II.1.4. Physiopathologie	18
II.1.5. Transmission et épidémiologie	21
II.1.6. Diagnostic.....	23
II.1.7. Prophylaxie sanitaire et médicale	26
II.2. <i>Giardia</i> spp.	27
II.2.1. Historique	27
II.2.2. Classification taxonomique.....	27
II.2.3. Morphologie du parasite.....	28
II.2.4. Cycle du <i>Giardia</i>	29
II.2.5. Pathogénie	30
II.2.6. Étiologie.....	31
II.2.7. Diagnostic	31
II.2.8. prophylaxie	32

DEUXIEME PARTIE (EXPERIMENTALE)

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

Introduction	33
I.1 Matériel et méthodes	34
I.1.1 Site d'étude.....	34
I.1.2. Techniques de diagnostics.....	34
I.1.2.1. Examen macroscopique des selles	34
I.1.2.2. Examen microscopique des selles	34
I.1.2.2.1. Examen direct à l'état frais	34
I.1.2.2.2. Examen après coloration au lugol.....	35
I.1.2.2.3. Examen après coloration Ziehl Neelsen modifiée.....	35
I.1.3. Tests statistiques.....	35
I.2. Résultats et Discussion	36
I.2.1. Caractéristiques démographiques de la population étudiée.....	36
I.2.2. Prévalence des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains	37
I.2.2.1. Prévalence des parasites selon le sexe de la population humaine.....	40
I.2.2.2. Prévalence des parasites selon la présence ou absence de la diarrhée.....	42
Conclusion.....	47

Chapitre II. Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

II.I Etude épidémiologique classique (*Cryptosporidium* et de *Giardia*)

Introduction	48
II.1.1. Matériel et Méthodes	49
II.1.1.1 Présentation de la zone d'étude.....	49
II.1.1.2. Récolte des échantillons des fèces.....	51
II.1.1.3. Conservation des fèces	51
II.1.1.4. Méthodes d'analyses microscopiques.....	52
II.1.1.4.1. Examen macroscopique des fèces.....	52
II.1.1.4.2. Technique de RITCHIE modifiée	52
II.1.1.4.3. Technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée	52
II.1.1.4.4. Identification de <i>Cryptosporidium</i> et de <i>Giardia</i> par l'immunofluorescence directe	53
II.1.1.5. Tests statistiques.....	54
II.1.2. Résultats et Discussion	54
II.1.2.1. Oocyste de <i>Cryptosporidium</i> spp. observé par la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée	54
II.1.2.2. Répartition de la fréquence d'isollements de <i>Cryptosporidium</i> chez les veaux.....	55
II.1.2.3. Distribution des résultats des analyses selon la présence ou absence de la diarrhée chez les veaux.	56

II.1.2.4. Distribution des résultats des analyses par tranche d'âge des bovins	58
II.1.2.5. Distribution des résultats des analyses selon le sexe des bovins.....	60
II.1.2.6. Influence de l'hygiène des fermes sur l'infestation de <i>Cryptosporidium</i> spp chez les veaux..	61
II.1.2.7. Influence du système d'élevage sur les incidences de <i>Cryptosporidium</i> spp chez les veaux...	62
II.1.2.8. Identification de <i>Cryptosporidium</i> et <i>Giardia</i> par l'immunofluorescence.....	66
Conclusion	70

II.2. Etude moléculaires (*Cryptosporidium* et *Giardia*)

II.2.1 *Cryptosporidium*

Introduction.....	71
II.2. 1.1. Matériel et Méthodes	72
II.2.1.1.1. Récolte et analyse des échantillons fécaux.....	72
II.2. 1.1. 2. Concentration des selles pour l'étude moléculaire.....	73
II.2. 1.1.3. Extraction de l'ADN à partir des échantillons fécaux.....	73
II.2. 1.1.4. Amplification de l'ADN par PCR.....	74
II.2. 1.1.4.1. Principe du test.....	74
II.2. 1.1.4.2. PCR nichée sur le gène de l'ARNr 18S de <i>Cryptosporidium</i>	75
II.2. 1.1.4. 3. PCR nichée sur le gène de protéine gp60 de <i>Cryptosporidium</i>	78
II.2. 1.1.4.4. Purifications des produits positifs par PCR	79
II.2. 1.1.4.5. Estimation de la quantité d'ADN de produit de PCR purifié.....	79
II.2. 1.1.5. Exécution du séquençage de l'ADN.....	80
II.2. 1.1.6. Etude bioinformatique.....	81
II.2. 1.1.7. Tests statistiques.....	81
II.2. 1.2. Résultats et Discussion	82
II.2. 1.2. 1. Analyse microscopique et les produits de la PCR.....	82
II.2. 1.2. 2. PCR nichée sur le gène de l'ARNr 18S de <i>Cryptosporidium</i>	83
II.2. 1.2. 3. Répartition des résultats des analyses moléculaires selon l'âge	85
II.2. 1.2. 4. Répartition des résultats des analyses moléculaires selon le sexe.....	86
II.2. 1.2. 5. Sous type de <i>Cryptosporidium</i>	86
Conclusion	91

II.2.2. *Giardia*

Introduction	92
II. 2.2.1. Matériel et méthodes	93
II. 2.2.1.1. Récolte et traitement des échantillons fécaux	93
II. 2.2.1.2. Concentration des selles pour l'étude moléculaire.....	93
II. 2.2.1.3. Extraction de l'ADN à partir des échantillons fécaux.....	93
II. 2.2.1.4. Amplification de l'ADN par PCR	93
II. 2.2.1.4.1. PCR nichée sur le gène β -giardine de <i>Giardia</i>	93
II. 2.2.1.5. Tests statistiques.....	95
II. 2.2.2. Résultats et Discussion	95
II. 2.2.2.1. Examen microscopique.....	95
II. 2.2.2.2. Etude moléculaire.....	95
II. 2.2.2.3. Prévalence et distribution de <i>Giardia</i> en fonction de l'âge après par analyses PCR.....	97
II. 2.2.2.4. Prévalence et distribution de <i>Giardia</i> en fonction du sexe après par analyses PCR.....	98
II. 2.2.2.5. Association de <i>Cryptosporidium</i> spp. et <i>Giardia</i> spp., retrouvée par analyses PCR.....	99

Conclusion.....	101
-----------------	-----

II.3. Recherche des parasites intestinaux chez les sources animés (bovins) par les deux techniques de flottation

II.3.1. Technique de FLOTAC

Introduction	102
II.3.1. Matériel et méthodes	103
II.3.1.1.Site d'étude.....	103
II.3.1.2.Technique FLOTAC.....	103
II.3.1.3. Tests statistiques.....	105
II.3.2. Résultats et Discussion	105
II.3.2.1. Identification des parasites dans les échantillons prélevés par la méthode FLOTAC.....	105
II.3.2.2. Prévalence des parasites par tranche d'âge par la méthode de FLOTAC.....	108
II.3.2.3. Prévalence des parasites selon le sexe des bovins par la méthode de FLOTAC	111
II.3.2.4. Prévalence et distribution des espèces en fonction de la consistance de selle.....	111
II.3.2.5. Prévalence et distribution des parasites selon FS4 et FS7.....	112
Conclusion.....	114

II.3.2. Technique de Mini- FLOTAC.

Introduction.....	115
II.3.2.1. Matériel et méthodes	116
II.3.2.1.1 Site d'étude.....	116
II.3.2.1.2. Technique de Mini-Flotac.....	116
II.3.2.1.3. Tests statistiques.....	117
II.3.2.2. Résultats et Discussion	117
II.3.2.2.1. Identification des parasites intestinaux par la méthode Mini- FLOTAC.....	117
II.3.2.2.2. Prévalence des parasites par tranche d'âge.....	118
II.3.2.2.3. Prévalence des parasites selon FS2 et S7.....	120
II.3.2.2.4. Prévalence des parasites intestinaux par sexe.....	121
II.3.2.2.5. Prévalence et distribution des espèces en fonction de la consistance des elles.....	121
Conclusion.....	122

Conclusion générale et perspectives.....	123
--	-----

Références bibliographiques.

Annexes.

Résumés.

Liste des figures

Figure 1. Couches de la paroi du tube digestif.....	5
Figure 2. Surface absorbante de l'intestin grêle.....	7
Figure 3. Système digestif des bovins.....	12
Figure 4. Schéma d'un oocyste.....	17
Figure 5. Cycle biologique de <i>Cryptosporidium</i>	18
Figure 6. Epithélium intestinale.....	19
Figure 7. Réponse immunitaire innée à <i>Cryptosporidium</i>	21
Figure 8. <i>Giardia</i> , forme trophozoïte.....	28
Figure 9. <i>Giardia</i> , forme kyste.....	29
Figure 10. Cycle de <i>Giardia intestinalis</i>	30
Figure 11. Situation géographique de la zone d'échantillonnage.....	50
Figure 12. Oocystes de <i>Cryptosporidium</i> spp. observées par la technique de Ziehl- Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz	54
Figure 13. Répartition de <i>Cryptosporidium</i> selon la présence ou absence de la diarrhée...	56
Figure 14. Distribution de l'infestation de <i>Cryptosporidium</i> spp. selon les tranches d'âge des bovins.....	59
Figure 15. Répartition de l'infestation de <i>Cryptosporidium</i> selon le sexe des bovins.....	61
Figure 16. Influence des différents systèmes d'élevage sur l'incidence de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez les bovins.....	64
Figure 17. Oocyste de <i>Cryptosporidium</i>	66
Figure 18. Carte de l'Algérie et de la Wilaya de Batna montrant l'emplacement des fermes laitières étudiées.....	72
Figure 19. Représentation schématique illustrant la méthode de la PCR nichée	74
Figure 20. Résultats de la PCR nichée pour <i>Cryptosporidium</i>	84
Figure 21. Les différentes espèces de <i>Cryptosporidium</i> et leurs fréquences.....	85
Figure 22. Résultats de la PCR nichée pour <i>Giardia</i>	96
Figure 23. Appareil FLOTAC.....	104
Figure 24. Différentes étapes de fonctionnement de la technique FLOTAC.....	105
Figure 25. Kyste de <i>Protozoaire</i> . observée par la technique FLOTAC	106
Figure 26. Kyste d' <i>Eimeria</i> spp. observée par la technique FLOTAC.....	106
Figure 27. Kyste de <i>Strongles</i> observée par la technique FLOTAC.....	106
Figure 28. Kyste de <i>Toxocara</i> spp. observée par la technique FLOTAC.....	107
Figure 29. Kyste de <i>Trichuris</i> spp. observée par la technique FLOTAC.....	107
Figure 30. Différentes étapes de fonctionnement de la technique Mini-FLOTAC.....	117

Liste des tableaux

Tableau 1. Espèces de <i>Cryptosporidium</i> et leurs hôtes principaux.....	16
Tableau 2. La prévalence des parasites intestinaux selon la région	36
Tableau 3. Prévalence de différents parasites intestinaux selon la région.....	38
Tableau 4. Répartition et prévalence des parasites intestinaux selon le sexe.....	40
Tableau 5. Répartition et prévalence des parasites intestinaux selon la présence ou absence de la diarrhée	42
Tableau 6. Répartition du nombre de fermes ciblé dans chaque département.....	51
Tableau 7. Répartition de <i>Cryptosporidium</i> spp. dans les fermes bovines des différents fermes de la Wilaya de Batna.....	55
Tableau 8. Fréquence d'isolement de <i>Cryptosporidium</i> selon la présence ou absence de la diarrhée chez les veaux.	56
Tableau 9. Distribution de l'infestation de <i>Cryptosporidium</i> spp. selon les tranches d'âge des bovins.....	58
Tableau 10. Influence du sexe sur l'infestation de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez les bovins dans l'ensemble des fermes.....	60
Tableau 11. Influence de l'hygiène des grandes fermes sur les incidences de <i>Cryptosporidium</i> spp. chez les jeunes veaux.	62
Tableau 12. Influence du système d'élevage des veaux sur les incidences des Cryptosporidies.....	63
Tableau 13. Mélange réactionnel nécessaire pour un seul échantillon (PCR classique).....	75
Tableau 14. Programmation du thermocycleur (temps et températures) en PCR sur le gène de l'ARNr 18S.....	77
Tableau 15. Programmation du thermocycleur (temps et températures) en PCR sur le gène de protéine gp60.....	79
Tableau 16. Espèces de <i>Cryptosporidium</i> identifiées chez les bovins de la région Est d'Algérie BATNA.	82
Tableau 17. Prévalence de <i>Cryptosporidium</i> chez les bovins selon le sexe de l'animale dans la Wilaya de BATNA.	86
Tableau 18. Programmation du thermocycleur (temps et températures) en PCR sur le gène de Beta- giardine.....	94
Tableau 19. Variation de la prévalence et distribution de <i>Giardia intestinalis</i> en fonction de l'âge, après analyse par PCR.....	97
Tableau 20. Variation de la prévalence et distribution de <i>Giardia intestinalis</i> en fonction de sexe, par PCR	98
Tableau 21. Prévalence des infections parasitaires par analyse de PCR selon le type d'infection.....	99

Tableau 22. Prévalence d'Autres Protozoaires, <i>Eimeria</i> , <i>Strongle</i> , <i>Toxocara</i> , <i>Trichuris</i> , et <i>Paramphistomum</i> dans les selles des bovins	108
Tableau 23. Répartition des parasites selon le sexe des bovins	111
Tableau 24. Prévalence d'Autres Protozoaires, <i>Eimeria</i> , <i>Strongle</i> , <i>Toxocara</i> , <i>Trichuris</i> , et <i>Paramphistomum</i> dans les selles diarrhéiques et non-diarrhéiques	111
Tableau 25. Prévalence des infections des protozoaires intestinaux déterminées par Flotac-400.....	112
Tableau 26. Prévalence d' <i>Eimeria</i> , <i>Strongle</i> , <i>Toxocara</i> par la méthode de Mini-Flotac.....	118
Tableau 27. Prévalence des parasites intestinaux déterminés par Mini- Flotac.....	120
Tableau 28. Répartition des parasites selon le sexe.....	121
Tableau 29. Prévalence d' <i>Eimeria</i> , <i>Toxocara</i> , <i>Strongle</i> et d'Autres Protozoaires dans les selles diarrhéiques et non-diarrhéiques.....	121

Liste des abréviations

µl	Microlitre
A	Année
AD N	Acide déoxyribonucleique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AL	Tompon de lyse
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATE	Tompon d'éluion
Aw1	Tompon de lavage 1
Aw2	Tompon de lavage 2
BET	Bromure d'ethidium
BVT	Bureau de vérifications techniques
C1G	Céphalosporines de 1re génération
CD4	Cluster de différenciation 4
CHU	Centre-hospitalier universitaire
COWP	Protéine d'enveloppe de l'ookyste
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole,
DM	Derrière les mères
dNTPs	Déoxynucleotide triphosphates
DSA Batna	Direction des Services Agricoles de la Wilaya de Batna
EB	Tompon d'éluion
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAE	Formaline-acétate d'éthyle
FE	Formaline-éther
FECM(FEC)	Formol-ether concentration method
FITC-C	Anticorps monoclonal anti-Cryptosporidium conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine
Gp60	Glycoprotéine 60
H₂O	Molécule d'eau
HCl	Chlorure d'hydrogène
HSP	Protéines de choc thermique
IFD	Immunofluorescence directe
IgG	Immunoglobulines de type G
IL8	Interleukin8
J	Jour
Km	kilomètre
m	Mètre
M	Mois
Mg cl₂	Chlorure de Magnésium
ml	Millilitre
mn	Minute

NaCl	Chlorure de Sodium
Nbre	Nombre
N°	Numero
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
OPG	Oeufs par gramme
Pb	Paire de bases
PCR	Amplification ribosomique en chaine par polymérase
pH	Potentiel hydrogen
pmol	Picomol
QF	Fluoromètre Qubit
Rpm	Revolution par minute
S	Seconde
S.D	Selles diarrhéiques
S.N.D	Selles non diarrhéiques
SIDA	Syndrome d'immuno-déficience aquirse
STH	Les helminthes transmis par le sol
TAE	Tris, Acétate, EDTA
TGF – bêta	Facteur de croissance transformant bêta
TNF alpha	Facteur de nécrose tumorale alpha
UV	Ultrat violet
V	Volte
V.D	Veaux diarrhéiques
V.N.D	Veaux non diarrhéiques
V.P	Veaux positifs
V.T	Veaux Totaux examinés
VIH	Virus d'immuno-déficience humaine
ZN	Ziehl Neelsen
ZnSO4	Sulfacide de Zinc

Introduction générale

En médecine vétérinaire, comme en médecine humaine, les protozoaires digestifs sont fréquemment rencontrés [APPELBEE *et al.*, 2005]. Ils ont une grande importance du point de vue économique et sanitaire, par les signes cliniques provoqués mais aussi par leur aspect zoonotique important pour certains [FAYER, 2004].

Le genre *Cryptosporidium* sont des parasites coccidiens qui infestent les microvillosités des cellules d'épithéliales tapissant les organes digestifs et respiratoires [TZIPORI et WARD, 2002]. Ce sont des protozoaires intracellulaires, obligatoires de petite taille. Ils ont découvert que ces protozoaires sont la cause principale des diarrhées chez les humains et certains animaux [VESEY *et al.*, 1997]. Leurs caractéristiques biologiques leur confèrent une grande résistance dans le milieu extérieur. Ces parasites sont facilement véhiculer par l'eau et résistent à de nombreux traitements [FAYER, 2004; AKAM *et al.*, 2004].

La cryptosporidiose chez l'homme a progressé dans ces dix dernières années et les cas de contamination par voie hydrique sont de plus en plus nombreux [BONNIN *et al.*, 1998]. Les ruminants sont rendus responsables de ce nouveau mode de contamination ; mais les données de la biologie moléculaire semblent indiquer qu'il existe deux génotypes différents de *C. parvum* : l'un commun aux ruminants et à l'homme, responsable de zoonose à cryptosporidies et l'autre évoluant uniquement chez l'homme et responsable d'une contamination inter-humaine [HARP *et al.*, 1990].

Chez les personnes immunocompétentes, *Cryptosporidium* peut causer une diarrhée de 3 à 20 jours qui disparaît spontanément. Cependant, chez le patient immunodéprimé, la cryptosporidiose revêt une forme clinique sévère et se caractérise par la diarrhée rebelle et prolongée [AMBROISE-THOMAS *et al.*, 1999].

La giardiase est une infection intestinale due au parasite *Giardia intestinalis* ou également appelé *Giardia lamblia*. L'infection par ce parasite peut être asymptomatique ou associée avec certains symptômes telle la diarrhée, la perte de poids, des crampes abdominales et un retard de croissance [GRIT *et al.*, 2012]. Du fait que *Giardia* peut infecter à la fois les animaux et les humains a soulevé des préoccupations au sujet du risque pour la santé publique des adultes et enfants de compagnie [OLSON *et al.*, 2004; THOMPSON et MONIS, 2004]. Le niveau de risque dépend des taux de prévalence et le mode d'excrétion [THOMPSON et MONIS, 2004].

Diverses techniques de comptage des œufs fécaux, utilisant la concentration de selles soit par des méthodes basées sur la flottation ou la sédimentation des éléments parasite, ces méthodes sont utilisées pour le diagnostic et la surveillance épidémiologique des helminthes et les infections intestinales des protozoaires chez les humains et les animaux [BECKER *et al.*, 2011].

FLOTAC est une nouvelle méthode de flottation basée sur la centrifugation d'échantillons de selles dans une solution de flottaison (FS) avec une densité donnée et l'examen microscopique de la partie supérieure de la suspension fécale permet la détection de la présence des œufs helminthes et les kystes de protozoaires intestinaux [CRINGOLI *et al.*, 2010].

En Algérie, les parasitoses qui provoquent la diarrhée reste mal connue et sous estimée chez les petits ruminants, même chez l'homme et chez les autres espèces animales.

Ce modeste travail a pour but :

1) d'apprécier la prévalence des parasites intestinaux présents chez les enfants et les adultes vivant en milieu rurale et urbaine de la Wilaya de BATNA.

2) d'évaluer la prévalence de *cryptosporidium* spp. et autres parasites dans les élevages des bovins dans certaines localités de la Wilaya de Batna et leurs transmission zoonotique, en fonction de certains facteurs de risque tels l'âge, le sexe et la présence ou absence de la diarrhée par l'utilisation des méthodes conventionnelles, FLOTAC, Mini-FLOTAC et des méthodes moléculaires,

3) d'évaluer les limites de sensibilités des tests de diagnostics utilisés pour la détection des parasites intestinaux.

PREMIERE PARTIE

(RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE)

CHAPITRE I.

"ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'APPAREIL DIGESTIF"

I. Anatomie et Physiologie de l'appareil digestif

I.1. Appareil digestif chez l'humain

Les organes digestifs accessoires sont les glandes salivaires, le pancréas exocrine, le foie et la vésicule biliaire. Ces organes exocrines accessoires sont situés à l'extérieur de tube digestif et déversent leur sécrétion par des canaux excréteurs dans la lumière de celui-ci. Ce tube digestif est pour l'essentiel une canalisation de 4-5 m de longueur allant de la bouche à l'anus. Les organes constituant l'appareil digestif sont : la bouche ; le pharynx ; l'œsophage ; l'estomac ; l'intestin grêle (successivement duodénum, jéjunum, et iléon) et le gros intestin (cæcum et appendice, côlon et rectum et anus) [ANDREW et HICKMAN, 1974].

Comme le tube digestif est interrompu de la bouche à sa lumière et en continuité avec l'environnement extérieur. Le contenu du tube digestif est donc techniquement excrété hors de l'organisme. La lumière du tube digestif a des conditions tolérables et sont essentielles au bon déroulement de la digestion mais qui seraient intolérables dans le milieu intérieur par exemple le pH du contenu de l'estomac tombe jusqu'à 2 du fait de l'acide chlorhydrique (HCl) gastrique alors que le pH intérieur compatible avec la vie est compris entre 6-8 [JAYNE-WILLIAMS et FULLER, 1971].

Les enzymes digestifs qui hydrolysent les aliments pourraient détruire les organes qui les sécrètent [FURNESS *et al.*, 2015]. Ils sont sécrétés sous forme inactive et ils sont activés seulement dans la lumière du tube digestif où ils attaquent les aliments. Donc les tissus de l'organisme sont à l'abri de l'auto-digestion [SHARMA *et al.*, 1997]. La partie distale du tube digestif est colonisée par des millions de microorganismes qui y sont inoffensifs et même utiles alors que s'ils pénétraient dans l'organisme, par exemple en cas de perforation de l'appendice, ils seraient extrêmement nocifs [GILBERT, 1997].

I.1.1. Paroi du tube digestif

La structure générale de la paroi du tube digestif est pratiquement la même sur toute la longueur de celui-ci, de l'œsophage à l'anus, avec particularités régionales. Sur une coupe transversale du tube digestif on distingue quatre couches (**Figure 1**) qui sont, de l'intérieur à l'extérieur la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse externe et la séreuse [KROGDAHL et SELL, 1989].

A. Muqueuse

La muqueuse, qui couvre toute la surface interne du tube digestif, est une couche protectrice qui est aussi sécrétrice et absorbante dans certaines régions. La muqueuse contient des cellules exocrines qui sécrètent les sucs digestifs, des cellules endocrines qui sécrètent des hormones gastro-intestinales et des cellules épithéliales spécialisées dans l'absorption des aliments [HILL, 1983].

La muqueuse n'est pas lisse, en général, mais forme de nombreux replis qui en augmentent énormément la surface. L'importance du plissement varie selon les régions ; elle est maximale dans l'intestin grêle où se fait l'essentiel de l'absorption et minimale dans l'œsophage qui sert seulement de voie de passage [SELL *et al.*, 1991].

B. Sous-muqueuse

La sous-muqueuse est une couche épaisse de tissu conjonctif responsable de la distensibilité et de l'élasticité du tube digestif. Elle contient des vaisseaux sanguins et lymphatiques qui envoient des branches collatérales en dedans vers la muqueuse et en dehors vers la musculature. On y trouve aussi un réseau de neurones qui forme le plexus sous-muqueux qui contrôle l'activité locale de chaque région [NITSAN *et al.*, 1991].

C. Musculaire externe

La musculature externe entoure la sous-muqueuse. C'est le principal contingent musculaire du tube digestif. Dans la plupart des régions elle est faite de deux couches, circulaire interne et longitudinale externe. Les fibres de la couche interne (juste sous la sous-muqueuse) sont disposées de façon circulaire autour de la lumière [UNI *et al.*, 1998]. Leur contraction réduit localement le diamètre [MAHADEVAN, 2014]. La contraction des fibres longitudinale de la couche externe raccourcit le tube. Conjointement, l'activité de ces deux couches musculaires produit le brassage et la propulsion du contenu. Un réseau de fibres nerveuses, le plexus myentérique, situé entre les deux couches musculaires, contribue au contrôle de l'activité locale de l'intestin [BUDDINGTON et DIAMOND, 1989].

D. Séreuse

La couche conjonctive externe recouvrant le tube digestif est la séreuse dont la sécrétion aqueuse lubrifie et facilite le glissement entre les organes digestifs et les organes voisins [LILLEHOJ et TROUT, 1996].

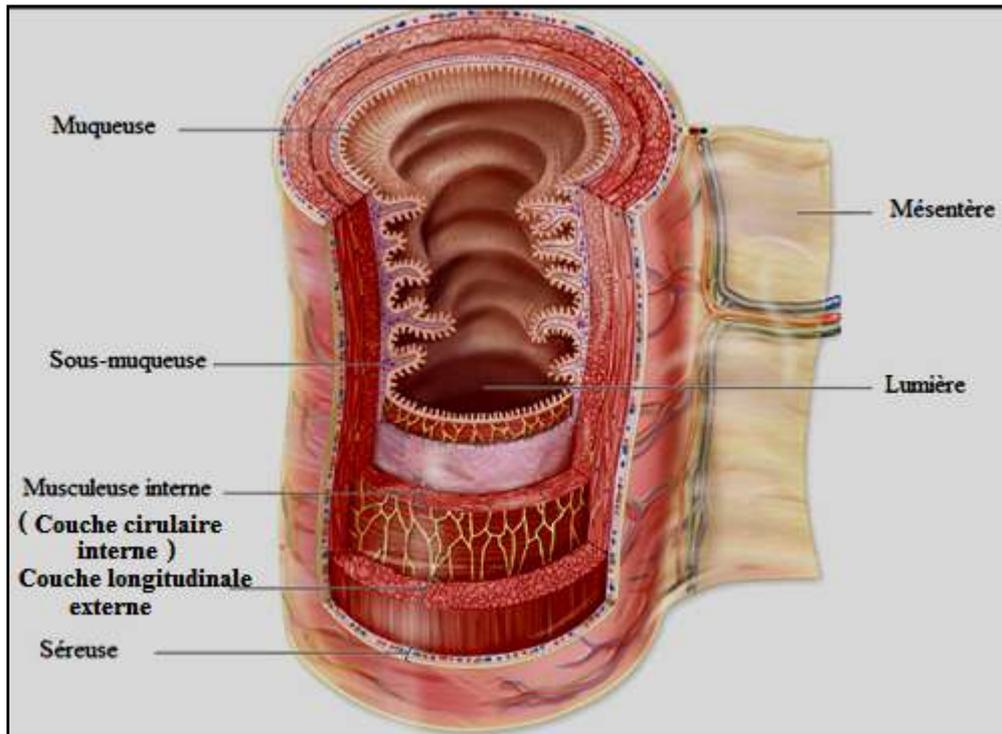


Figure 1. Couches de la paroi du tube digestif [MESCHER, 2016].

I.1.2. Intestin grêle

C'est dans l'intestin grêle qu'a lieu la quasi totalité de la digestion et de l'absorption. Il n'y a plus de digestion et d'absorption de nutriments au-delà. Dans le côlon, il y a une faible absorption d'eau et de sel [KIELA et GHISHAN, 2016]. L'intestin grêle est un tube pelotonné dans la cavité abdominale et unit l'estomac au gros intestin. Il est divisé de façon quelque peu arbitraire en trois segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléon [SCHAT et MYERS, 1991].

Au niveau de l'intestin grêle se passe la motilité, la sécrétion et la digestion et l'absorption.

A. Motilité

La motilité de l'intestin grêle comporte la segmentation et le complexe migrant [MORAN, 1982].

A .1. Contractions segmentaires

La contraction segmentaire pousse le chyme dans les deux sens. Ceci est lié au fait que la fréquence des contractions diminue le long de l'intestin grêle. Les cellules pacemaker du duodénum se dépolarisent spontanément plus rapidement que celles situées plus en aval dont les plus lentes sont celles de l'iléon terminal [BAYER *et al.*, 1975].

A .2. Complexe moteur migrant

Quand le quasi totalité du repas a été absorbé, la segmentation cesse et est remplacée, entre les repas par le complexe moteur migrant qui provoque une succession de contractions faibles qui progressent sur une courte distance le long de l'intestin avant de mourir. Elles commencent à l'estomac et migrent le long de l'intestin [HILL, 1983].

B. Sécrétion de l'intestin grêle

L'intestin grêle sécrète quotidiennement environ 1,5 litre de liquide aqueux et de mucus par les glandes exocrines de la muqueuse qui forment le suc intestinal. La sécrétion augmente après les repas suite à la stimulation locale par le chyme [BEYER et BARONDES, 1982].

Le mucus sécrété protège la muqueuse. De plus le milieu aqueux dû à la sécrétion d'eau favorise l'action des enzymes digestifs, notamment les réactions d'hydrolyse, rupture de liaison chimique par réaction avec H₂O, dont l'efficacité est maximale quand tous les réactifs sont en solution aqueuse [FERNANDEZ *et al.*, 2000].

C. Digestion

La digestion se fait par les enzymes pancréatiques, la bile facilitant celle des lipides. Les lipides sont réduits par ces enzymes en monoglycérides et acides gras libres absorbables, les protéines le sont en petits peptides et en quelques acides aminés et les glucides en disaccharides et en quelques monosaccharides [SMITS *et al.*, 2000].

D. Absorption

Les produits de digestion des glucides, des lipides et des protéines ainsi que des électrolytes, des vitamines et de l'eau sont absorbés par l'intestin grêle [KIELA et GHISHAN, 2012].

L'absorption se fait dans le duodénum et le jéjunum et il y a plusieurs facteurs contribuent à l'augmentation la surface de muqueuse disponible pour l'absorption [VAN DEN BERGHE et KLOMP, 2009] (Figure 2).

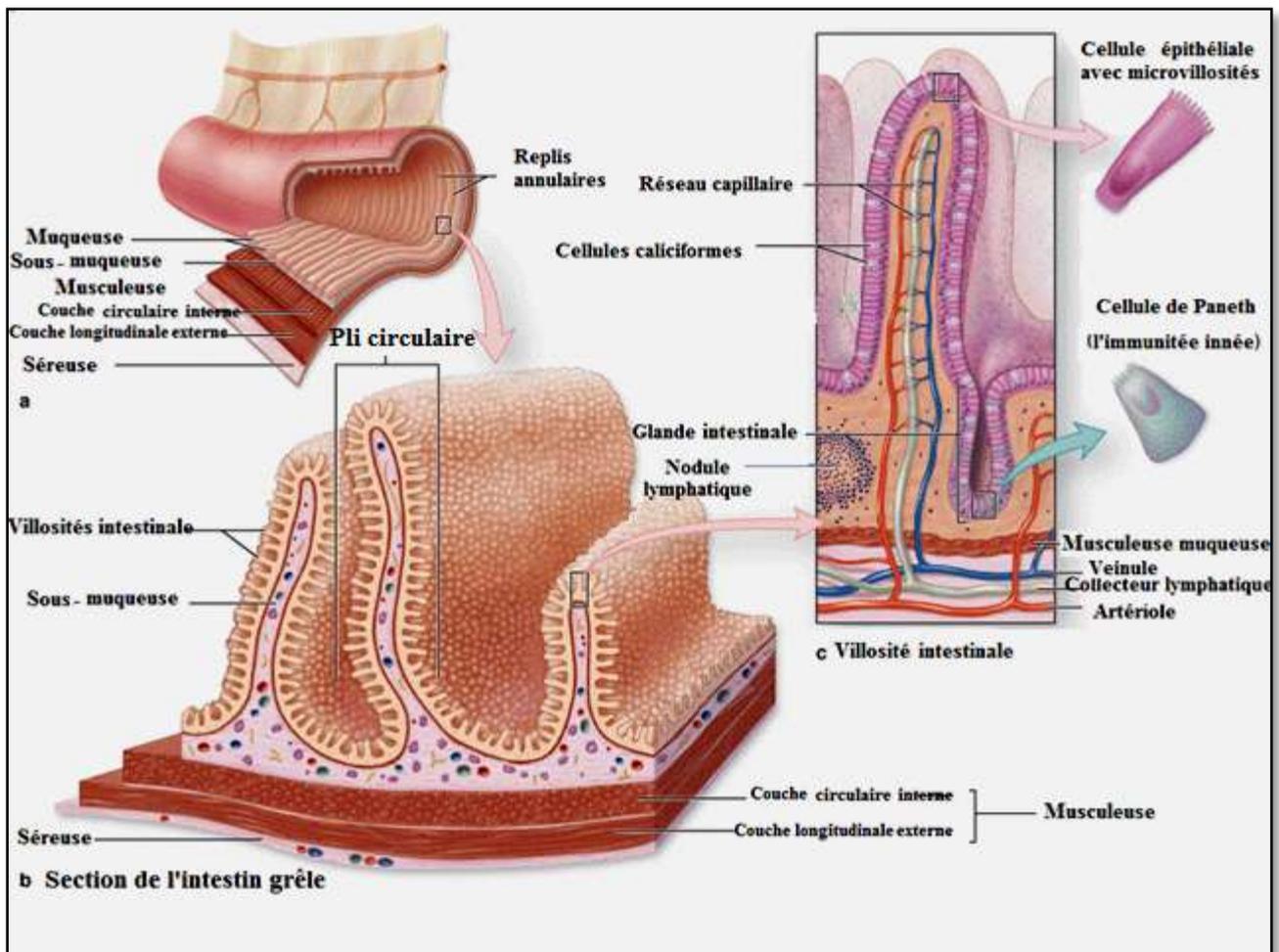


Figure 2. Surface absorbante de l'intestin grêle. **a)** Aspect macroscopique de l'intestin grêle. **b)** Plis circulaires (valvules conniventes) de la muqueuse triplant surface absorbante. **c)** Villosités microscopiques [MESCHER, 2016].

I.2. Physiologie de la diarrhée chez les humains

I.2.1. Définition de la diarrhée

La diarrhée est un problème de santé majeur dans le monde, est à la fois un signe et un symptôme. En tant que symptôme, la diarrhée a été décrite comme une augmentation de la fréquence des selles, une augmentation du volume de l'outil et / ou une diminution de la consistance des selles [WHYTE et JENKINS, 2012]. En tant que signe, la diarrhée se caractérise par une augmentation de l'excrétion de l'eau dans les selles à plus de 150 à 200 ml toutes les 24 heures [HOQUE et BINDER, 2006].

Quatre mécanismes pouvant être responsables des altérations du mouvement des liquides et des électrolytes associés à la diarrhée sont une augmentation de l'osmolalité lumenale, une diminution de l'absorption de liquide, une augmentation de la sécrétion intestinale et une altération de la motilité intestinale [KOSEK *et al.*, 2001]. Les mécanismes pathogènes spécifiques de la diarrhée infectieuse aiguë comprennent l'invasion des tissus, la production d'entérotoxines et l'adhésion d'agents infectieux aux cellules épithéliales [PAWLOWSKI *et al.*, 2009]. Les agents anti-diarrhéiques éliminent les sécrétagogues du tractus intestinal, stimulent l'absorption de liquide et inhibent le mouvement des électrolytes [HOQUE et BINDER, 2006].

I.2.2. Diagnostique étiologique

Les causes infectieuses sont les plus fréquentes, en particulier compte tenu du rôle des gastroentérites banales virales (hiver) et bactériennes (été) [BOSCHI-PINTO *et al.*, 2008].

A. Diarrhées infectieuses

A.1. Choléra

Lié à la toxine de *Vibrio cholerae*, c'est l'archétype de la diarrhée cholériforme. Il est présent dans la zone intertropicale avec une prévalence accrue en Inde et en Amérique du Sud [BANDYOPADHAYA *et al.*, 2009].

C'est une maladie des mains sales, le plus souvent liée à l'ingestion d'eau contaminée par des selles infectées. Le choléra est très contagieux et est une maladie à déclaration obligatoire [SACK *et al.*, 2004]. La pathologie se traduit par de la diarrhée brutale après une incubation de moins de 7 jours avec des diarrhées très abondantes (parfois plus de 15 à 20 litres par jour), hydriques « eau de riz », vomissements incoercibles et une déshydratation majeure [PETRI *et al.*, 2008].

A.2. Diarrhée à *Staphylococcus aureus* et autres bactéries sécrétant des toxines

C'est une toxi-infection alimentaire liée à l'entérotoxine thermostable de *S. aureus*. Elle fait suite à l'ingestion de la toxine contenue dans les aliments (souvent réfrigérés) : crèmes glacées et pâtisseries [CHIANG *et al.*, 2008]. La pathologie se traduit par de la diarrhée. L'incubation est très courte, de moins de 4 heures (c'est le seul exemple fréquent d'incubation aussi courte). Elle apparaît avec des vomissements brutaux, diarrhées liquides [LARKIN *et al.*, 2009]. L'évolution est spontanément favorable en 24 heures. D'autres bactéries peuvent fabriquer des toxines et donner un tableau proche : *Bacillus cereus* (riz pré-cuit gardé à température ambiante) et *Clostridium perfringens* [GRAVET *et al.*, 1999].

A.3. Diarrhée à *Escherichia coli*

A.3. 1. Entérotoxigène

C'est la « turista » du voyageur, causée par deux toxines (thermostable et thermolabile) suite à l'ingestion d'eau ou d'aliments mal réfrigérés. Le tableau se déclare en 24 à 48 heures.

Le tableau est variable, soit cholérimforme sont plus banal avec nausées et vomissements. Comme souvent dans les diarrhées infectieuses hydro-électrolytiques liées à une toxine [LEVINE *et al.*, 1977].

A.3. 2. Autres types d'*E. coli* : Entéro-hémorragique, pathogène, invasif

Ils donnent des diarrhées fréquemment sanglantes, parfois proches de la Shigellose (entéro-invasif).

Klebsiella oxytoca : souvent en cause lors de diarrhées sanglantes après antibiotiques (ampicilline, C1G, pristinamycine). Sa recherche est possible par coproculture mais elle doit être spécifiée [ADAGU *et al.*, 2002].

A. 4. Diarrhées virales

Ce sont les plus fréquentes, elles évoluent par épidémies, en particulier en hiver et dans les collectivités, les virus les plus fréquents sont : Rotavirus, Entérovirus et Adénovirus. Le tableau associe des diarrhées importantes et des vomissements avec une fièvre modérée et des signes de virose (myalgies, céphalées). L'évolution est rapidement favorable [SOLTAN *et al.*, 2015].

A.5. Diarrhées à Salmonelles et à *Yersinia enterocolitica*

Les salmonelles en cause ici sont non typhiques : *S. typhimurium*, *enteritidis*.

Les aliments contaminés sont principalement les œufs et la volaille [TSOLIS *et al.*, 1999]. Le tableau débute après 1 à 2 jours d'incubation et associe : fièvre à 39-40 C°, douleurs abdominales, localisées en fosse iliaque droite pour *Yersinia*, vomissements, diarrhées liquides, oligoarthritis et érythème noueux peuvent se voir pour *Yersinia* [JACKSON *et al.*, 2013].

A.6. Colite pseudomembraneuse

Elle est liée à une prolifération d'une bactérie anaérobie, *Clostridium difficile*, contexte souvent évocateur : immunodépression, prise récente d'antibiotiques, chimiothérapie, hospitalisation... avec

des diarrhées très liquides, fièvre élevée (40 °C) et des douleurs abdominales [FALK *et al.*, 1998; FREEMAN et WILCOX, 1999].

A .7. Diarrhées de l'immunodéprimé

Les diarrhées de l'immunodéprimé évoluent assez rarement en contexte de diarrhée aiguë, le tableau est habituellement celui d'une diarrhée chronique aspécifique, parfois marquée avec malabsorption pour la cryptosporidiose [TZIPORI et WARD, 2002].

La présence des parasites est prouvée par l'examen parasitologique des selles, qui peut mettre en évidence : *Cryptosporidium* (cryptosporidiose), *Enterocytozoon* et *Septata* (microsporidiose), *Isospora* (isosporose), *Cyclospora* (cyclosporose) [ROSSLE *et al.*, 2012].

B. Diarrhées non infectieuses

B.1. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Une poussée inaugurale de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique peut donner lieu à des diarrhées aiguës. L'examen endoscopique est alors primordial pour conforter le diagnostic de MICI par la réalisation de biopsies [FELTON *et al.*, 1990].

B. 2. Colite ischémique

C'est la plus fréquente des manifestations d'ischémie intestinale. Le plus souvent localisée à gauche (sigmoïde notamment, mais très rarement le rectum) en raison d'un réseau de collatéralité plus faible à cet endroit [CHANG *et al.*, 2010].

En cas d'atteinte colique gauche, c'est l'artère mésentérique inférieure qui est touchée, en cas d'atteinte droite (plus rare), c'est l'artère mésentérique supérieure. La colite ischémique est essentiellement liée à l'athérome et aux pathologies emboligènes. Une thrombophilie peut la favoriser [CHANG *et al.*, 2010].

B. 3. Autres diarrhées non infectieuses

B. 3.1. Diarrhée liée à l'ingestion de champignons : L'exemple-type est l'intoxication par l'amanite phalloïde, responsable d'une hépatite aiguë sévère voire fulminante associée à une diarrhée liquide avec vomissements qui peuvent entraîner une déshydratation importante.

B. 3.2. Diarrhée motrice fonctionnelle : Elle rentre dans le cadre des troubles fonctionnels intestinaux.

B. 3.3. Diarrhée médicamenteuse : L'apparition de la diarrhée suit habituellement de peu l'introduction du médicament. Les plus fréquemment en cause sont : AINS, chimiothérapie, colchicine, sels d'or. L'arrêt du médicament permet le plus souvent de faire régresser les symptômes [CHASSANY *et al.*, 2000].

B. 3.4. Diarrhée chronique : Selon THEIS *et al.* (2010), Il existe 5 grands types de diarrhée chronique :

Malabsorption : Liée à une anomalie de l'entérocyte ou de la digestion (maldigestion), osmotique : Par augmentation de l'osmolarité du contenu de la lumière intestinale qui favorise l'appel d'eau , sécrétoire : Par sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière digestive (avec lésions intestinales associées ou non) , motrice : Par accélération du transit : le contact entre le contenu de la lumière intestinale et l'épi-thélium digestif est raccourci, ce qui empêche la réabsorption d'électrolytes. Volumogénique : Par augmentation de volume des sécrétions.

- **Diarrhée chronique par malabsorption :** Elle est souvent suspectée par les examens biologiques de base (hypoalbuminé, carence en vita-mine K, hypocalcémie avec hypocalciurie par carence en vitamine D, carence en f lates ou en fer...) WONG *et al.* (2012). Cette malabsorption est causée par :

- Pré-entérocytaire : Par défaut de digestion des composés qui ne parviennent pas digérés à l'entérocyte,

- Entérocytaire : Par atteinte de l'entérocyte (avec ou sans destruction cellulaire).

- Post-entérocytaire : L'absorption par l'entérocyte est normale mais il existe une entéropathie exsudative qui relargue dans l'intestir les nutriments absorbés [VIJAYVARGIYA *et al.*, 2013].

I.3. Appareil digestif chez les bovins

Les bovins appartiennent à une classe d'animaux appelés ruminants. L'appareil digestif des ruminants contient : la bouche, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin [HOFMANN, 1989].

La bouche des bovins contient 32 dents, cette configuration permet aux bovins de récolter et mâcher une grande quantité d'aliments fibreux [REID *et al.*, 1989].

Les ruminants sont des animaux qui ont quatre compartiments à leur estomac qui sont : rumen, réticulum, omasum et abomasum (**Figure 3**).

Le réticulum, avec sa doublure en nid d'abeille, est un compartiment de l'estomac impliqué dans la rumination. Il s'agit également comme un piège pour les objets étrangers ingérés par la vache [REID et CORNWALL, 1959 ; MALBERT et RUCKEBUSCH, 1989].

Le rumen est le plus grand compartiment, et il contient des milliards de bactéries, protozoaires, moisissures et levures. Ces micro-organismes vivent de manière symbiotique avec la vache, et ce sont la raison pour laquelle les bovins peuvent manger et digérer les grandes quantités. Les micro-organismes du rumen sont suffisamment adaptables pour que les bovins puissent digérer une grande variété d'aliments, de l'herbe, du foin et du maïs aux brasseurs céréales, tiges de maïs, ensilage et même urée [REID et CORNWALL, 1959 ; CLARKE et REID, 1970].

L'omasum est également connu « Le feuillet » en raison de ses nombreux plis en forme de feuilles. Il fonctionne comme la porte de la caillette, filtrant les grosses particules et permettant aux particules fines et fluide à passer à la caillette [MALBERT et RUCKEBUSCH, 1989].

La caillette est également connue sous le nom de « vrai estomac », fonctionne un peu comme l'estomac humain produisant de l'acide et certaines enzymes pour démarrer la digestion des protéines [KENNEDY et MURPHY, 1988].

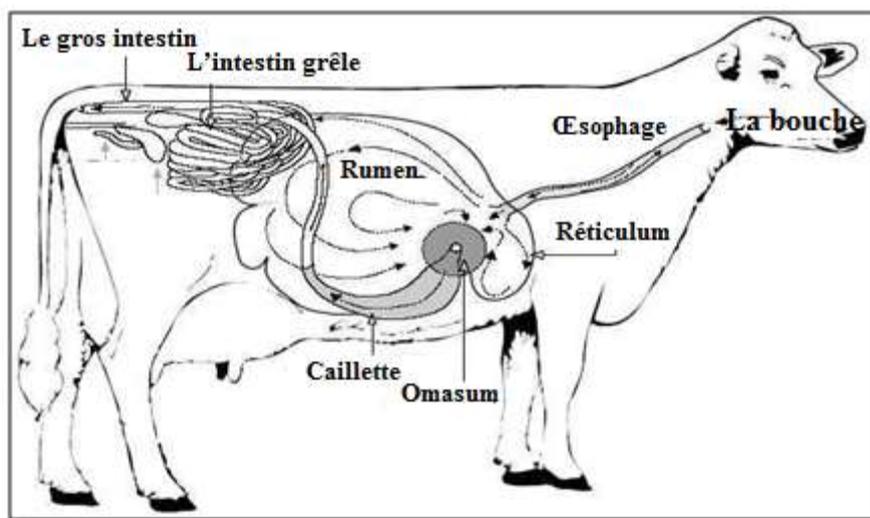


Figure 3. Système digestif des bovins [HALL et SILVER, 2014].

L'intestin grêle produit des enzymes pour faciliter la digestion, mais sa fonction principale est l'absorption des nutriments. À l'exception des acides gras volatils, la plupart des nutriments sont absorbés dans l'intestin grêle, y compris les protéines, l'amidon, les graisses, les minéraux et les vitamines [CLARKE et REID, 1970 ; HOFMANN, 1989].

Le gros intestin, l'eau est principalement absorbée dans le gros intestin. Les aliments non digérés, un excès d'eau et certains déchets métaboliques quittent le gros intestin sous forme de matières fécales [KENNEDY et MURPHY, 1988].

La consistance du fumier est un indicateur de l'animal dépend de la teneur en eau, en fibres et en protéines des aliments. Par exemple, les bovins sur un fourrage luxuriant au printemps auront un fumier aqueux abondant de couleur verdâtre, alors que les animaux suivant un régime de foin auront un fumier ferme qui est de couleur sombre [[DESWYSEN et ELLIS, 1988 ; REID *et al.*, 1989].

I.4. Diarrhée chez les bovins

I.4.1. Définition

La diarrhée néonatale chez les veaux se caractérise par l'apparition aiguë de selles molles ou liquides. Elle affecte entre 10 à 35% des veaux allaités et elle est responsable de plus de 50% des pertes avant le sevrage [BARTELS *et al.*, 2010]. La diarrhée provoque une léthargie et une perte progressive d'appétit et de croissance, et peut réduire le gain de poids. Globalement, la diarrhée chez les veaux entraîne des pertes économiques sérieuses qui peuvent être réduites par une prévention et un traitement adéquat [BARTELS *et al.*, 2010 ; IZZO *et al.*, 2011].

Les veaux souffrant de diarrhée peuvent se déshydrater et perdre entre 5 et 12% de leur poids après deux jours avec des signes cliniques (des yeux enfoncés, faible élasticité de la peau, bouche et nez secs, membres et oreilles froids) sont plus prononcés et peuvent entraîner la mort [ØSTERÅS *et al.*, 2007].

La diarrhée chez les veaux provoque un comportement pathologique, qui inclut des changements physiologiques et comportementaux chez les animaux affectés. Le comportement lié à la maladie est une stratégie adaptative qui augmente l'efficacité de la réponse immunitaire, car il permet à l'animal d'utiliser ses ressources énergétiques pour lutter contre la maladie [BARTELS *et al.*, 2010].

Les veaux souffrant de diarrhée montrent de la léthargie, de la somnolence et une perte d'appétit et de soif, et peuvent être plus réticents que d'habitude à s'approcher de l'éleveur. De plus,

les veaux malades réduisent leur activité physique générale et se couchent pendant des périodes plus longues que la normale, ils réduisent encore leur comportement de toilettage automatique et interagissent moins avec les autres animaux [BERCHTOLD *et al.*, 2009].

I.3.2. Agents causaux de la diarrhée

La cause de la diarrhée peut être infectieuse ou nutritionnelle. La diarrhée infectieuse est provoquée par des agents viraux (rotavirus, coronavirus), bactériens (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) et parasitaires (*Cryptosporidium parvum*, *Eimeria* spp., *Giardia* spp., *Strongle* et les cryptosporidies sont les parasites les plus fréquemment identifiés) pouvant agir indépendamment ou simultanément [HUR *et al.*, 2013; CHO et YOON, 2014]. Ces agents pathogènes endommagent le tractus intestinal par la destruction et le détachement d'entérocytes, l'atrophie des villosités et l'inflammation de la sous-muqueuse [CHO et YOON, 2014].

CHAPITRE II.

"PARASITES INTESTINAUX (PROTOZOAIRES INTESTINAUX)"

II. Parasites intestinaux (protozoaires intestinaux)

L'intestin peut être infecté par plusieurs types de parasite parmi eux :

Cryptosporidium spp., *Giardia* spp., *Isospora*, etc ...

II.1. *Cryptosporidium* spp.

II.1.1. Historique

En 1907, Tyzzer est le premier qui a découvert le genre *Cryptosporidium*, dans l'estomac de souris, qu'il a nommé *Cryptosporidium muris* [TYZZER, 1910]. Plus tard, le même auteur découvre un deuxième isolat dans l'intestin grêle de souris, qu'il a nommé *Cryptosporidium parvum* [O'DONOGHUE, 1995].

Le pouvoir pathogène pour l'homme des cryptosporidies est de découverte récente (1976) chez les enfants [NIME *et al.*, 1976]. En 1982, ils ont découvert la présence de *Cryptosporidium* chez quelques personnes en bonne santé vivant en contact avec le bétail [CURRENT *et al.*, 1983]. Depuis ce temps, l'infection avec ce parasite est généralement associée à une diarrhée. L'épidémie la plus connue est en 1993 à Milwaukee au (Etats-Unis) et qui a touché plus de 400 000 personnes via l'eau du robinet contaminée [NIME *et al.*, 1976].

II.1.2. Taxonomie

Cryptosporidium est un protozoaire intracellulaire, parasite les entérocytes. Il appartient à :

- **Embranchement** : *Protozoa* ;
- **Sous-embranchement** : *Apicomplexa* ;
- **Classe** : *Coccidea* ;
- **Ordre** : *Eimeriida* ;
- **Famille** : *Cryptosporidiidae* ;
- **Genre** : *Cryptosporidium* ;
- **Espèces** : voir tableau 1.

Parmi les espèces de *Cryptosporidium*, *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium hominis* sont les espèces les plus courantes provoquant des maladies chez les humains [XIAO *et al.*, 1999]. Les autres espèces sont des parasites des mammifères, des oiseaux, des reptiles, des amphibiens et des poissons (Tableau 1) [FAYER, 2010].

Tableau 1 : Espèces de *Cryptosporidium* et leurs hôtes principaux [FAYER, 2010].

Espèces	Hôte principal
<i>C. andersoni</i>	Bétail et camélidés
<i>C. baileyi</i>	Oiseaux
<i>C. canis</i>	Chiens
<i>C. felis</i>	Chats
<i>C. hominis</i>	Humains et singes
<i>C. meleagridis</i>	Oiseaux et humains
<i>C. muris</i>	Rongeurs et camélidés
<i>C. parvum</i>	Humains et les autres mammifères
<i>C. saurophilium</i>	Reptiles
<i>C. serpentis</i>	Serpents
<i>C. wrairi</i>	Cobayes
<i>C. galli</i>	Oiseaux
<i>C. bovis</i>	Bétail
<i>C. suis</i>	Porcs
<i>C. molnari</i>	Poissons
<i>C. scophtalmi</i>	Poissons
<i>C. xiaoi</i>	Mouton, Yak, Chèvre
<i>C. fragile</i>	Grenouille
<i>C. ryanae</i>	Bétail
<i>C. marcopodum</i>	Kangourou
<i>C. fayeri</i>	Kangourou

Cryptosporidium parvum a de nombre d'hôtes, le plus large et le plus couramment incriminé dans les infections de l'homme et du bétail [HUNTER *et al.*, 2003 ; APPELBEE *et al.*, 2005].

II.1.3. Morphologie et cycle de vie

Les oocystes de *Cryptosporidium* spp. sont de petite taille, mesurant entre 4 et 6 μm de diamètre et sont sphériques et contiennent quatre sporozoïtes autour d'un corps résiduel menu d'une paroi à deux membranes séparées par un espace clair (**Figure 4**) [BOUREE et LANCON, 2005].

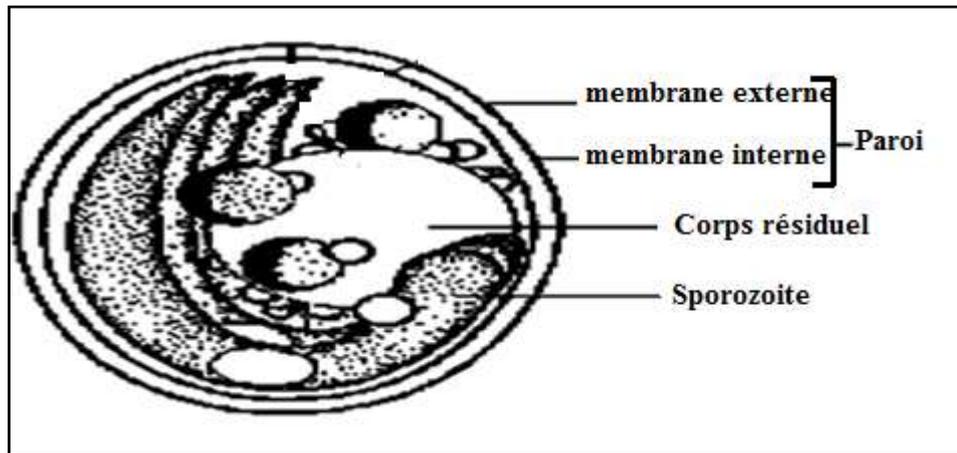


Figure 4. Schéma d'un oocyste [BOUREE et LANCON, 2005].

Le cycle de vie de *Cryptosporidium* comprend un seul hôte. Il implique deux stades asexués et sexués. Il y a six principales étapes de développement, comme l'a décrit TZIPORI et WARD (2002), et qui comprend : Excystation, mérogonie, gamétogonie, la fertilisation et le développement zygote, et la sporogonie (**Figure 4**) [SMITH *et al.*, 2007].

L'infection par *Cryptosporidium* commence par l'ingestion des oocystes par l'hôte. L'oocyste est le stade exogène excrétée dans les fèces [FAYER *et al.*, 1997]. Le stade oocyste est stable dans l'environnement, capable à survivre au traitement de routine des eaux usées et peut résister à la désinfection de l'eau potable [FAYER *et al.*, 1997]. Après l'ingestion des oocystes via les aliments et l'eau contaminée, ou par contact direct avec des personnes ou des animaux infectés, l'oocyste subit une excystation, libérant ainsi quatre sporozoïtes dans l'intestin grêle (surtout l'iléon) qui envahit les cellules épithéliales [O'DONOGHUE, 1995]. Les sporozoïtes fixent sur la surface luminale des cellules épithéliales et se différencient de façon asexuée en trophozoïtes qui produit deux types différents de méronites par la mérogonie [CURRENT *et al.*, 1983 ; O'DONOGHUE, 1995].

Le premier type de méronite forme huit mérozoïtes, qui pénètrent dans les cellules épithéliales voisines et soit développer, le 2^{ième} type de méronite ou le 1 type de méronite qui complète un autre cycle [CAREY *et al.*, 2004]. Les méronites de type II produisent quatre mérozoïtes qui deviennent microgamontes ou macrogamontes [O'DONOGHUE, 1995 ; HIJJAWI *et al.*, 2004].

La fécondation entre les gamontes aboutit à la formation d'un zygote qui se développe en oocystes contenant quatre sporozoïtes (**Figure 5**) [O'DONOGHUE, 1995 ; TZIPORI et WARD, 2002]. Deux types d'oocystes sont ainsi produits, des oocystes à paroi épaisse qui sont excrétés dans les fèces et des oocystes à parois mince qui recyclent dans le tractus intestinal provoquant auto-infection [CURRENT *et al.*, 1983 ; HIJJAWI *et al.*, 2004]. Ce phénomène peut expliquer le mécanisme de l'infection persistante chez les patients SIDA en absence de l'exposition des autres oocystes [TZIPORI et WARD, 2002].

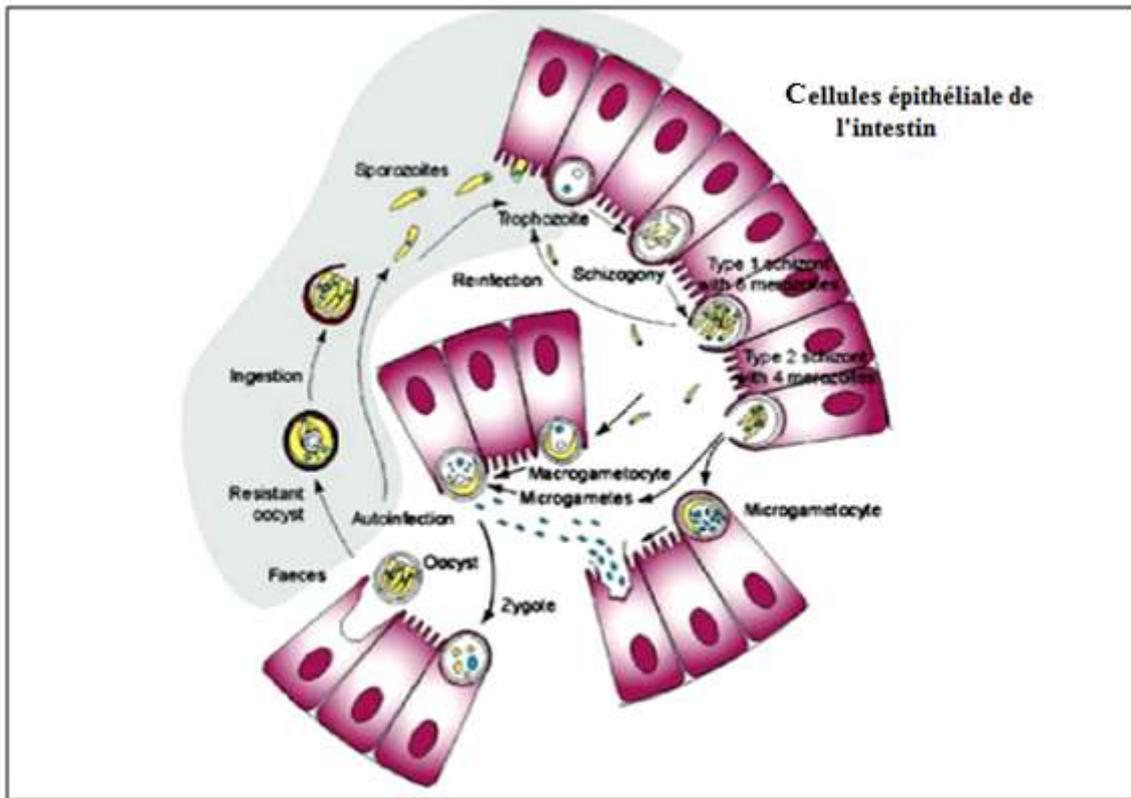


Figure 5. Cycle biologique de *Cryptosporidium* [SMITH *et al.*, 2007].

II.1.4. Physiopathologie

Cryptosporidium a été reconnu comme une cause de maladie gastro-intestinale à la fois chez les personnes immunocompétentes et les personnes immunodéficientes [CURRENT *et al.*, 1983 ; FAYER et UNGAR, 1986]. Les manifestations cliniques de la cryptosporidiose comprennent généralement la diarrhée, des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et une fièvre [MAC KENZIE *et al.*, 1994].

L'histoire clinique et l'examen physique sont tout à fait précieux comme dépistage préliminaire pour l'étiologie de la diarrhée. La consommation de nourriture et d'eau pourrait être la source de l'infection [LEARMONTH *et al.*, 2004].

La diarrhée aiguë peut être causée par les rotavirus alors que la diarrhée persistante est généralement causée par les protozoaires tels *Cryptosporidium* et *Giardia* [SANGAJI *et al.*, 2015].

Cryptosporidium infecte les tissus de la surface superficielle de l'épithélium intestinale dans l'iléon et provoque la destruction de la couche épithéliale [GUERRANT, 1997], Avec une atrophie villositaire et une hyperplasie des cryptes, avec une infiltration de la lamina propria par des lymphocytes, des macrophages et des polynucléaires neutrophiles, et la présence des lymphocytes T et polynucléaires neutrophiles intraépithéliaux (Figure 6) [FAYER *et al.*, 2000; AKAM *et al.*, 2002 ; TZIPORI et WARD, 2002; GRACZYK *et al.*, 2005].

Des études approfondies sur la cryptosporidiose démontrent la perte de vacuoles du bout d'épithélium des villosités accompagné d'une réduction de co-transport de sodium couplé au glucose [ARGENZIO *et al.*, 1993].

Cryptosporidium perturbe la fonction de la barrière intestinale et augmente sa perméabilité, entraînant une diminution d'absorption et augmente la sécrétion de fluide et d'électrolytes, et de nutriments, qui conduit à la malnutrition et à la diarrhée aqueuse [GOODGAME *et al.*, 1995].

L'infection persiste en absence d'exposition ultérieure aux oocystes est assez fréquent, en particulier chez les patients immunodéprimés. Les oocystes à paroi mince excystent dans le tractus intestinal sans jamais quitter l'hôte et avoir la capacité de causer une auto-infection [TZIPORI et WARD, 2002].

En outre, l'attachement des sporozoïtes mobiles à l'épithélium induit la formation de vacuole parasitophore et cette structure unique fournit une protection de *Cryptosporidium* de l'environnement hostile du tractus gastro-intestinal de l'hôte [MING *et al.*, 2018].

Dans les pays en développement, où les enfants sont plus sensibles à l'infection, la cryptosporidiose au début d'enfance peut être associée à des affaiblies développement physique et cognitif, même en l'absence de diarrhée [GUERRANT *et al.*, 2008; KOSEK *et al.*, 2001]. La cryptosporidiose est l'une des infections opportunistes plus graves chez les patients atteints du SIDA.

Un patient qui atteint du SIDA avec une numération des lymphocytes T CD4 de <150 / ml peut développer une infection persistante, souvent accompagnée avec des blessures graves et diarrhée mortelles [CHEN *et al.*, 2002]. Le parasite peut également se propage des intestins aux canaux

hépatobiliaires et pancréatiques, provoquant une cholangiohépatite, cholécystite, cholédochite ou pancréatite [TZIPORI et WARD, 2002]

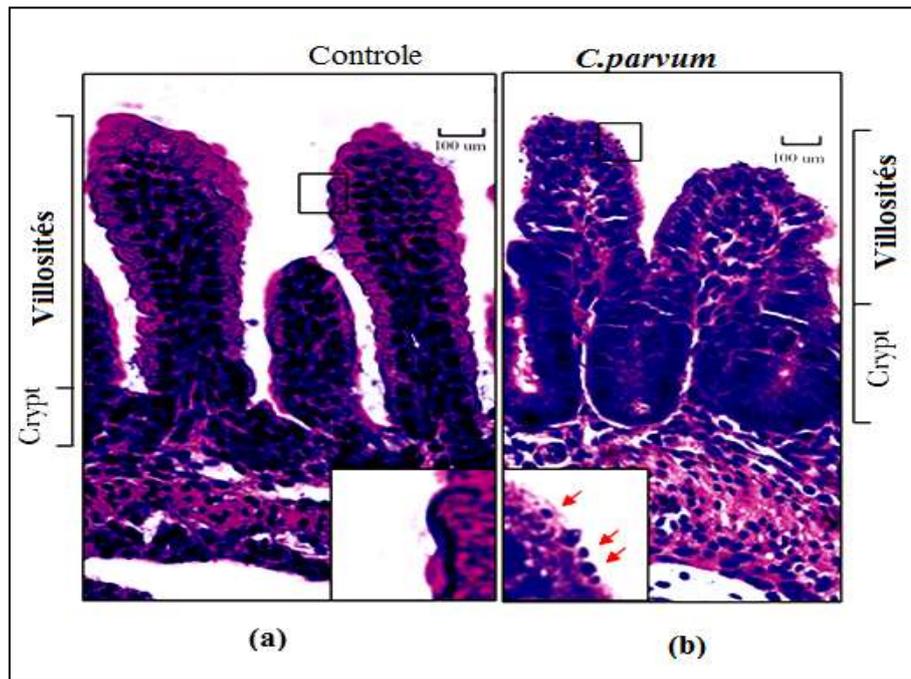


Figure 6. Epithélium intestinale [MING *et al.*, 2018].

a : le contrôle, **b:** présence de *Cryptosporidium*

Les cellules épithéliales infectées par *C. parvum* ou *C. hominis*. Les cellules épithéliales jouent également un rôle central dans la réponse au parasite en produisant divers médiateurs :

- Des cytokines pro inflammatoires (IL8, Gro-alpha, TNF alpha, RAN-TES).
- Le TGF – bêta, une cytokine anti-inflammatoire qui stimule la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire et joue un rôle protecteur de la muqueuse.
- Des prostaglandines.
- Une bêta-défensine, qui appartient à une famille de peptides de faible poids moléculaire à activité antimicrobienne (**Figure 7**) [HIJJAWI *et al.*, 2004].

L'expression de protéines de choc thermique par les cellules infectées pourrait intervenir pour stimuler les lymphocytes T à la phase précoce de la réponse immunitaire. Il est établi que le contrôle de la cryptosporidiose repose essentiellement sur la voie TH1 et l'interféron gamma [LAURENT et LAMANDE, 2017].

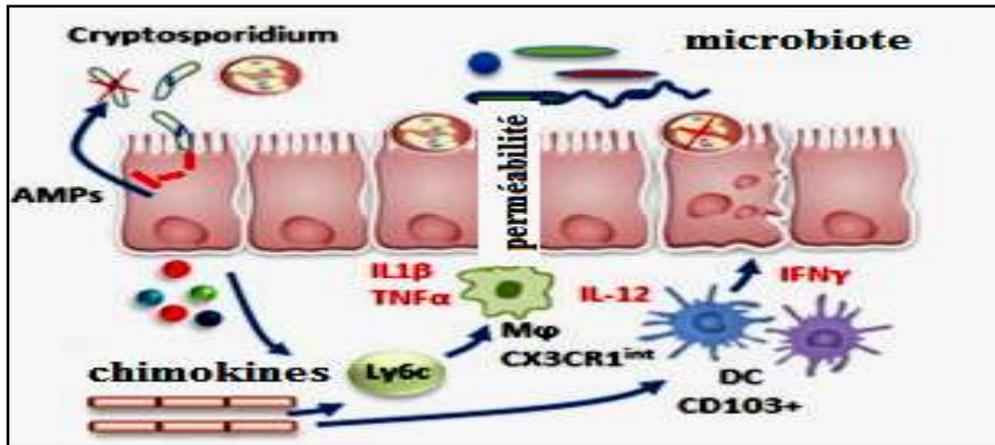


Figure 7. Réponse immunitaire innée à *Cryptosporidium* [LAURENT et LAMANDE, 2017].

II.1.5. Transmission et épidémiologie

Cryptosporidium peut être transmis directement par personne à personne, animal à homme, animal à animal, ou indirectement par l'eau, la nourriture et éventuellement par l'air [FAYER *et al.*, 2000]. Les animaux sont considérés comme un réservoir de *Cryptosporidium*, avec un potentiel de contamination des sources d'eau des ménages. La plupart de cryptosporidiose humaine est associée à *C. parvum* et *C. hominis* [CAMA *et al.*, 2003; LEARMONTH *et al.*, 2004]. En outre, les enfants infectés par *C. hominis* éliminent un nombre plus élevés d'oocystes parce qu'ils ont le système immunitaire amoindri et les oocystes peuvent coloniser plus facilement l'intestin, contribuant éventuellement à la prévalence accrue et la propagation de *C. hominis* au sein de ces communautés [MCLAUHLIN *et al.*, 2000; XIAO *et al.*, 2001].

Les oocystes infectieux peuvent être excrétés avec les selles dans la 5^{ème} semaine même après la fin de la maladie diarrhéique, ce qui signifie que l'absence de diarrhée ne signifie pas nécessairement que l'infection est disparue [DIERS et MCCALLISTER, 1989]. Au niveau de l'hôpital, la cryptosporidiose apparaisse chez les personnes âgées hospitalisées, les patients infectés par le VIH, les personnes ayant subi une transplantation de la moelle osseuse ainsi que les services pédiatriques [BAXBY *et al.*, 1983, DRYJANSKI *et al.*, 1986].

Les animaux de ferme ont longtemps été impliqués comme sources d'infection humaine *C. parvum* a été l'espèce la plus répandue chez les animaux d'élevage, en particulier chez les veaux. Chez le mouton, la prévalence varie de 10% à 68% [MAJEWSKA *et al.*, 2000 ; CONNELLY *et al.*, 2013] et entre 11,0% et 35,2% chez les chèvres [NOORDEEN *et al.*, 2000 ; WATANABE *et al.*, 2005]. Au Royaume-Uni, l'infection humaine avec *C. parvum* considérablement diminuée après

l'application de plusieurs mesures d'intervention qui ont diminué le contact humain avec le bétail, qui était auparavant considéré comme un facteur de risque de cryptosporidiose [HUNTER *et al.*, 2003].

Les animaux domestiques peuvent être considérés comme une source potentielle d'infection pour l'homme [CAMA *et al.*, 2003]. Concernant *Cryptosporidium meleagridis*, un parasite initialement décrit chez les dindes, a été également détecté chez l'homme au Royaume-Uni [MCLAUHLIN *et al.*, 2000], en Thaïlande [TIANGTIP et JONGWUTIWES, 2002] et Pérou [CAMA *et al.*, 2003]. Les chiens et les chats semblent être les plus souvent infectés avec *Cryptosporidium canis* et *Cryptosporidium felis* [TIANGTIP et JONGWUTIWES, 2002] et peuvent agir comme des zoonoses réservoirs de cryptosporidiose humaine [XIAO et FENG, 2008].

Au cours de la dernière décennie, *Cryptosporidium* a émergé comme un agent pathogène entérique important parmi les 150 autres germes potentiellement pathogènes d'origine hydrique. *Cryptosporidium* est le plus célèbre dans les pays développés, responsable de grandes étendues d'eau épidémies [ROSE *et al.*, 1997 ; KARANIS *et al.*, 2007]. *Cryptosporidium* a été responsable des épidémies d'origine hydrique associées à l'eau destinée à la consommation aux États-Unis [MOORE *et al.*, 1993 ; MAC KENZIE *et al.*, 1994].

La plus large épidémie de maladies d'origine hydrique documentée en 1993 à Milwaukee, qui a pu infecter 403 000 personnes et plus de 100 personnes sont mortes qu'ayant présenté un système immunitaire affaibli [MAC KENZIE *et al.*, 1994]. L'analyse a révélé que l'épidémie de Milwaukee était due à *C. hominis* [ZHOU *et al.*, 2003].

Les épidémies de cryptosporidiose d'origine alimentaire ont été comptabilisées dans le monde entier. Les principales sources de nourriture la contamination provient de la consommation des fruits de mal nettoyage, légumes et crustacés crus, viande, boissons et autres produits alimentaires ; manipulateurs d'aliments insalubres ; et contamination par vecteurs tels que les insectes et les oiseaux [MILLAR *et al.*, 2002 ; RYAN et CACCIO, 2009].

La paroi de l'oocyste de *Cryptosporidium* spp. le rend tout à fait résistant aux changements de l'environnement pendant des mois. C'est extrêmement résistant à la désinfection chimique et non affecté par chlore, chloramines et dioxyde de chlore admissibles dans le traitement de l'eau potable [KORICH *et al.*, 1990]. L'ozone est très puissant désinfectant chimique pour les oocystes de *Cryptosporidium*, mais aussi plus dangereux [RAN *et al.*, 2010]. La surexposition à l'ozone peut donner lieu à formation de fortes concentrations de sous-produits potentiellement génotoxiques [KATO *et al.*, 2004 ; SINSKI et BEHNKE, 2004].

II.1.6. Diagnostique

a. Diagnostique clinique et épidémiologique

Les données épidémiologiques et cliniques permettent seulement d'orienter le diagnostique avec certitude de l'infection au *Cryptosporidium* au sein des exploitations ovines et caprines.

Les données épidémiologiques et cliniques permettent d'aboutir à une suspicion mais certainement pas à une certitude. L'apparition de diarrhées plutôt sévères chez les ruminants (caprins, bovins) âgés de 5 à 20 jours, au cours de la seconde moitié des mises bas est un bon signe d'appel. Cette diarrhée n'a en revanche rien qui la distingue vraiment des autres diarrhées néonatales [CHARTIER, 2001].

b. Diagnostique différentiel

Toutes les causes nutritionnelles ou infectieuses du complexe des diarrhées néonatales des ruminants entrent dans le diagnostique différentiel.

Par exemple chez le chevreau, aucun agent pathogène n'est retrouvé dans 20% des diarrhées épizootiques et la conduite alimentaire semble jouer un rôle important [MILLEMANN *et al.*, 2003].

c. Diagnostique de laboratoire

Les mesures de contrôle étant particulièrement lourdes, il est essentiel d'être sûr de son diagnostique. Le diagnostique de laboratoire repose sur la mise en évidence des oocystes dans les matières fécales. Le prélèvement est individuel et peut être effectué sur des matières fécales prélevés dans le rectum ou sur le sol [KHELEF *et al.*, 2007].

Différentes techniques d'examen coproscopique existent et elles présentent des caractéristiques de sensibilité et de spécificité propre. Dans la pratique courante, c'est-à-dire l'examen de matières fécales des animaux, les niveaux d'excrétion sont tels que toutes les techniques, coloration, flottation ou immuno-marquage. Toutefois, la présence de parasite n'est pas synonyme de la présence de cryptosporidiose clinique. Lorsque la technique le permet, une semi-quantification ou une quantification de l'excrétion donne plus de valeur au résultat de laboratoire.

Il n'existe pas de diagnostique sérologique applicable en routine [BLONCOU, 2003].

c. 1. Technique de concentration

Différentes techniques de concentration sont utilisées tel que la flottation dans une solution saturée de sucrose (solution de Sheather), dans une solution saturée de Sulfacide de Zinc (ZnSO₄) ou dans une solution saturée de Chlorure de Sodium (NaCl). Il existe également, autres techniques de concentration par sédimentation dans la formaline-acétate d'éthyle (FAE) ou dans la formaline-éther (FE) qui nécessitent de plus petites quantités de matières fécales que les techniques de flottation [BIAGBURN et BUTLER, 2006 ; TULI *et al.*, 2010].

c. 2. Technique de coloration

Elle se repose sur la mise en évidence d'oocystes dans les matières fécales. Ces oocystes mesurent entre 4 à 6 µm de diamètre. Ces techniques de colorations sont simples et peu onéreuses. Elles requièrent un opérateur très expérimenté et avertis [AKAM *et al.*, 2004].

Le diagnostique de routine est souvent fait avec ces méthodes étant donné le haut niveau d'excrétion d'oocystes chez les animaux diarrhéiques atteints de cryptosporidiose [CHARTIER *et al.*, 2002].

La méthode la plus utilisée pour la mise en évidence de *Cryptosporidium* spp. est la coloration permanente de Henriksen et Polhenz modifiée (1981), aussi appelée Ziehl-Neelsen modifiée, qui permet de visualiser les ookystes colorés par la fuchsine, comme des particules sphériques de couleur rougeâtre sur fond bleu vert [CHARTIER *et al.*, 2002; AKAM *et al.*, 2004; ZAGLOOL *et al.*, 2013].

Les ookystes apparaissent comme des formation sphériques ou ovoïdes, rose brillants sur un fond vert et plus sombre [AKAM *et al.*, 2004]. Ils ne doivent pas être confondus avec des levures, sans structures internes. Les lames doivent être lues rapidement (dans les 15 mn), la réfringence s'atténue et disparaît ensuite [CASEMORE, 1991].

La lecture est nettement plus facile en microscopie à contraste de phase. Ce matériel n'est pas toujours disponible ce qui constitue une des limites d'utilisation de la méthode. La méthode peut apporter des informations semi-quantitatives. Le comptage des ookystes permet d'obtenir un score d'infestation : un + correspond à moins d'un ookyste par champ à l'objectif x 40 et 4 + à plus de 20 ookystes par champ avec le même objectif [DELAFOSSÉ *et al.*, 2006].

Autres colorations peuvent être utilisées comme la coloration au lugol et la coloration de Giemsa [VOHRA *et al.*, 2012].

c. 3. Technique d'ELISA (Détection des antigènes de cryptosporidies)

Les antigènes de *Cryptosporidium* sont mis en évidence lors de leur liaison à un anticorps spécifique. Un deuxième anticorps couplé à une enzyme reconnaît le premier complexe puis la réaction catalysée par l'enzyme libère un composé suivi par spectrophotométrie ou par lecteur visuelle [LATIF et JAKUBEK, 2008 ; CHALMERS *et al.*, 2011]. C'est une méthode rapide, facile et ne nécessitant pas d'expérience en microscopie, là encore sa spécificité est bonne (98-100%) mais la sensibilité ne semble pas augmentée par rapport aux techniques microscopiques [FAYER et XIAO, 2007].

Un des avantages d'ELISA réside dans leur capacité à détecter des fragments d'oocystes ce que ne permet pas la technique de coloration [JEX *et al.*, 2008].

c. 4. Technique d'immunofluorescence directe

On utilise des anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes spécifiques de la paroi des oocystes de *Cryptosporidium*. L'anticorps est marqué par un fluorochrome. Cette technique est à la fois très sensible (entre 98,5 et 100%) et très spécifique (entre 96 et 100%) [JEX *et al.*, 2008]. Cependant, la réaction croisée des anticorps et les coûts associés à ces techniques ont limité leur utilisation [LATIF et JAKUBEK, 2008].

c. 5. Kits de diagnostic rapide

Des kits de diagnostic rapide par immuno-chromatographie ont été mis au point récemment par le laboratoire BVT, pour détecter les agents pathogènes majeurs des diarrhées néonatales chez le veau [ROELLIG *et al.*, 2017].

Les antigènes de ceux du Coronavirus, du Rotavirus, *E. coli* et de l'oocyste de *C. parvum* peuvent être mis en évidence par l'immuno-chromatographie dans les fèces de veau. La réalisation et la lecture de ces tests se font en 15 minutes. Ces tests sont qualitatifs.

Pour la détection de l'oocyste de *C. parvum*, le test a une sensibilité de 0,947% et une spécificité de 0,95% [KATANIK *et al.*, 2001].

L'utilisation de ce test chez le chevreau n'a pas été validée en laboratoire mais certains praticiens l'utilisent déjà en routine dans cette espèce car il est simple, rapide et peu onéreux. Une limite à l'utilisation de ce test qualitatif pourrait éventuellement être liée à sa grande sensibilité puisqu'il n'est pas rare que des chevreaux sains excrètent pourtant une certaine quantité d'oocystes [ROELLIG *et al.*, 2017].

c.6. Technique sérologique

Il est possible de réaliser des sérologies pour détecter dans le sérum des anticorps, surtout des IgG anti-*Cryptosporidium*. Un titre d'anticorps élevé est corrélé avec une infection datant de moins de six mois [CHALMERS et KATZER, 2013].

La sérologie n'ayant que peu d'intérêt dans le diagnostique ; elle est principalement utilisée dans une perspective épidémiologique [CHALMERS *et al.*, 2011].

c.7. Technique nécropsique (histologique)

L'examen histologique de la partie terminale de l'intestin grêle révèle par contre une atrophie et une fusion des villosités, la dégénérescence et l'abrasion des microvillosités, une infiltration par diverses cellules inflammatoires et surtout la visualisation des parasites au sein de la bordure en brosse [RADOSTIS *et al.*, 2006].

La visualisation de ces lésions suppose que les tissus aient été fixes dans du formaldéhyde immédiatement après la mort, elle est plus inconstante lors d'autolyse [SMITH et SHERMAN, 1994].

Ces méthodes utilisées pour rechercher les ookystes dans les fèces restent applicables sur l'animal mort [AKAM *et al.*, 2004].

c. 8. Technique de biologie moléculaire

La technologie de réaction en chaîne par polymérase (PCR) fournit un diagnostique spécifique au niveau de l'espèce avec haute sensibilité. La réaction de polymérisation en chaîne permet de donner un examen reproductible et très précis, avec la capacité d'analyser un grand nombre d'échantillons [FAYER *et al.*, 2000]. Une variété de gènes sont utilisés dans les diagnostics actuels d'ADN et la taxonomie de *Cryptosporidium*, y compris la petite sous-unité ARNr (également connu sous le nom d'ARNr 18S [MORGAN *et al.*, 1997, PATEL *et al.*, 1999], protéine de choc thermique (HSP 70 gène) [SULAIMAN *et al.*, 2000], gène de la protéine de paroi externe de *Cryptosporidium* [PATEL *et al.*, 1999], gène de la protéine adhésive liée à la thrombospondine de *Cryptosporidium*-1 et le gène d'actine [SPANNO *et al.*, 1998].

II.1.7. Prophylaxie sanitaire et médicale

Aucune mesure préventive n'est recommandée de manière spécifique. Il reste cependant à appliquer des mesures de précaution, inhérentes à de bonnes pratiques d'élevages :

- Retrait immédiat des déjections ;
- Isolement des animaux malades ;

- Traitement et utilisation d'un lazaret pour les animaux malades et en particulier ceux présentant un syndrome diarrhéique ;
- Nettoyage et désinfection à l'OO-CIDE® des équipements et locaux contaminés ;
- Elimination correcte des cadavres animaux [BONNIN et CAMERLYNCK, 1989].

II.2. *Giardia* spp.

II.2.1. Historique

Giardia a été décrite pour la première fois par van Leeuwenhoek en 1681 alors qu'il examinait ses propres selles diarrhéiques au microscope [WOLFE, 1992 ; ADAM *et al.*, 1994 ; MEYER, 1994].

Cependant, il n'en avait pas fait de dessins mais sa description fut assez détaillée pour convaincre un grand nombre de chercheurs. C'est ainsi que l'espèce *Giardia duodenalis* fut associée à une maladie intestinale [ERLANDSEN et MEYER, 1984] et reconnue comme une cause de pathologie diarrhéique à partir de la fin des années 1950.

Une description plus détaillée de ce parasite fut donnée en 1859 par Lambl, indiquant la taille, la forme et la présence du disque ventral. Ensuite ce fut le tour de Grassi (1879, 1881) qui réussit à réaliser la première description du kyste, des flagelles et des noyaux du trophozoïte. Puis d'autres descriptions en microscope optique de trophozoïte et du kyste furent publiées par Simon en 1921 et Filice en 1952. Ce dernier détermina trois espèces pour le genre *Giardia* [ADAM, 2001].

II.2.2. Classification taxonomique

Au niveau de sa classification, le genre *Giardia* a été soumis à diverses taxonomies et comporte plus de 50 espèces [THOMPSON, 2004]. Actuellement il renferme six espèces distinctes :

- *G. agilis*, chez les amphibiens,
- *G. ardeae* et *G. psittaci*, chez les oiseaux,
- *G. microti*, chez les rats musqués et les campagnols,
- *G. muris*, chez les rongeurs,
- *G. lamblia* chez l'homme et un large éventail d'espèce de mammifères [THOMPSON, 2000]

et dont la position systématique est la suivante :

Règne: Protistes ;

Sous/Règne: Protozoa ;

Embranchement: Sarcomastigophora ;

Sous/Embranchement: Mastigophora ;

Classe: Zoomastigophora ;

Ordre: Diplomonadida ;

Famille: Hexamitidae ;

Genre: *Giardia* ;

Espèce: *Giardia lamblia*.

Cette distinction repose essentiellement sur la forme du trophozoïte, la taille relative du disque adhésif ventral par rapport aux cellules, et la forme des corps médians (**Figure 8**) [MONIS *et al.*, 1999]. Plus récemment, les progrès dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis une nouvelle approche phylogénétique, par des critères basés sur la conservation de certains loci et l'ARN ribosomal. Ainsi, une sixième espèce a été décrite, *Giardia microti*, qui infecte les rats musqués et les campagnols [THOMPSON *et al.*, 2000]. La plus cosmopolite de ces espèces est *Giardia duodenalis*, qui infecte un très large éventail de mammifères et inclut selon les références six à une douzaine de génotypes différents [THOMPSON, 2000 ; SOLARCZYK, 2009]. Deux d'entre eux seulement (génotypes A et B) ont un spectre d'hôte large, comprenant les carnivores domestiques et l'homme, les autres étant plus spécifiques [MONIS *et al.*, 2003].

II.2.3. Morphologie du parasite

Giardia est un protozoaire flagellé qui se présente sous deux formes : le trophozoïte et le kyste.

Le trophozoïte est en forme de goutte, avec une extrémité postérieure effilée (**Figure 8**) ; il mesure 6-8µm x 12-15µm. Ses faces ventrale et dorsale, respectivement concave et convexe, lui confèrent une forme de croissant en coupe histologique. La face ventrale est munie d'un disque adhésif permettant au parasite de demeurer en surface des cellules épithéliales digestives. Le trophozoïte est binucléé ; il possède quatre paires de flagelles assurant sa mobilité, et, transversalement, deux agrégats denses de microtubules et protéines contractiles : les corps médians.

En coproscopie, cette forme est rarement observable, hormis lors d'examen direct de selles fraîches [KIRKPATRICK, 1986 ; BARR *et al.*, 1994].

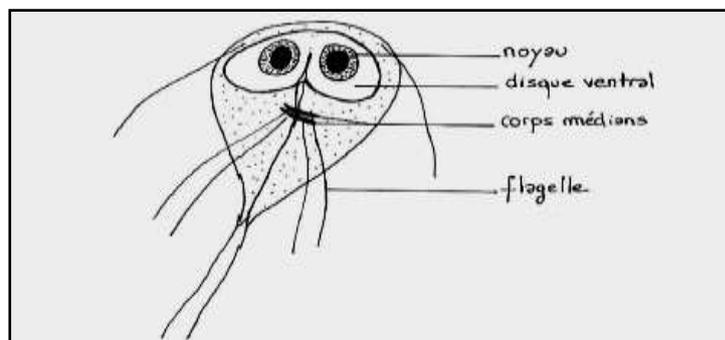


Figure 8. *Giardia*, forme trophozoïte [BARON, 1996].

Le kyste, est la forme de résistance et de contamination du parasite ; il est émis dans les matières fécales. De forme sub-sphérique, il mesure $7-10\mu\text{m} \times 8-12\mu\text{m}$ et contient deux ou quatre noyaux selon son stade de maturité. Les résidus de flagelles et de corps médians qu'il renferme correspondent à deux trophozoïtes incomplètement formés (**Figure 9**).

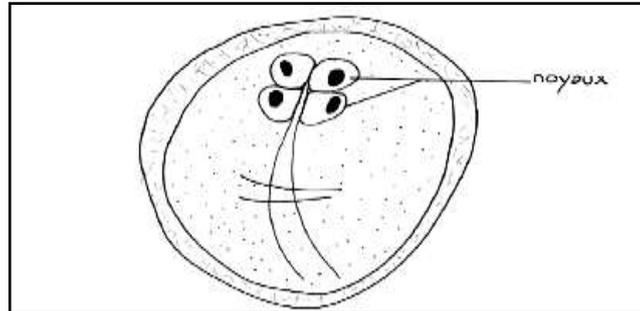


Figure 9. *Giardia*, forme kyste [BARON, 1996].

II.2.4. Cycle du *Giardia*

Giardia intestinalis est un parasite de l'intestin grêle, en particulier du duodénum et les premiers centimètres du jéjunum [MEYER, 1994].

Il se présente sous deux aspects :

Formes végétatives : longues de 10 à 20 μ , larges de 6 à 10 μ , piriformes, en « cerf volant », présentant 2 noyaux et 4 paires de flagelles.

Ce parasite vit en général fixé à la surface de la muqueuse, pouvant entraîner de légères altérations cellulaires, mais s'en détachent fréquemment pour aller se fixer en un autre point.

La reproduction se fait par division binaire asexuée. Elles sont fragiles, très sensibles à la dessiccation et n'apparaissent donc dans les selles qu'en cas de diarrhée [JOKIPII et JOKIPII, 1974].

De temps à autre ces formes végétatives s'immobilisent, s'entourent d'une coque et se transforment en :

Formes kystiques : d'abord à 2 noyaux puis à 4 noyaux : ces kystes à 4 noyaux sont éliminés dans les selles. Ils représentent la forme de dissémination du parasite. Un bref séjour dans le milieu extérieur est sans doute nécessaire à l'achèvement de leur maturation. La période prépatente est en moyenne de 14 jours (**Figure 10**) [JOKIPII et JOKIPII, 1974 ; O'HANDLEY et OLSON, 2006].

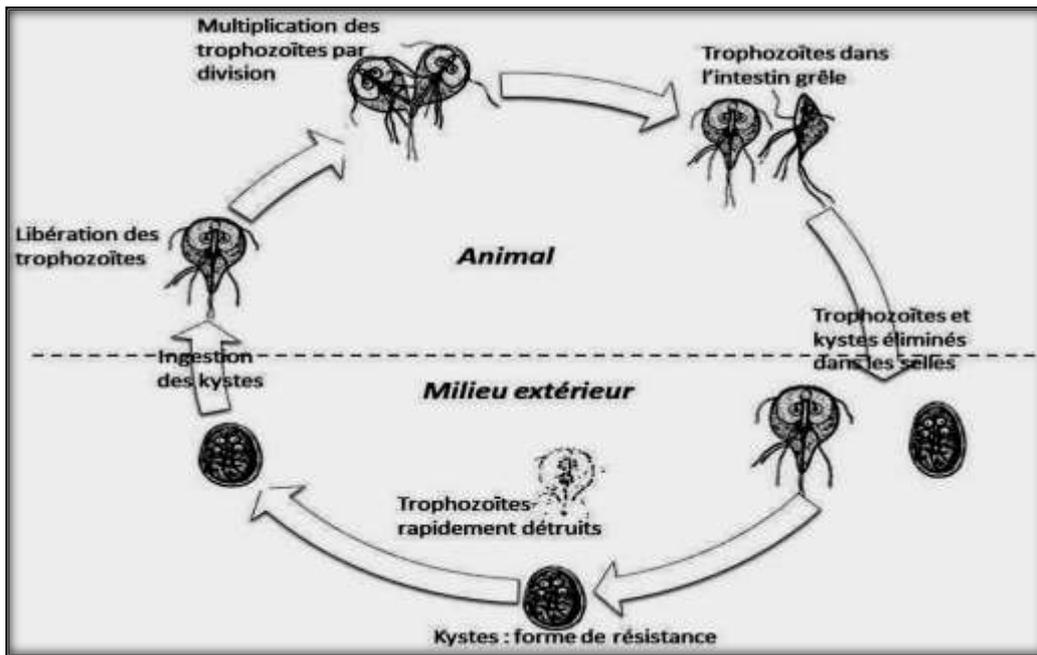


Figure 10. Cycle de *Giardia intestinalis* [GOLDSMITH, 1998].

II.2.5. Pathogénie

La pathogénicité est variable et la sévérité des symptômes est liée d'une part à la virulence des souches et d'autre part à la fragilité de l'hôte [BOUZA *et al.*, 2000]. Certaines souches ont un plus grand pouvoir de colonisation que d'autres et la maladie s'exprime par des retards de croissance chez les jeunes, sans autre manifestation clinique [BURET, 2008]. L'expression clinique de la maladie est plus sévère chez les individus dont le statut physiologique, nutritif ou immunitaire est compromis [THOMPSON *et al.*, 1993 ; BARR *et al.*, 1994].

Il existe des porteurs asymptomatiques qui doivent cependant être traités, car ils sont des agents disséminateurs de l'affection. Après une incubation de 7 à 21 jours s'installe une diarrhée explosive, aqueuse, faite de 10 à 15 selles par jour, nauséabondes, mais le plus souvent sans épreinte ni ténésme [BOURDEAU, 1993]. Elle s'accompagne de douleurs abdominales tardives, survenant 4 à 5 heures après les repas, calmées parfois par des vomissements [WILLIAMSON *et al.*, 2000]. Plus une anorexie, des nausées matinales, une sensation de ballonnement abdominal. Ces signes aigus s'amendent en une période plus ou moins longue, mais des douleurs abdominales d'intensité et de siège variables vont persister, ainsi que des troubles du transit : selles diarrhéiques ou pâteuses abondantes, alternance de diarrhée et de constipation [BARTELT et SARTOR, 2015].

Chez un sujet par ailleurs en bon état général, l'évolution est en général spontanément favorable en moins de trois mois [BARR *et al.*, 1994].

II.2.6. Étiologie

L'entérite à *Giardia lamblia* a été rapportée chez les humains, les chats, les chiens, les bovins, les ovins et d'autres animaux d'élevage. Il se propage par voie fécale-orale, le plus souvent par la contamination de l'eau de baignade et de l'eau de boisson. La giardiase peut se propager en ingérant aussi peu que 10 kystes et donc facilement transmissible avec un contact étroit et dans les endroits où l'assainissement n'est pas optimal [MUHSEN et LEVINE, 2012].

Giardia comprend différents assemblages de types A à G, les types A et B étant présents chez l'homme et les animaux et les types C à G se trouvant exclusivement chez les animaux. Les assemblages A et B peuvent se propager de manière zoonotique [FENG et XIAO, 2012].

Tout comme les autres parasites, les kystes de *Giardia* sont responsables de la transmission de l'entérite à *Giardia*. Ils sont immédiatement contagieux lorsqu'ils sont rejetés dans l'environnement par les matières fécales et peuvent rester contagieux pendant près de 3 mois. Ils se développent et se reproduisent dans des zones froides et humides, en particulier l'eau de rivière. Les trophozoïtes sont responsables de la gastro-entérite et d'autres symptômes de la maladie. Les deux peuvent être excrétés dans les selles, mais seuls les kystes survivent à long terme [FENG et XIAO, 2012 ; MUHSEN et LEVINE, 2012].

Giardia lamblia n'est pas considérée comme un agent pathogène opportuniste, bien que les taux chez les patients VIH-positifs et les patients immunodéprimés soient légèrement plus élevés [FENG et XIAO, 2012].

II.2.7. Diagnostique

L'entérite à *Giardia Lamblia* est diagnostiquée définitivement par l'identification microscopique de l'agent pathogène dans un échantillon de selles. Étant donné que *Giardia* est souvent éliminé par intermittence, l'examen des échantillons de selles prélevés sur une période de plusieurs jours est extrêmement sensible [JOHNSTON *et al.*, 2003]. L'examen traditionnel sur les ovules et les parasites comprend un frottis coloré permanent ; Cependant, l'examen microscopique prenant du temps, des ressources, des échantillons multiples et un œil entraîné, les dosages immunologiques sont devenus le principal outil de diagnostique.

L'immunoessai par fluorescence directe (DFA) détecte les protéines d'organismes intacts et semble présenter une sensibilité et une spécificité maximales (96% à 100% ; 99,8% à 100%), suivi du dosage immunoenzymatique (EIA) qui détecte les antigènes de selles à la sensibilité de 94% à 97% et spécificité de 96% à 100%. Les résultats de ces examens peuvent être obtenus en 1 à 2 heures.

Ces dosages immunologiques rapides sont les plus efficaces, avec des résultats d'environ 10 minutes; Cependant, ils ont une faible sensibilité, en particulier dans les infections avec une faible concentration du parasite *Giardia*, et ne doivent pas remplacer l'iFD ni la microscopie directe [JOHNSTON *et al.*, 2003].

La technique PCR est utilisée pour détecter l'ADN de *Giardia* dans des échantillons de selles est aussi spécifique et sensible que la détection d'antigène et elle est plus sensible que la microscopie. C'est la seule méthode disponible pour classer l'assemblage du parasite [VERWEIJ *et al.*, 2003].

Dans les cas difficiles à diagnostiquer, l'aspiration de liquide duodéal peut également être examiné à la place des échantillons de selles [SHANE *et al.*, 2017].

II.2.8. Prophylaxie

Les étapes pour diminuer la transmission comprennent :

- Hygiène des mains ;
- Contrôle des infections en milieu de soins (précautions universelles) ;
- Pratiques de sécurité des aliments pour éviter la contamination croisée ;
- Éviter la natation, les activités aquatiques et les contacts sexuels au cours de l'évolution de la maladie ;
- Sensibilisation aux facteurs de risque de la maladie tels que la nage en eau douce ou les sources d'eau partagées publiques [SHANE *et al.*, 2017; ZYLBERBERG *et al.*, 2017].

DEUXIEME PARTIE
(EXPERIMENTALE)

Chapitre I.

*Place des protozoaires parmi
les parasites intestinaux chez
les humains*

Introduction

Le tube digestif de l'homme peut être colonisé par diverses espèces parasitaires [ELENI *et al.*, 2014], qui sont classés en deux groupes : les protozoaires (par exemple *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Trichomonas horminis*, *Balatidium coli* , etc...) et les helminthes (par exemple *Ascaris lumobricoides*, *Trichuris trichiura*, *Nesator americanus* ,etc...) [ODO *et al.*, 2016].

Les parasites gastro-intestinaux sont fréquents dans les environnements caractérisés par une température chaude, l'humidité, un mauvais assainissement de l'eau sale et les logements surpeuplés [MICHAEL *et al.*, 2010].

BROOKER *et al.* (2006) a déclaré que la prévalence globale des parasites intestinaux est plus élevée chez les enfants en Afrique subsaharienne.

Les humains peuvent acquérir des infections par *Cryptosporidium* à travers plusieurs voies de transmission, telles que le contact direct avec des personnes infectées (transmission de personne à personne) ou animaux (transmission zoonotique) et l'ingestion des aliments contaminés (transmission d'origine alimentaire) et l'eau (transmission par l'eau) [HUNTER *et al.*, 2007; XIAO, 2010; ADAMU *et al.*, 2014].

Le but de cette étude est d'apprécier la prévalence des parasites intestinaux en milieu rural et urbaine chez les enfants et les adultes, particulièrement ceux vivant à proximité des bovins et ce pour évaluer l'aspect zoonotique des parasites, que ce soit par *Cryptosporidium* et *Giardia*.

I.1. Matériel et méthodes

I.1.1. Site d'étude

Nous avons collecté 303 échantillons fécaux entre octobre et décembre 2014 à partir de huit communes rurales de la Wilaya de BATNA incluant les enfants, les adultes, les éleveurs et les vétérinaires contre 335 échantillons venant des régions urbaines (142 malades consultant ou externe et 193 malades hospitalisés : service de pédiatrie et de réanimation infantile, de gastro-entérologie, service d'infectieux, d'hématologie et de médecine interne du C.H.U de BATNA).

Pour la répartition des patients selon l'âge, nous avons regroupé nos échantillons en fonction des critères établis dans de nombreuses études, nous avons considéré l'intervalle entre les naissances à 15 pour les enfants et les âges supérieurs à 15 ans pour les adultes [ADOU-BRYN *et al.*, 2001; MOSTAFI *et al.*, 2011]. Ces échantillons sont traités au niveau du laboratoire de parasitologie et Mycologie de CHU de BATNA après conservation des échantillons dans le bichromate de potassium à 4 °C.

I.1. 2. Techniques de diagnostiques

I.1. 2. 1. Examen macroscopique des selles

Nous avons analysé les échantillons de selles collectés : la couleur, la consistance (solide, liquide, afécale, pâteuse,...), la présence d'éléments parasitaires : nématodes, oxyures, ascaris adultes ou cestodes, ainsi que la présence de mucus, du sang et des résidus alimentaires etc

I.1.2. 2. Examen microscopique des selles

Cet examen est très important car il permet de dépister les formes végétatives des amibes et des flagellés ainsi que les œufs et les larves des helminthes. Les oocystes de coccidies peuvent également mis en évidence [ANAS, 2008].

I.1.2. 2. 1. Examen direct à l'état frais

Il permet la mise en évidence des éléments parasitaires. Il peut être réalisé sans ou avec coloration. L'examen direct sans coloration est pratiqué rapidement souvent juste après la réception des échantillons.

L'examen direct avec la coloration de lugol ou la coloration merthiolate-iode-formol (MIF) permet une meilleure visualisation des parasites particulièrement les noyaux des protozoaires et la disposition de la chromatine nucléaire [ROUSSET, 1993 ; TRABELSI *et al.*, 2012].

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

I.1.2. 2. 2. Examen après coloration au lugol

L'iode de Lugol est un colorant rapide, avec contraste non spécifique qui est ajouté directement aux montures humides de matériel fécal pour aider à différencier les kystes de parasite. Beaucoup de protozoaires et les kystes apparaissent bruns mais les autres objets de l'échantillon restent clairs [ROUSSET, 1993].

Nous avons dilué l'iode de Lugol 1: 5 avec l'eau distillée stérile (Cette solution devrait être préparée fraîche environ toutes les 3 semaines) puis une crotte fécale (≈ 2 mg) de chaque échantillon fécale sont déposés sur une lame puis une goutte de l'eau physiologique stérile (0,9%) est ajouté si les selles sont solides, ensuite une goutte d'iode de Lugol a été rajoutée puis on dépose la lamelle sur l'échantillon et on examine la préparation de montage humide pour la présence de protozoaires puis l'observation se fait sous microscope optique avec grossissements x 100 et x 400 [AL-SAEED et ISSA, 2010].

I.1.2. 2. 3. Examen après coloration de Ziehl Neelsen modifiée (ZN)

Selon la méthode HENRIKSEN et POHLENZ (1981) modifiée la coloration à ZN modifiée est une méthode efficace, facile et économique pour la détection des oocystes de *Cryptosporidium* [IGNATIUS *et al.*, 1997 ; CONNELLY *et al.*, 2008].

Après une concentration préalable des selles par la méthode de Ritchie, le culôt est étalé sur une lame et séché à l'air libre, puis fixé avec le méthanol pendant 5 mn, suivi d'un séchage. Les frottis fécaux sont prolongés dans la fuschine phéniquée de Ziehl pendant au moins une heure ,après rinçage à l'eau, une décoloration par l'acide sulfurique à 2% pendant 20 secondes puis rinçage avec l'eau ensuite une coloration avec une solution de vert de malachite à 5% pendant 2 à 5 mn comme contre coloration puis nous avons rincé une autre fois avec l'eau et nous avons séché à l'air libre et enfin observé au microscope optique avec un grossissement de 400 (objectif X 40) et confirmation sous grossissement 1000 (objectif X 100).

I. 3. Tests statistiques

Les résultats ont été analysés par le GraphPad Prism 6, utilisant le test χ^2 et ANOVA univarié suivie du test Dunnet /Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification.

Les valeurs de $P \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives.

I.2. Résultats et Discussion

I.2.1. Caractéristiques démographiques de la population étudiée

Tableau 2. La prévalence des parasites intestinaux selon la région.

Personnes de région rurales		Nbre de personnes examinées		Nbr
		Fréquence %		
Enfants	102	40 (39,21 %)	***	$\chi^2 = 32.47$ $P \leq 0,0001$
Adultes (y compris les personnes en contact avec les bovins les vétérinaires et les éleveurs)	204	23 (11,27 %)		
Total	306	63 (20,58 %)		
Personnes de région urbaine		Nbre de personnes examinées		Nbr
		Fréquence %		
Enfants	220	55 (25,00 %)		$\chi^2 = 0.31$ $P > 0,05$
Adultes	115	32 (27,82 %)		
Total	335	87 (25,9 %)		
Total "urbaines et rurales"		641	150 (23,40 %)	

$P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$, *** $P \leq 0,0001$,

Nous avons présenté dans ce tableau la prévalence des parasites intestinaux chez les enfants et les adultes dans les régions rurale et urbaine qui est de **(23,40%)**.

Alors la recherche des parasites intestinaux dans la région rurale a révélé que les enfants sont les plus infectés (39,21 %) par rapport aux adultes (11,27 %) avec une différence significative ($P \leq 0,05$).

Par contre dans la région urbaine il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre la prévalance des adultes infectés par les parasites (27,82 %) et les enfants infectés (25,00%).

Les enfants dans la région rurale sont les plus touchés par les parasites par rapport aux enfants de la région urbaine avec différence significative ($P \leq 0,05$) par contre les adultes de la région urbaine sont les plus infectés par rapports aux adultes de la région rurale avec une différence significative ($P \leq 0,05$) (**Tableau 2**).

Selon nos résultats obtenus dans la région urbaine (23,40%), cette prévalence est supérieure à celle trouvée à Oran (19,96%) et presque similaire à une étude observée à Alger (26,76%) par **BENOUIS et al. (2013)** ce qu'il serait lié probablement aux conditions sanitaires de vie de la population.

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

Une étude faite à Sfax –Tunisie- par **AYADI et al. (1991)** qui ont trouvé une prévalence de (26,6 %).

Selon nos résultats de la région rurale, la prévalence d'infection d'enfants (39,21 %) largement inférieure au taux de parasitisme intestinal retrouvé chez une population infantile en milieu rural Kenitra – Maroc- (68,1%), cette différence est due à l'insalubrité du milieu et le contact avec l'animal [**ELQAJ et al., 2009**].

L'âge a une influence directe sur la prévalence des parasites intestinaux. Nos résultats de la région rurale montrent que plus l'âge diminue plus le risque d'infestation parasitaire est accru pour les enfants (39,21 %) et pour les adultes (11,27 %) **pourtant** dans la région urbaine la prévalence des parasites intestinaux chez les enfants (25,00 %) est presque similaire à celle des adultes (27,82 %).

Le pourcentage des enfants infectés est presque similaire à celui signalé par **BENOUIS et al. (2013)** à Oran où ils ont enregistré sur 1042 sujets externes et hospitalisés âgés entre (la naissance jusqu'aux 80 ans), une prévalence de 28,84% enfants infectés et 71,15% des adultes infectés. **MOSTAFI et al. (2011)** ont mentionné que l'hôpital Moulay Abdellah de Salé en Maroc a révélé une prévalence de 39,17% sur 120 enfants hospitalisés, aussi **AYADI et al. (1991)** ont trouvé 25,09% des enfants qui ont été détectés positifs dans le CHU de Sfax en Tunisie.

Selon nos résultats, les enfants sont infestés car la majorité de ces enfants sont adressés aux écoles maternelles et primaires, où il y avait la promiscuité, la plupart des jeux sont collectifs et la contamination par le contact avec la terre souillée sans se laver les mains [**ELQAJ et al., 2009; BENOUIS et al., 2013**]. Le manque d'installations sanitaires dans ces écoles pourrait également avoir contribué à cette prévalence. La plupart des toilettes présentes dans les écoles, n'étaient pas fonctionnelles ou qu'il n'y a pas suffisamment d'eau dans l'école [**ODO et al., 2016**].

I.2.2. Prévalence des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

Les parasites intestinaux observés dans cette étude sont *E .histolytica/ dispar*, *Endolymax nana*, *Entamoeba coli*, *Ascaris lumbricoides*, *Giardia intestinalis* et *Cryptosporidium spp.* (**Voir annexe 1**).

Tableau 3. Prévalence de différents parasites intestinaux selon la région.

	Parasites						
	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Giardia spp.</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>Endolymax nana</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	
Région rurale	01 (0,33%) ^c	17 (5,61 %) ^b	30 (9,9%) ^a	21 (6,93 %) ^b	19 (6,27 %) ^b	13 (4,29 %) ^b	Nbre Personnes de région rurale 306
Région urbaine	00% ^d	29 (8,65%) ^a	27 (8,05 %) ^a	24 (7,16 %) ^b	21 (6,26%) ^b	18 (5,37 %) ^c	Nbre Personnes de région urbaine 335
Totale	1 (0,15%)	46 (7,17%)*	57 (8,89%)*	45 (7,02%)*	40 (6,24%)*	31 (4,83%)	
X²	1,00	2,20	0,663	0,013	1,05	0,403	
Valeur de P	0,33 (ns)	0,137 (ns)	0,415 (ns)	0,908 (ns)	0,992 (ns)	0,525 (ns)	

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$, *** $P \leq 0,0001$, ns= non significatif, ^a $P \leq 0,05$, ^b $P \leq 0,001$, ^c $P \leq 0,0001$

Sur les 641 patients examinés, nous avons trouvé 57(8,89%), 45(7,02%), 40 (6,24%), 46(7,17%) et 31(4,83%) infestés par *E. histolytica / dispar*, *Endolymax nana*, *Entamoeba coli* et *Giardia intestinalis* respectivement sans différence significative ($P > 0,05$). Cependant, *Ascaris lumbricoides* a enregistré la prévalence la plus basse 31 (4,83%) qui est significativement inférieure par rapport aux autres prévalences ($P \leq 0,05$) (**Tableau 3**).

Encore nous avons constaté que *E. histolytica* était le parasite le plus dominant la région rurale avec une prévalence de (9,9%) suivi par *Endolymax nana*, *Entamoeba coli*, *Ascaris lumbricoides* et *Giardia spp.* avec une différence significative ($P \leq 0,05$). Pour *Cryptosporidium*, nous avons enregistré un seul cas positif dans cette région.

A propos de la région urbaine, *Giardia spp.* et *E. histolytica* ont présenté des grandes prévalences de 8,65 % et 8,05% respectivement suivi par *Endolymax nana* et *Entamoeba coli* avec une différence significative ($P \leq 0,05$) tandis que nous avons constaté l'absence totale de *Cryptosporidium* dans cette région.

Dans notre étude, il ressort que la fréquence d'isolement est plus élevée en faveur des protozoaires que l'*Ascaris* (79,4% vs 20,6% respectivement). Ceci était en désaccord avec l'étude réalisée sur la prévalence de l'infection parasitaire intestinale au C.H.U. de Guadeloupe- France- avec 72,3 % d'helminthes et 27,7% de protozoaires. Ceci se manifesterait par le fait que cette zone géographique et les conditions climatiques sont favorables au développement des espèces d'helminthes et en plus la présence d'auto-infestation [NICOLS *et al.*, 2006].

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

Par contre, nos pourcentages sont presque semblables à ce qui a été rapporté à Sfax (Tunisie) qui ont également rapporté une valeur de 96,5% pour les protozoaires et 3,5% pour les helminthes [BACHTA *et al.*, 1990]. Selon les données bibliographiques, les protozoaires intestinaux prédominent dans la plupart des pays en développement. La transmission des protozoaires intestinales s'effectuent généralement par l'intermédiaire d'aliments crus ou mal lavés comme les fruits, les légumes, ou bien la contamination via l'eau de boisson pollués par les excréta humains [EL KETTANI *et al.*, 2006; BENOUIS *et al.*, 2013].

Dans notre étude, *E. histolytica* et *G. intestinalis* sont les principaux protozoaires identifiés avec une prévalence de 8,89% et 7,02% respectivement. Par contre, certains chercheurs avaient rapporté un taux de prévalence plus élevé d'*E. histolytica* 63,27% à Amalapuram en Inde [PADMAJA *et al.*, 2014].

La faible prévalence d'*Ascaris lumbricoïdes* (4,83%) est peut être expliquée par l'effet de l'hygiène des mains et surtout les légumes qui ne sont pas consommés crus [FAYE *et al.*, 1998].

Ceci était en accord avec l'étude réalisée à Wukro Town Eastern Trigray, Ethopia par ELENI *et al* (2014) qui a rapporté une prévalence de 3,9% d'*A. lumbricoïdes*. Ceci était en contradiction avec l'étude réalisée par ONYENIRAN *et al.* (2014) dans Osogbo Nigeia qui rapportait une plus grande prévalence d'*A.lumbricoïdes* de 68,9%.

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

II.2.2. 1. Prévalence des parasites selon le sexe de la population humaine

Tableau 4. Répartition et prévalence des parasites intestinaux selon le sexe des patients.

Patients			Patientes		
Parasites	Nbre infectés	Fréquence %	Parasites	Nbre infectés	Fréquence %
<i>Cryptosporidium</i> seul	01	(0,39 %)	<i>Cryptosporidium</i> seul	00	(00%)
<i>Giardia intestinalis</i> seul	02	(0,79 %)	<i>Giardia intestinalis</i> seul	4	(1,58 %)
<i>Endolymax nana</i> seul	02	(0,79 %)	<i>Endolymax nana</i> seul	4	(1,58 %)
<i>Entamoeba coli</i> seul	07	(2,76 %)	<i>Entamoeba coli</i> seul	2	(0,79 %)
<i>E .histolytica /dispar</i> seul	08	(3,18%)	<i>E .histolytica /dispar</i> Seul	15	(5,92 %)
<i>Ascaris lumbricoides</i> seul	03	(1,18 %)	<i>Ascaris lumbricoides</i> seul	11	(2,83 %)
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolymax nana</i>	05	(1,97 %)	<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolymax nana</i>	11	(2,83 %)
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Entamoeba coli</i>	06	(2,37 %)	<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Entamoeba coli</i>	18	(4,63 %)
<i>Endolymax nana</i> + <i>Entamoeba coli</i>	03	(1,18 %)	<i>Endolymax nana</i> + <i>Entamoeba coli</i>	04	(1,03 %)
<i>Endolymax nana</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	05	(1,97 %)	<i>Endolymax nana</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	11	(2,83 %)
<i>Ascaris lumbricoides</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	05	(1,97 %)	<i>Ascaris lumbricoides</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	13	(3,35 %)
Totale (Nbre Patients = 253)	47	18,57%	Totale (Nbre Patients = 388)	93	23,26 %^{ns}

s: significative, ns:non significatif.

Sur un effectif totale de 253 patients examinés, 47 (18,57%) sont trouvés infestés par *E .histolytica/dispar*, *Endolymax nana*, *Entamoeba coli*, *Giardia intestinalis*, *Ascaris lumbricoides* et *Cryptosporidium*. Et sur 388 patientes, on a enregistré une prévalence de 93 (23,26 %). Alors selon nos résultats il n'y a pas de différences significatives ($P > 0,05$) entre les deux sexes dans la prévalence des parasites intestinaux (**Tableau 4**).

Nos résultats obtenus sont presque similaire à ceux trouvé par **BENOUIS et al. (2013)** à Oran, il n'a pas trouvé une différence significative ($P > 0,05$) entre l'infection des patients (48,80%) et des patientes (51,20%) par les parasites.

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

D'après plusieurs auteurs le sexe n'influence pas sur la prévalence des parasites intestinaux [OKYAY *et al.*, 2004 ; SURESH *et al.*, 2014 ; ELENI *et al.*, 2014].

En revanche, ODU *et al.* (2013) ont montré une prévalence des patientes 63,0% et les patients 42,0%, donc il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre les parasites entériques des patients et le sexe.

Nos résultats sont en désaccord avec BIU *et al.* (2012) qui ont rapporté que les parasites intestinaux étaient significativement plus élevés chez les mâles que chez les femelles.

Ils ont trouvé à Kénitra (Maroc) que les espèces *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* et *Enterobius vermicularis* sont plus répandues chez le sexe féminin, par contre *Ascaris lumbricoides* et *Giardia intestinalis* sont fréquentes chez le sexe masculin [DIANOU *et al.*, 2004 ; ELQAJ *et al.*, 2009].

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

II.2.2. 2. Prévalence des parasites selon la présence ou absence de la diarrhée

Tableau 5. Répartition et prévalence des parasites intestinaux selon la présence ou absence de la diarrhée.

Diarrhéiques			Non diarrhéiques		
Parasites	Nbre infectés	Fréquence %	Parasites	Nbre infectés	Fréquence %
<i>Cryptosporidium</i> seul	01	(0,29 %)	<i>Cryptosporidium</i> seul	00	(00%)
<i>Giardia intestinalis</i> seul	10	(2,92 %)	<i>Giardia intestinalis</i> seul	00	(00 %)
<i>Endolymax nana</i> seul	1	(0,29 %)	<i>Endolymax nana</i> seul	3	(1 %)
<i>Entamoeba coli</i> seul	13	(3,8 %)	<i>Entamoeba coli</i> seul	00	(00 %)
<i>E .histolytica /dispar</i> seul	35	(10,23 %)	<i>E .histolytica /dispar</i> Seul	00	(00 %)
<i>Ascaris lumbricoides</i> seul	13	(3,8 %)	<i>Ascaris lumbricoides</i> seul	7	(2,34 %)
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolymax nana</i>	14	(4,09%)	<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Endolymax nana</i>	03	(1 %)
<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Entamoeba coli</i>	12	(3,5 %)	<i>Giardia intestinalis</i> + <i>Entamoeba coli</i>	7	(2,34 %)
<i>Endolymax nana</i> + <i>Entamoeba coli</i>	4	(1,16 %)	<i>Endolymax nana</i> + <i>Entamoeba coli</i>	4	(1,33%)
<i>Endolymax nana</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	12	(3,5 %)	<i>Endolymax nana</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	4	(1,33 %)
<i>Ascaris lumbricoides</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	1	(0,29 %)	<i>Ascaris lumbricoides</i> + <i>E .histolytica /dispar</i>	5	(1,67 %)
Totale (Nbre Patients = 342)	116	33,91% ***	Totale (Nbre Patients = 299)	33	11,03 %

*** $P \leq 0,0001$

La prévalence de l'infection chez les patients diarrhéiques est de 33,91% qui est significativement supérieur ($P \leq 0.0001$) que non diarrhéiques 11,03%.

Les protozoaires les plus couramment isolés dans les selles diarrhéiques dans cette étude étaient *Entamoeba histolytica/dispar* 14,03%, cette valeur reste significativement supérieure à celui trouvé par d'autres études de Dar Es Salaam par **MOYO et al. (2011)** suivi par *Giardia intestinalis* (10,52%), *Endolymax nana* (9,06%), *Entamoeba coli* (8,48%) et *Cryptosporidium* (0,29%)

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

Pour les helminthes, *Ascaris lumbricoïdes* présente une prévalence à hauteur de 4,09 % chez les patients diarrhéiques contre 5,68% des patients non diarrhéiques sans différence significative ($P > 0,05$) (**Tableau 5**).

La diarrhée est une cause majeure de mortalité et de morbidité surtout chez les enfants vivants dans des milieux où les conditions défavorables pour la vie [**KOSEK et al., 2003**].

Les protozoaires parasitaires jouent un rôle important dans la diarrhée, en particulier *Giardia intestinalis* qui est fortement associée à la maladie [**NGOSSO et al., 2015**], dans notre étude *Giardia intestinalis* a une prévalence de (10,52%).

Un certain nombre de facteurs de risque de diarrhée y compris l'âge le plus jeune [**BERN et al., 2002**], le manque d'accès à l'eau courante [**CHECKLEY et al., 2004**], le manque d'assainissement adéquat, présence de jeunes enfants dans le ménage, présence de certains animaux dans la maison, [**TEIXEIRA et al., 2007**], des mauvaises pratiques des conditions d'hygiène, état nutritionnel médiocre et une faible éducation des parents [**CHECKLEY et al., 2002**].

Les infections par les protozoaires entériques sont parmi les infections les plus courantes chez l'homme dans le monde et sont une cause importante de morbidité et de mortalité. Les patients symptomatiques présentent généralement une diarrhée et des symptômes abdominaux, y compris des crampes, la douleur, des ballonnements ou de la sensibilité [**ROSSIGNOL et al., 2001**].

Bien qu'un certain nombre de protozoaires différents puissent causer ces symptômes, *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium*, et *Entamoeba histolytica* sont les plus fréquemment rapportés [**NUNDY et al., 2011**; **LANATA et al., 2013**].

De plus, l'infection par *Giardia* contribue considérablement aux 2,5 millions de décès annuels dus à des maladies diarrhéiques [**ADAM, 2001**].

Plusieurs études ont révélé qu'une infection chronique par *Giardia* pendant l'enfance contribue à la malnutrition protéino-énergétique, à une carence en vitamine A, à une anémie ferriprive et à une carence en zinc et à de faibles performances cognitives et éducatives [**BERKMAN et al., 2002** ; **GENDREL et al., 2003** ; **AL-MEKHLAFI et al., 2010** ; **QUIHUI et al., 2010** ; **AL-MEKHLAFI et al., 2013**].

Des facteurs socio-économiques tels que la pauvreté, le manque de systèmes adéquats d'assainissement et de traitement de l'eau, l'analphabétisme et les mauvaises pratiques hygiéniques

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

ont été identifiés comme des facteurs de risque significatifs associés à l'infection par *Giardia* dans différentes communautés [FAUSTINI *et al.*, 2006 ; ANUAR *et al.*, 2006 ; CHOY *et al.*, 2014].

Il est fréquent de trouver des rapports sur les associations entre la diarrhée et les infections à *Endolimax* [PETERS *et al.*, 1987 ; IQBAL *et al.*, 2001 ; GRACZYK *et al.*, 2005]. D'après nos résultats, *Endolimax nana* a une prévalence de 9,06 % chez les patients diarrhéiques.

Cette association peut s'expliquer au moins en partie par le fait qu'*Endolimax* est un indicateur de contamination fécale, qui peut souvent entraîner une co-infection par d'autres organismes capables de causer la diarrhée. Dans quelques études *Endolimax* était associé à une diarrhée chronique [SHAH *et al.*, 2012 ; POULSEN et STENSVOLD, 2016].

Le nématode intestinal *Ascaris lumbricoides* est l'un des causes les plus fréquentes d'infection par les helminthes transmis par le sol (STH) [DE SILVA *et al.*, 1997].

La morbidité la plus élevée se trouve chez les enfants, en particulier chez ceux qui ont une forte charge de vers *A. lumbricoides*, ces derniers peuvent entraîner une diminution de la forme physique, un retard de croissance et des problèmes respiratoires et gastro-intestinaux [DE SILVA *et al.*, 1997 ; SCHÜLE *et al.*, 2014].

L'infection se produit par l'ingestion d'œufs embryonnés, habituellement contenus dans le sol, la nourriture, les légumes et les fruits crus [SCHÜLE *et al.*, 2014]. Les vers adultes habitent la lumière de l'intestin grêle, généralement le jéjunum ou l'iléon.

L'ascaridiase intestinale est habituellement détectée comme découverte fortuite. Cela peut entraîner une vaste gamme de présentations cliniques allant de l'infestation asymptomatique par le ver à l'occlusion intestinale, à la perforation, en particulier à l'iléon, et au saignement [SARMAST *et al.*, 2011 ; GUPTA *et al.*, 2012].

La prévalence la plus élevée de l'ascaridiase se produit dans les pays tropicaux où les climats chauds et humides fournissent des conditions environnementales qui favorisent la transmission de la maladie [MBAYE *et al.*, 2003].

Les parasites coccidiens tels que *Cryptosporidium* sont de plus en plus reconnus comme causes de la diarrhée ; dans notre étude, nous avons trouvés 01 seul cas.

Cependant, cela peut être une sous-estimation, car il est possible que la cryptosporidiose est asymptomatique silencieuse et pourrait être associée à la faible charge parasitaire [KHAN *et al.*,

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

2004 ; NICHOLS *et al.*, 2006] où ces diagnostics exigent des techniques plus spécifiques qui ne sont pas de routine dans de nombreux laboratoires [CHALMERS et GILES, 2010] ou bien une mauvaise performance de procédures de diagnostic traditionnel dans de nombreux laboratoires ce qui entraîne un mauvais diagnostic et un mauvais traitement des issues graves et potentiellement fatales, en particulier chez les jeunes enfants [OMORUYI *et al.*, 2014].

Par exemple, au Sénégal ; la cryptosporidiose est une maladie non négligeable chez les enfants avec une prévalence de 6,13 %. Soit 2 % en milieu rural tandis que la prévalence hospitalière est de 7,4 % utilisant la méthode ELISA.

Ils ont fait une comparaison entre la méthode ELISA et la méthode de ZN modifiée, ils ont constaté que la méthode ELISA avait une sensibilité de 58,82 % et une spécificité qui peut atteindre jusqu'à 96,37 % [FAYE *et al.*, 2013].

Beaucoup d'études ont utilisé la séropositivité par l'évaluation de la présence d'anticorps sériques spécifiques de *Cryptosporidium* spp. (IgG, IgM et IgA) utilisant la méthode ELISA [KHAN *et al.*, 2004; KAUSHIK *et al.*, 2009].

La cryptosporidiose est une infection zoonotique et des études antérieures ont rapporté une association de cette maladie avec la présence d'animaux domestiques dans le ménage [O'DONOGHUE, 1995 ; KHAN *et al.*, 2004]. La transmission oro-fécale peut survenir directement de l'animal à la personne et de personne à personne ou indirectement par nourriture ou eau contaminée [KHAN *et al.*, 2004 ; CHALMERS et GILES, 2010], le contact direct des enfants avec les excréments d'animaux comme les agneaux et les veaux sevrés, le lavage des mains inadéquat ; en outre, l'utilisation des gels et des désinfectants pour les mains à base d'alcool qui sont inefficaces contre *Cryptosporidium* spp. [CHALMERS et GILES, 2010]. La cryptosporidiose est l'une des principales maladies infectieuses émergentes qui sont directement transmises par la voie oro-fécale et provoquent différents types de pathologies chez les mammifères, les oiseaux et les poissons.

L'infection avec ce parasite est plus souvent asymptomatique ou auto-limitante chez les hôtes immunocompétents, mais peuvent être sévères et chroniques chez individus immunodéprimés, tels que les patients ayant acquis un syndrome d'immunodéficience ou sévèrement chez les enfants mal nourris [MC DONALD, 1996; KHAN *et al.*, 2004; SOW *et al.*, 2016]]. Dans les pays en développement, l'infection à *Cryptosporidium* spp. a été signalé plus fréquent chez les enfants souffrant de malnutrition que chez les enfants bien nourris [KHAN *et al.*, 2004; FAYE *et al.*, 2013].

Chapitre I. Place des protozoaires parmi les parasites intestinaux chez les humains

Actuellement, la diarrhée est une cause majeure de la morbidité chez les patients VIH / SIDA et près de 40% qui meurent du SIDA souffrent de diarrhée [MWACHARI *et al.*, 1998; WANYIRI *et al.*, 2014]. *Cryptosporidium* est le parasite le plus commun identifié chez les patients atteints du VIH / SIDA diarrhée [MIRZA *et al.*, 1994; MWACHARI *et al.*, 1998; WANYIRI *et al.*, 2014].

Conclusion

- Dans le but d'évaluer la prévalence des parasitoses intestinales dans la Wilaya de BATNA, un examen parasitologique des selles est effectué sur a 641 sujets humains provenant des régions rurales et urbaines de la Wilaya de BATNA.
- Parmi les 641 sujets examinés, 150 (23,40%) ont été trouvés infectés, 63 (20,58 %) dans les régions rurales et 87 (25,9 %) dans les régions urbaines.
- Dans les régions rurales la prévalence du parasitisme a une grande prévalence chez les enfants 39,21 % mais les adultes ont une prévalence de 10,94 % mais pour la région urbaine la prévalence de parasitisme chez les enfants est 25,00 % et chez les adultes est 27,82 %.
- Les parasites intestinaux rencontrés sont en ordre croissante : *Cryptosporidium* (0,15%), *Ascaris lumbricoïdes* (4,83%), *Entamoeba coli* (6,24%), *Giardia intestinalis* (7,17%), *Endolymax nana* (7,02%) et *E. histolytica* (8,89%), donc *Cryptosporidium* et *Giardia intestinalis*.
- La présence de *Cryptosporidium* et *Giardia intestinalis* chez les humains nous conduit à la recherche de ces protozoaires chez les bovins car sont les animaux domestiques les plus répandue dans la région d'étude.
- D'après nos résultats, le sexe n'a aucune influence sur la prévalence de l'infection par les parasites intestinaux.
- La prévalence des patientes diarrhéiques (33,91%) est significativement supérieure ($P \leq 0,05$) à celle des non diarrhéiques 11,03%.
- Au vu de ces résultats, il apparaît nécessaire de mener des règles rigoureuses pour réduire la prévalence de parasitisme par les parasites intestinaux telles que sensibilisation des populations par l'éducation sanitaire, l'installation des réseaux d'assainissements et de l'eau potable.

Chapitre II.

*Sources animées de
Cryptosporidium et de
Giardia pour les humains via
les bovins*

II.1.

ETUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE

CLASSIQUE

(*CRYPTOSPORIDIUM* ET

***GIARDIA*)**

Introduction

Cryptosporidium spp. est un protozoaire parasitant les voies digestives et/ou respiratoires de nombreuses espèces animales, chez les oiseaux, les reptiles, les poissons et les mammifères y compris l'homme [FAYER et UNGAR, 1986].

Deux espèces majeures sont rencontrées chez les bovins, *C. parvum* à localisation surtout intestinale [PUTIGNANI et MENICHELLA, 2010] qui est l'espèce la plus fréquemment isolée chez les bovins et la plus pathogène. La seconde espèce, *C. muris* à développement gastrique est rarement pathogène et sa présence est renseignée de manière irrégulière dans la littérature [PEARSON et LOGAN, 1983; POHJOLA et LINDBERG, 1986; OSMAN *et al.*, 2016].

Le rôle pathogène de *C. parvum* en tant agent majeur dans l'étiologie des diarrhées néonatales fut longtemps ignoré [AJJAMPUR *et al.*, 2008 ; BOUZID *et al.*, 2013] et ce n'est qu'à la suite des travaux menés aussi bien sur le terrain par MEUTEN *et al.* (1974); TZIPORI *et al.* (1983); DĀRĀBUS *et al.* (2001) que son rôle fut démontré dans l'étiologie du syndrome diarrhéique néonatal chez le veau ceci même en l'absence d'autres germes entéropathogènes (*E. coli*, rotavirus, coronavirus, et salmonelles).

Compte tenu du fait que peu d'enquête épidémiologique n'ont été entreprise sur la cryptosporidiose chez diverses espèces animales dans la région est de l'Algérie et encore moins sur les ruminants, à l'exception de l'étude de ABBAS *et al.* (2015) qui avait ciblé un petit effectif 12 fermes dans trois Wilaya de l'Est d'Algérie y compris Bejaia, Sétif et Souk Ahras et qui a mis en évidence les oocystes de *Cryptosporidium* dans les selles des veaux par la technique de Ziehl- Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz, ainsi que OUCHENE *et al.*, 2012, 2014; HOCINE *et al.*, 2016 et LAATAMNA *et al.* (2018). De ce fait, la présente étude tend à situer la prévalence de *Cryptosporidium* dans la Wilaya de Batna en fonction de certains facteurs de risque tels que l'âge, le sexe et la présence ou l'absence de la diarrhée.

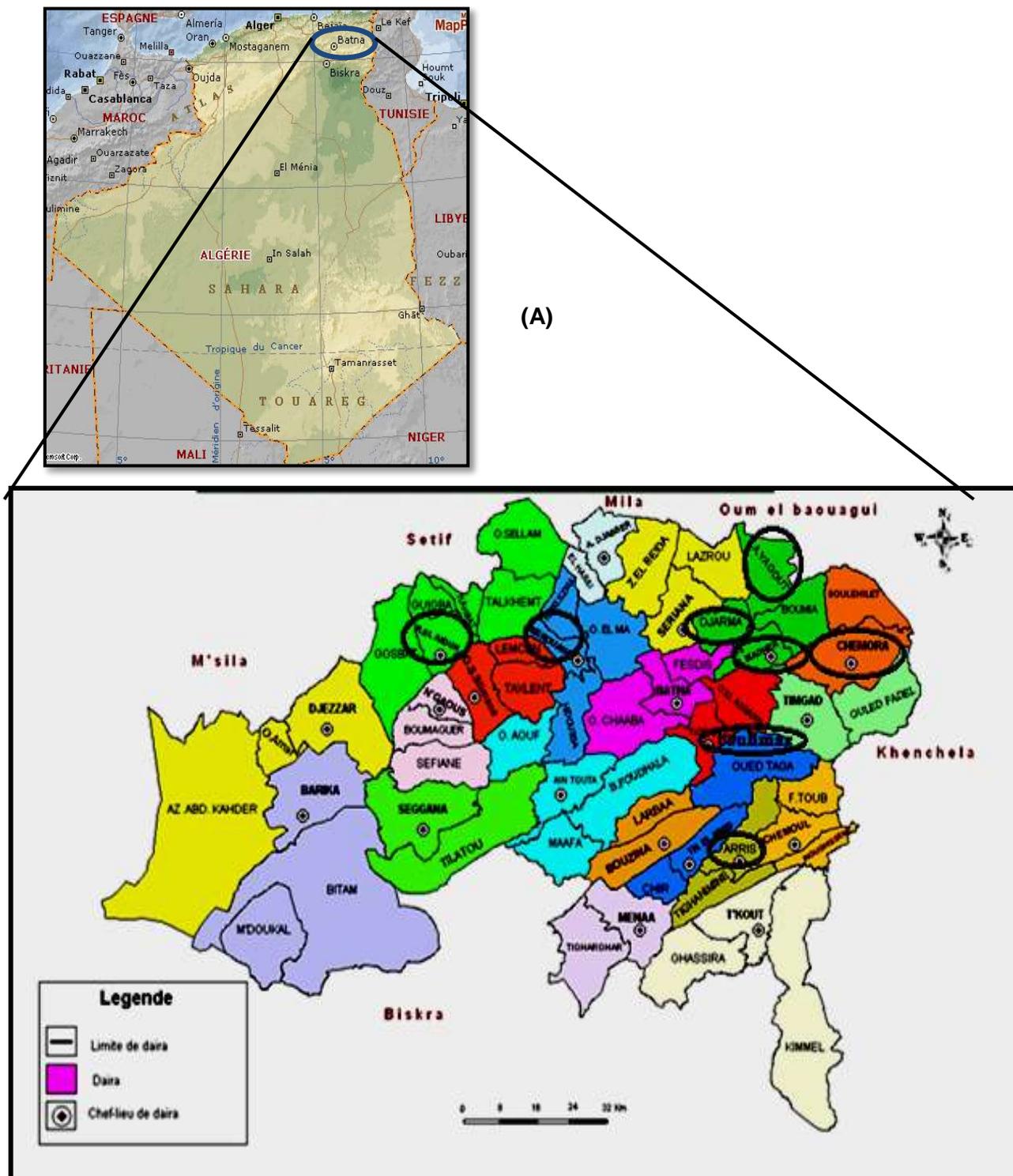
II.1.1. Matériel et Méthodes

II.1.1.1. Présentation de la zone d'étude

La Wilaya de Batna est située au nord est de l'Algérie. Sa superficie est d'environ 12 192 km² pour une population totale environ de 1 119 791 habitants. Le climat de la Wilaya est de type semi-aride frais, une pluviométrie moyenne enregistrée varie entre 350 et 375 mm/ an. L'hiver est froid avec des températures allant de 0 °C à 5 °C, l'été est très chaud avec des températures pouvant aller jusqu'à 45 °C à l'ombre. L'humidité relative moyenne varie entre 56 et 60 %, le minimum étant situé entre 30 et 36 % et un maximum entre 77 et 81 %. Cette semi-aridité du climat de la région, marque durement la végétation et les écoulements [<http://wilaya-batna.gov.dz/>].

La région a été ciblée en raison de son développement intensif de l'élevage bovin laitier, qui est estimé à 50 578 têtes dont 25 289 vaches laitières (**DSA Batna, 2016**), qui à l'échelle nationale est en passe de devenir une des premières Wilayas en matière de production laitière.

Notre étude s'est déroulée entre le mois d'Avril 2014 au Novembre 2016 dans 40 élevages bovins repartis sur six communes (Merouana, El Madher, Djerma, Arris, Ras El Aioun, Chemora, Aïn Yagout, Bouhmar) (**Figure 11**). Ces élevages sont en majorité de taille moyenne et renferme que les bovins. La figure 01 montre la situation exacte de chaque zone d'étude dans la Wilaya de Batna.



(A) : Situation géographique de la Wilaya de BATNA dans l'Algérie.
 (B) : Situation géographique de chaque région de collection dans la Wilaya de BATNA.

Figure 11. Situation géographique de la zone d'échantillonnage. http://www.d-maps.com/carte.php?num_car=176844&lang=en.

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

II.1.1.2. Récolte des échantillons de fèces

Notre étude a ciblé sur un effectif total de 620 échantillons fécaux. Ces échantillons de selles sont collectés entre Mars 2015 à Mars 2016 de 40 fermes bovines (**Tableau 6**). Les selles sont récoltées dès leur émission dans des pots en plastiques stériles (5 g au minimum), puis sont remis dans une glacière isotherme (4 °C) et acheminés le jour même au niveau du laboratoire de parasitologie. Tous ces échantillons sont traités au niveau du laboratoire de parasitologie et Mycologie de CHU de BATNA, en vue de rechercher les oocystes de *Cryptosporidium* spp.

Chaque prélèvement de selle est accompagné d'une fiche commémorative renfermant certaines informations des animaux comme (station, date de prélèvement, l'âge, le sexe, type de ferme et la présence ou l'absence de la diarrhée).

Tableau 6. Répartition du nombre de fermes ciblées dans chaque département.

Station	Nombre de ferme
Merouana	4
El Madher	4
Djerma	8
Arris	3
Ras El Aioun	6
Chemora	4
Aïn Yagout	5
Bouhmar	6
Total	40

Pour un bon examen coproparasitaire, les selles doivent être collectées via le rectum des animaux et non pas du sol de la litière, séparément du sol et l'eau.

II.1.1.3. Conservation des fèces

Il est important d'analyser les fèces fraîches pour l'observation des parasites. Si les échantillons sont récoltés après un délai supérieur à 6 h, elles peuvent également être conservées de différentes façons lorsqu'il est impossible de les faire parvenir très rapidement. De ce fait, ils

peuvent être conservés plusieurs mois au réfrigérateur à une température de 4 °C (après addition préalable d'une solution de conservation (formaldéhyde 5% ou bien bichromate de potassium).

Pour la recherche d'oocystes de *Cryptosporidium*, les prélèvements sont conservés dans le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) à 2,5% à température ambiante (< 2 semaines) ou à température de 4 °C.

II. 1.1.4. Méthodes d'analyses microscopiques

➤ Mise en évidence des parasites dans les matières fécales

Après récupération et identification des échantillons de selles, nous avons suivi une démarche systématique et qui consiste en la réalisation des démarches suivantes :

II. 1.1.4.1. Examen macroscopique des fèces

Après la récolte de fèces, l'aspect des selles est relevé (liquides, pâteuses, moulées, présence de mucus, de sang ...etc). Cet examen consiste à apprécier la couleur, la consistance [MONGI, 1993].

I. 1.1.4.2. Technique de RITCHIE modifiée

Cette technique permet d'augmenter la sensibilité de la recherche des éléments parasitaires dans les selles (kystes, oocystes et œufs). Après la collection et la numérotation des échantillons, nous avons transférés les échantillons dans une glacière puis nous avons les conservés à 4 °C. Nous avons suivi la méthode de Ritchie pour la concentration des parasites COELHO *et al.* (2009) (voir annexe 02).

II. 1.1.4.3. Technique de coloration de ZN modifiée

Cette technique de coloration permet d'observer les oocystes de *Cryptosporidium* qui sont colorés en rose sur un fond verdâtre [GARCIA et SHIMIZU, 1997].

La coloration à ZN modifiée est détaillée dans le chapitre I.

L'examen est dit positif lorsqu'un oocyste est visualisé dans 150 champs microscopiques. Inversement, il est dit négatif lorsqu'aucun oocyste n'est observé après observation de 150 champs microscopiques pris au hasard sous grossissement 40 x [AKAM *et al.*, 2004].

L'estimation de l'intensité de l'infestation parasitaire en fonction des tranches d'âge des bovins est évaluée selon 3 scores d'infestation : infestation faible (+1): 1 à 4 oocyste(s)/champ, infestation

moyenne (+2): 5 à 10 oocystes/champ, infestation massive (+3): nombre d'oocystes > 10 par champ [AKAM *et al.*, 2002].

II.1.1.4.4. Identification de *Cryptosporidium* et de *Giardia* par l'immunofluorescence directe (IFD)

A. Principe du test

C'est une technique utilisant des anticorps monoclonaux marqués par fluorescence et dirigés contre des antigènes spécifiques pariétaux des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* sont ensuite appliqués sur la lame en vue d'être incubés. On utilise ensuite un microscope à fluorescence pour la lecture afin de trouver les corps fluorescents susceptibles d'être des kystes ou des oocystes [BEN YOUNES *et al.*, 1997].

B. Exécution de l'immunofluorescence

Nous avons testé avec cette technique 30 échantillons qui sont hautement positif avec la coloration de Ziehl Neelsen.

Dans la technique IFD, nous avons utilisé le MERIFLUOR® pour *Giardia* et *Cryptosporidium* (Meridian Life Science, Inc., Memphis, TN, USA), nous avons pris 50 µl des selles concentrées, chaque lame contient trois puits, pour la première lame un puit pour l'échantillon et les deux autres pour le contrôle positif et négatif respectivement. Après l'étalement de l'échantillon sur le puit, selon les instructions du fabricant, nous avons laissé sécher à 42 °C, puis une goutte de la solution des anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium* et anti-*Giardia* contenant une protéine stabilisante et 0,1% de sodium azide a été ajouté puis une goutte de colorant fluorescent a été rajoutée qui est la solution de Eriochrome Black après ces lames ont été incubés dans une chambre humide et après 45 mn les puits sont lavés avec une solution de lavage 20 X.

Après lavage, une solution de montage qui est le glycérol buffer contenant le formaldéhyde et le sodium azide à 0,05 % est appliquée sur tous les puits puis le DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole) est ajouté dans chaque puit pour vérifier la viabilité des kystes et les oocystes.

Enfin une observation sur microscope à fluorescence (EVOS FL) équipé d'un système de filtre pour fluorescéine isothiocyanate (FITC) avec quelques caractéristiques : Excitation 490-500 nm, barrière filtre : 510-530 nm, (grossissement ×400). Le contrôle positif formaliné est une préparation des selles contenant les oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia* contenant 0,09% de

thimerosale et le contrôle négatif sont des selles formalinisé contenant 0,09% de thimerosale, ces contrôles ont subi à la même procédure (**voir annexe 3**).

Cependant, et bien que cette méthode soit très sensible, l'identification finale des kystes et des oocystes nécessite souvent une coloration additionnelle et un examen microscopique subséquent, étant donné que certaines algues naturellement fluorescentes ressemblent beaucoup aux kystes et aux oocystes de par leur taille et leurs caractéristiques de coloration. L'identification de *Cryptosporidium* et *Giardia* est basée sur la forme, la taille du parasite ainsi que sur l'intensité de l'immunofluorescence [GARCIA *et al.*, 1992].

I. 1.1.5. Tests statistiques

Les résultats ont été analysés par le GraphPad Prism 6, utilisant le test χ^2 et ANOVA univarié suivie du test Dunnett /Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification, les valeurs de $P \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives.

II.1.2. Résultats et Discussion

II. 1.2.1. Oocyste de *Cryptosporidium* spp. observé sur un frottis, coloré par la technique de Ziehl-Neelson modifiée

Dans la coloration ZN, les oocystes apparaissent comme des corps rosés denses sur un fond vert pâle sphériques de 5 à 6 μm de diamètre (**Figure 12 a et 12b**).

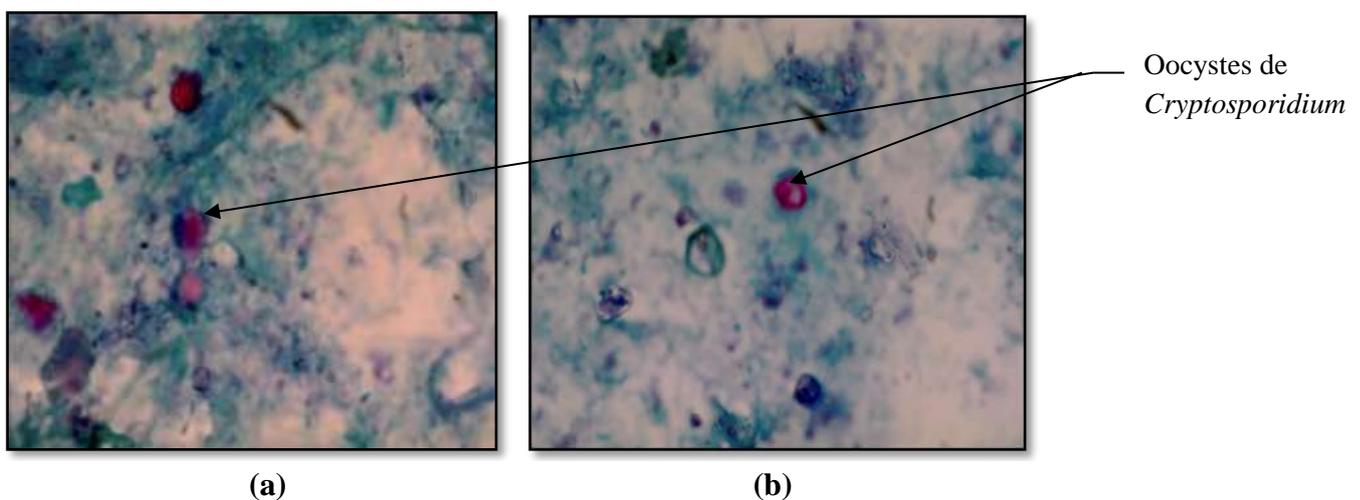


Figure 12. Oocystes de *Cryptosporidium* spp. observées par la technique de Ziehl- Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (Gx 100).

II.1 .2.2. Répartition de la fréquence d'isollements des *Cryptosporidium* chez les veaux**Tableau 7.** Répartition de *Cryptosporidium* spp. dans les fermes bovines des différents fermes de la Wilaya de Batna.

N°	Régions	Nbre de veaux examinés	Résultats	
			Nbre	%
1	Merouana	72	56	(77,7)
2	El Madher	64	15	(23,4)
3	Djerma	135	66	(48,8)
4	Arris	38	7	(18,4)
5	Ras El Aioun	105	82	(78,0)
6	Chemora	56	14	(25,0)
7	Aïn Yagout	72	25	(34,7)
8	Bouhmar	78	38	(48,7)
Total		620	302	(48,7)

Sur un effectif total de 620 veaux répartis dans l'ensemble des 40 fermes, *Cryptosporidium* spp. est apparue plus largement répandue dans toutes les fermes ciblées. Sachant que le taux de prévalence chez les veaux varie de 18,4 % et 77,7 % (**Tableau 7**).

La variation de la fréquence d'isolement peut être liée à d'autres facteurs dont certains sont liés aux animaux étudiés (âge, et le statut clinique) et d'autres sont liés particulièrement à l'échantillonnage et aux conditions d'hygiène qui jouent un rôle très important [**STIBBS et ONGERTH, 1986**]. La cryptosporidiose semble présente dans toutes les régions quel que soit le type d'élevage (laitier ou allaitant) [**AKAM et al., 2004**].

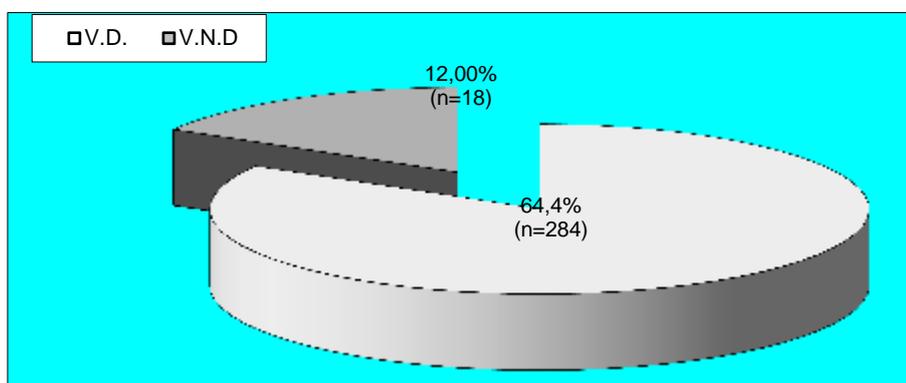
II.1 .2.3. Distribution des résultats des analyses selon la présence ou absence de la diarrhée

Tableau 8. Fréquence d'isolement de *Cryptosporidium* selon la présence ou absence de la diarrhée chez les veaux.

N°	Unités d'élevage	V.D.			V.N.D.			
		Nombre examener	V.D.		Nombre examener	Nbre de cas (+)	%	
			Nbre de cas (+)	%				
1	Merouana	48			12	2 (16,6)		
2	El Madher	51	36	(75)	11	-		
3	Djerma	122	29	(56,8)	35	6 (17,1)		
4	Arris	22	78	(63,9)	6	-		
5	Ras El Aioun	66	11	(50)	23	7 (30,4)		
6	Chemora	57	38	(57,5)	28	3 (10,7)		
7	Aïn Yagout	43	24	(42,1)	17	-		
8	Bouhmar	61	29	(67,4)	18	-		
Effectif total		470	284***	(60,42)	39	(63,9)	18	(12,00)

Légende: V. D.: Veaux diarrhéiques; V. N. D.: Veaux non diarrhéiques; **Nbre:** Nombre de cas positif ;

N°: numéro d'ordre ;*: significative ; $\chi^2=106.7$, $P\leq 0.0001$



Légende: V. D. Veaux diarrhéiques; V. N. D: Veaux non diarrhéiques;

(n=): nombre de veaux examinés.

Figure 13. Répartition de *Cryptosporidium* selon la présence ou absence de la diarrhée.

A l'issue de cette étude, et comme le montre le **tableau 8** et la **figure 13**, la présence du parasite est fortement relevée chez les veaux diarrhéiques que non diarrhéiques, 60,4% contre 12,0 % (soit, 284/470 vs 18/150), avec une différence significative entre les deux ($P \leq 0.0001$). Ces résultats sont proches de ceux rapportés par **OUCHENE *et al.* (2012)** à Sétif avec une prévalence de 65,3% pour les veaux diarrhéiques et 17,8% pour les veaux non diarrhéiques.

Sachant que la prévalence du parasite dans les fermes varie de 75% à 42,1% chez les premiers et de 30,4% à 16,6% chez les seconds.

En ce qui concerne la distribution de l'incidence du parasite selon le statut clinique (présence ou absence de la diarrhée) des sujets examinés, nos résultats sont comparables à ceux obtenus dans plusieurs pays par d'autres chercheurs: le parasite se retrouve à la fois chez les veaux cliniquement sains (non diarrhéique) et chez les malades [**AKAM *et al.*, 2002; AKAM *et al.*, 2004; AKAM *et al.*, 2007**].

Chez les jeunes bovins, l'excrétion massive du parasite est fréquemment accompagnée de signes cliniques [**RAMADAN *et al.*, 2015**]. Selon **JUNGMANN et HEIPE (1983)**, la présence de 20 oocystes sous un grossissement de 60x est plus souvent associée à la diarrhée. Pour notre part, le nombre moyen d'oocystes à partir duquel on observe souvent la diarrhée se situe autour de 15 oocystes/champ, sous un grossissement de 40x.

II.1 .2.4. Distribution des résultats des analyses par tranche d'âge des bovins

Tableau 9. Distribution de l'infestation de *Cryptosporidium* spp. Selon les tranches d'âge des bovins.

N°	Tranches d'âge	Nombre d'examen	Résultats : (Infestation) Nbre %	Intensité d'infestation					
				+1		+2		+3	
				Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
1	1-3 J	12	1 (0,3)	1	(0,4)	-		-	
2	4-7 J	21	8 (2,6)	3	(1,3)	1	(2,5)	4	(11,7)
3	8-14 J	27	17 (5,6)	9	(3,9)	2	(5,1)	6	(17,6)
4	15-21 J	84	76 (25,1)	46	(20,0)	18	(46,1)	12	(35,2)
5	22-30 J	72	65 (21,5)	50	(21,8)	10	(25,6)	5	(14,7)
6	1-2M	98	48 (15,8)	38	(16,5)	5	(12,8)	5	(14,7)
7	3-5 M	67	31 (10,2)	28	(12,2)	1	(2,5)	2	(5,8)
8	6-8 M	98	29 (9,6)	29	(12,6)	-		-	
9	9-12 M	45	14 (4,6)	12	(5,2)	2	(5,1)	-	
10	1-2 A	96	13 (4,3)	13	(5,6)	-		-	
Total		620	302 (48,7)	229 (75,82)*		39 (12,91)		34 (11,25)	

Légende: N°: Numéro d'ordre; (%): Pourcentage; J: jours; M: Mois; A: année; * : Significative (P≤0.05)

Nbre: nombre de cas positif; +1: 1 à 4 oocyste(s)/champ; +2: 5 à 10 oocystes/champ; (+3) >10 oocystes/champ.

La distribution du parasite selon les tranches d'âge des bovins est visualisée dans le **tableau 9** et la **figure 14**. En effet, *Cryptosporidium* est isolé dans toutes les tranches d'âge des bovins, avec cependant, une nette dominance chez les veaux de 4-30 jours. Ainsi, si nous examinons la répartition des fréquences d'isolement du parasite chez les individus âgés de moins d'un mois, nous remarquons que c'est surtout les 15-21 jours qui paraissent les plus significativement infestés par les cryptosporidies (25,1%), suivi de près par les 22-30 jours (21,5%). Cependant, nous notons une nette diminution du taux de parasitisme chez les 1-2 mois (15,8%) et les 2-3 mois (10,2%). Inversement, un faible taux de positivité est relevé chez les 1-3 jours (0,3%).

La cryptosporidiose est une maladie qui provoque des diarrhées néonatales bovine [CHARTIER et PARAUD, 2010] parce que le système immunitaire des bovins pendant les premiers jours de la vie est encore immature ce qui augmente la sensibilité à la cryptosporidiose [GÜNTHER, 1983 ; DĂRĂBUS *et al.*, 2001; AKAM *et al.*, 2004]. Ainsi que l'installation de

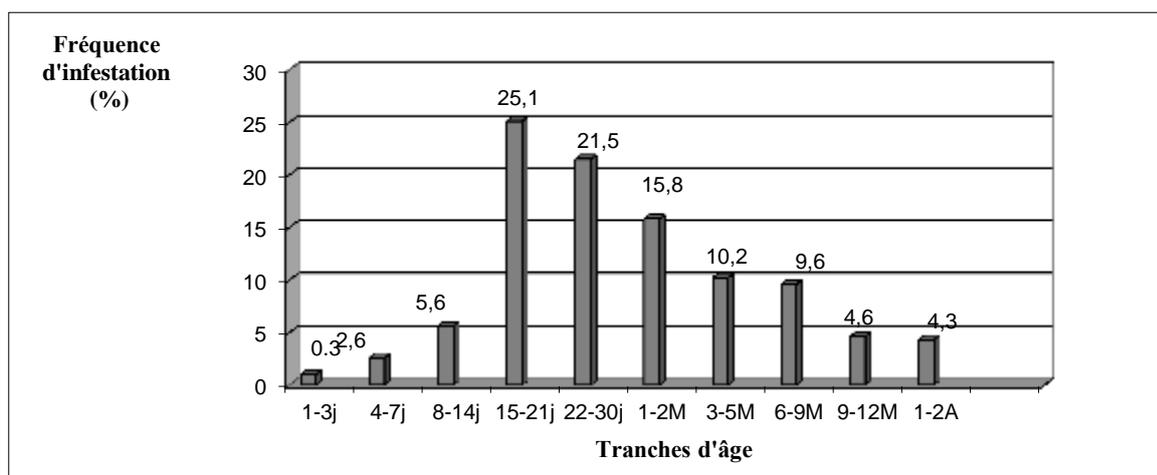
l'immunité nécessite 2 à 3 semaines après la naissance pour que leur statut immunitaire devient suffisant pour résister à une certaine charge de ce parasite [KHELEF *et al.*, 2007].

Concernant la distribution de l'intensité de l'infestation du parasite en fonction des tranches d'âge des bovins montre que les animaux âgés de 1 à 7 jours et ceux de 2 mois et plus, expriment souvent une faible infestation (+1). Par contre, pour les 15 jours à 2 mois l'infestation par *Cryptosporidium* est souvent soit moyennement (+2) et fortement exprimée (+3) (Tableau 9).

La fréquence et l'intensité d'apparition du parasite diminuent avec l'âge des sujets examinés, notamment à partir de l'âge de 2 mois. Cette diminution du taux de parasitisme est liée à la résistance des animaux aux cryptosporidies [GÜNTHER, 1983; DĀRĀBUS *et al.*, 2001; AKAM *et al.*, 2007].

La résistance des veaux a plus d'un mois pu être due à l'exposition précoce des veaux à l'infestation et surtout aux contacts renouvelés avec le parasite qui induit le développement d'une immunité acquise [HARP *et al.*, 1990]. La sensibilité des adultes au parasite est peut-être liée au stress du *peri-partum* qui affecte certaines vaches, à un milieu fortement souillé par les cryptosporidies [AKAM *et al.*, 2007].

Par ailleurs, nous remarquons que la fréquence d'isolement du parasite chute brutalement au delà de deux mois. En effet, chez les veaux de 1-2 mois, le taux de positivité est de 15,8%, puis par la suite, celui-ci décroît progressivement chez les 3-5 mois (10,2%) et les 6-8 mois (9,6%) pour devenir très faible chez les 9-12 mois (4,6%).



Légende: j: jours; M: mois; A: Année

Figure 14. Distribution de l'infestation de *Cryptosporidium* spp. selon les tranches d'âge des bovins.

Chez les bovins adultes, la présence du parasite est apparue moins importante en comparaison avec celle les jeunes, avec seulement 13 cas positifs chez les sujets âgés de 1-2 ans. Il est indiqué que ces infestations chez les adultes étaient accompagnées d'une élimination oocystale tant faible sur le plan de la durée que de la concentration (+).

Il a également été convenu par **AKAM *et al.* (2004)**, **XIAO *et al.* (2004)** et **NGUYEN *et al.* (2007)** que *Cryptosporidium* est observé chez tous les groupes d'âge avec une prédominance chez les veaux de moins de 6 mois.

II.1 .2.5. Distribution des résultats des analyses selon le sexe des bovins

Tableau 10. Influence du sexe sur l'infestation de *Cryptosporidium* spp. chez les bovins dans l'ensemble des fermes.

N°	Unités d'élevage	Veaux		Velles	
		Nombre d'échantillon	Nbre de cas (+) %	Nombre d'échantillon	Nbre de cas (+) %
1	Merouana	21	9 (42,85)*	39	29 (74,35)
2	El Madher	12	6 (50,0)	50	23 (46,0)
3	Djerma	46	28 (60,8)	111	56 (50,4)
4	Arris	7	5 (71,42)*	21	6 (28,5)
5	Ras El Aioun	19	11 (57,8)	70	34 (48,5)
6	Chemora	15	5 (33,3)	70	22 (31,4)
7	Aïn Yagout	16	7 (43,7)	44	22 (50,0)
8	Bouhmar	21	13 (61,9)	58	26 (44,82)
Total		157	84 (53,5)	463	218 (45,13)

Légende: Nbre: nombre de cas positif Pas de différence significative (P>0.05)

Dans l'ensemble des élevages, aucune différence significative de répartition de *Cryptosporidium* n'est relevée entre les veaux et les velles et où nous avons enregistré des taux respectifs de 53,50% et 45,13%. Sachant que le taux d'incidence du parasite dans les fermes chez les premiers varient de 71,4 % à 33,3 % et chez les secondes de 74,3 % à 28,5 % (**Tableau 10** et **Figure 15**).

Concernant la distribution du parasite selon le sexe au sein de chaque ferme, celle-ci est apparue uniforme aussi bien dans les fermes 1, 2, 3, 5, 6,7 et 8, à l'exception d'élevage numéro 4 où la prévalence s'est montrée plus penchante en faveur des mâles que des femelles (71,42 % contre 28,5%).

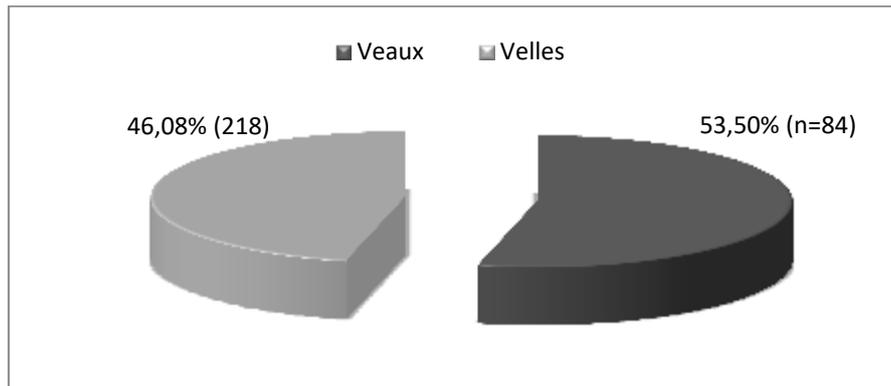


Figure 15. Répartition de l'infestation de *Cryptosporidium* selon le sexe des bovins.

Concernant, la fréquence de l'infection de *Cryptosporidium* spp. en fonction du sexe, peu de chercheurs sont intéressés à étudier ce paramètre. Selon **DĀRĀBUS et al., (2001)** et **AKAM et al. (2002, 2004, 2007)**, le sexe ne semble avoir aucune influence sur le parasitisme des veaux, ce qui en accord avec nos résultats.

Selon **GOW et WALDNER (2006)**, les veaux sont plus fragiles que les velles et ce, particulièrement quand les conditions de vêlage sont difficiles, ce qui n'a pas été le cas dans la présente étude où nous avons enregistré une légère sensibilité en faveur des dernières.

II.1 .2.6. Influence de l'hygiène des fermes sur l'infestation de *Cryptosporidium* spp. chez les veaux

L'influence de l'hygiène des fermes bovines sur les incidences des infestations de *Cryptosporidium* est visualisée dans **le tableau 11** et **annexe 04**.

Tableau 11. Influence de l'hygiène des grandes fermes sur les incidences de *Cryptosporidium* spp. chez les jeunes veaux.

N°	Conditions Sanitaires	Nbre de fermes Visitées	Nbre de veaux examinés	Résultats	
				Nbre	%
1	Mauvaise	10	150	107	(71.33)
2	Moyenne	16	284	156	(54.93)
3	Bonne	14	186	39	(20.96)
Total		40	620	302	(48.7)

Légende: Nbre: nombre

S : 1 vs 2 et 3 ($P \leq 0.05$), $\chi^2 = 92.43$

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que l'impact de la cryptosporidiose bovine est apparu élevée très significativement dans les fermes présentant des conditions sanitaires défavorables (mauvaises).

Un même constat est également signalé dans les travaux de **MORIN *et al.* (1976)**, **SANFORD et JOSEPHSON (1982)**.

En effet, l'ensemble de ces auteurs s'accordent à dire que lorsque les conditions sanitaires d'une ferme sont défavorables, la circulation des cryptosporidies entre les animaux est très importante permettant ainsi l'augmentation du risque d'infection et inversement, elle est réduite lorsque l'hygiène des fermes est moyennement ou bien très bien entretenu (bonnes).

II.1 .2.7. Influence du système d'élevage sur les incidences de *Cryptosporidium* spp. chez les veaux

L'étude de l'influence du mode d'entretien (ou système d'élevage) sur les incidences des cryptosporidies chez les veaux est représentée dans **le tableau 12** et **la figure 16 a, 16 b et 16 c**.

Tableau 12. Influence du système d'élevage des veaux sur les incidences des Cryptosporidies.

Système d'élevage	Types d'élevage	Mode d'entretien des veaux	Nbre de fermes ciblées	Résultats	
				V.P./V.T.	%
A	A1	Boxe individuel	4	22/64	(34,37)
	A2	Boxe collectif (2 veau(x)/box)	7	42/111	(46,8)
	A3	Boxe collectif (3 à 6 veaux/box)	11	56 /133	(42,10)
	A4	Boxe collectif (Nbre > 6 veaux/box)	5	51 /74	(68,9)
	Total (A1, A2, A3)				171/376
B	B1	Boxe individuel (DM)	4	19/79	(24,05)
	B2	Boxe collectif (DM) (2 veaux/box)	3	26 /57	(45,6)
	B3	Boxe collectif (DM) (3 à 6 veaux/box)	6	86/102	(84,31)***
	Total (B1, B2, B3)				131/238
Total			40	302/620	(48,7)

Légende: Nbre: nombre; DM: derrière les mères

* : B vs A ; ***B3 vs A3

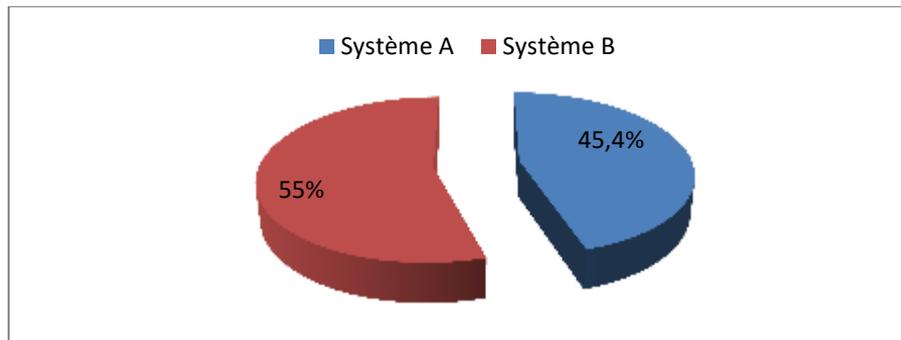
V.P. : Veaux positifs, V.T.: Veaux totaux examinés

NS : A1 vs B1; A2 vs B2

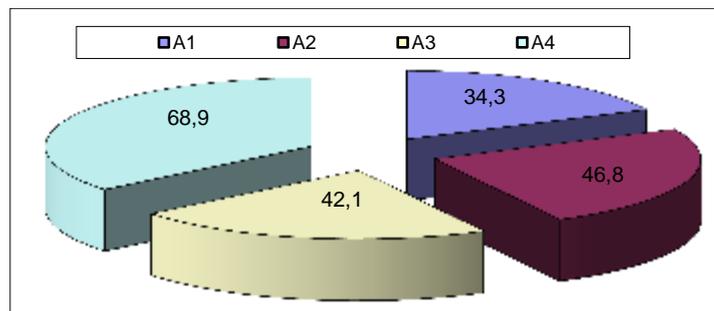
A travers les résultats obtenus sur le terrain, nous remarquons que dans les 40 fermes où nous avons observé les cryptosporidies, 67,5% d'entre-elles (soit, 27/40) pratiquent la séparation des veaux des mères et des autres adultes dès la naissance (c'est à dire quelques heures après la naissance) contre 32,5% (soit, 13/40 fermes) mettent les animaux nouveau-nés derrière les mères et/ou les autres bovins adultes.

En outre, l'influence du système d'élevage sur les incidences de *Cryptosporidium* spp. chez les veaux est apparue variable selon que ces derniers sont placés derrière les mères ou élevés en isolation de celles-ci ou encore selon que ces derniers sont séparément mis dans des boxes individuels ou mélangés avec les congénères dans des boxes collectif (supérieur ou égal à 2).

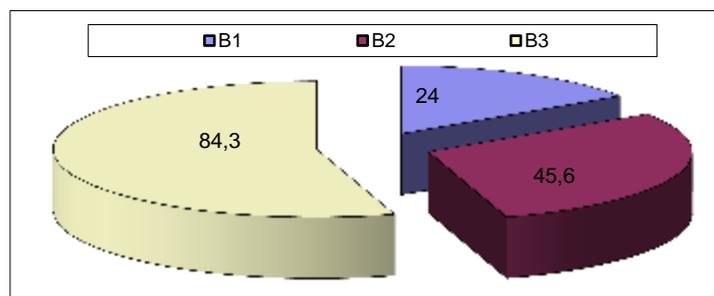
En effet, si on compare la fréquence d'isolement des cryptosporidies chez les veaux dans le premier cas, c'est surtout celui du système B qui apparaît le significativement élevé ($P \leq 0,05$) que le système A (55,0 % vs 45,47 %), alors que dans le deuxième cas, c'est particulièrement le type B3 qui offre un taux de parasitisme le plus élevé chez les veaux (84,3%), suivi de près par celui des veaux élevée dans le mode A4 (68,9%) et A2 (46,8%). Inversement, ce qui n'est pas le cas des animaux des modes B1 et A1 où les taux de positivité enregistrés paraissent relativement basses (34,3% et 24,0% respectivement) d'une façon très le significative ($P \leq 0,05$) par rapport aux A₂ et A₄.



(a) Totale



(b): Système A



(c): Système B

Légende : A1 : Box individuel ; B1 : Box individuel (derrière les mères) ;
 A2 : Box collectif (1 à 2 veau (x)/box) ; B2 : Box collectif (1 à 2 veaux/box derrière les mères) ;
 A3 : Box collectif (3 à 6 veaux/box) ; B3: Box collectif (Supérieur à 3 veaux/box derrière les mères);

Figure 16(a, b, c). Influence des différents systèmes d'élevage sur l'incidence de *Cryptosporidium* spp. Chez les bovins.

Cependant, si nous comparons les résultats de performance de chaque mode d'élevage (A1, A2, A3, A4, B1, B2 et B3) selon le système d'élevage (A et B), ceux-ci sont variables d'un mode à un autre. En effet, pour les veaux élevés en boxes individuels (A1, B1) et collectifs de 2 (A2, B2), c'est le système A qui enregistre des taux de positivité plus élevés que le système B (34,3% vs et 46,8% vs 45,6% respectivement). Quant aux boxes collectifs renfermant entre 3-6 veaux (A3, B3), c'est particulièrement celui du système B qui offre un score de parasitisme trop élevé que le système A (84,3% vs 68,9% respectivement).

D'après les résultats obtenus, il apparaît que les veaux placés derrière les mères et/ou les adultes paraissent les plus vulnérables atteinte par le parasite que ceux mis en isolation dans des boxes individuels ou collectifs. Un même constat est signalé dans l'étude de **BAUSSIÉ et DUMONT (1984)** et **AKAM *et al.* (2004)** où l'infection était beaucoup plus prononcée chez les sujets placés au voisinage des mères que ceux mis dans des boxes ou dans des parcs éloignés des mères.

Dans la présente étude, la cryptosporidiose est apparue fortement contractée chez les veaux des boxes collectifs renfermant (3 à 6 sujets, voir plus). Ceci est en accord à ce qui est indiqué dans les études épidémiologiques de **PALVASEK (1999)**, **ATWILL *et al.* (1998)** et **AKAM *et al.* (2004)** où l'ensemble de ces auteurs confirment la grande sensibilité des animaux confinés dans les boxes collectifs renfermant plus de trois veaux que ceux appartenant aux boxes individuels ou collectifs regroupant 2 veaux.

En comparant le taux de parasitisme des veaux dans les différents boxes d'élevage, c'est surtout ceux renfermant plus de 6 veaux qui sont les plus durement contaminés et inversement, une faible incidence est notée chez les veaux des boxes individuels par exemple (A₄ vs A₁) et (B₃ vs B₁) avec une différence très significative ($P \leq 0.05$).

DĀRĀBUS *et al.* (2001) a pu comparer 5 systèmes de croissance (boîte individuel, boîte collectif 2-3, 3- 4 et 7-8 veaux) et il a obtenu des résultats comparables à nos résultats, à savoir, une plus grande fréquence d'infestation chez les veaux des boxes collectif (7 et 8 veaux) et inversement, une faible incidence chez les veaux qui prennent des boxes individuels.

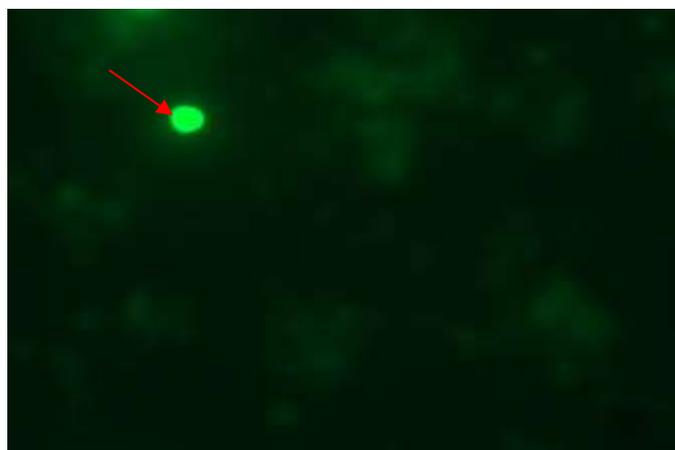
Les boxes collectifs chargés aux animaux ont un taux de charge plus élevé améliorent l'infection puisque les veaux infectés produisent un grand nombre d'oocystes et quant ces veaux

infectés restent la plupart de temps dans des endroits clos assure une contamination environnementale élevée [GEURDEN *et al.*, 2006 ; AYANA et ALEMU, 2015].

En revanche, dans le système d'élevage traditionnel, les veaux restent la plupart du temps dans des pâturages, où les oocystes sont dispersés sur une grande surface et exposés à la lumière directe du soleil, ce qui réduit la viabilité des oocystes [LEFAY *et al.*, 2000].

II.1 .2.8. Identification de *Cryptosporidium* et *Giardia* par l'immunofluorescence

Après la récupération des échantillons de selles révélés positives par la technique Ziehl Neelsen, nous avons obtenu les résultats qui sont présentés dans la (Figure 17).



(a)



(b)

Figure 17. Oocyste de *Cryptosporidium* observé par : (a) l'immunofluorescence directe ; filtres verts (émission, 518 nm) (b) DAPI-positif ; filtres bleus (émission, 461 nm) (GX 100).

Les résultats montrent que tous les échantillons sont révélés positifs avec la technique d'immunofluorescence. *Cryptosporidium* apparaissent avec la couleur verte sur fond noir cependant la présence ou l'absence de contenu d'oocystes en utilisant DAPI, parmi les 30 échantillons testés, 26 sont DAPI- positif avec fluorescence bleu du noyau.

La mise en évidence des cryptosporidies dans les matières fécales s'appuie sur des techniques de coloration, de concentration (sédimentation ou flottation) ou d'immuno-marquage. Les techniques de coloration comprennent principalement la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée, la coloration de Kinyoun, la coloration auramine- phénol et la coloration négative de Heine [GARCIA *et al.*, 1983 ; CASEMORE, 1991].

Les techniques de concentration comprennent la flottation au sucrose et la sédimentation au formol-ether ou au formol-acétate d'éthyle. La flottation au sucrose est une technique permettant à la fois d'augmenter la sensibilité et de quantifier l'excrétion d'oocystes ce qui est très précieux lors d'essais thérapeutiques ou d'études épidémiologiques [MANCASSOLA *et al.*, 1995].

Les techniques de marquage immunologique s'appuient sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux conjugués à des marqueurs fluorescents, des enzymes comme dans la technique ELISA ou d'autres supports (microsphères de latex) [JEX *et al.*, 2008].

Parmi les techniques utilisées pour détecter le *Cryptosporidium* dans des échantillons fécaux, le IFD est le test le plus important [FAYER *et al.*, 2000 ; BIALEK *et al.*, 2002]. Cette méthode présente la bonne sensibilité et haute spécificité que les techniques traditionnelles de colorations [JOHNSTON *et al.*, 2003].

D'après MANK *et al.* (1997), ce test est plus sensible que l'examen traditionnel des frottis permanents pour *Giardia* et une sensibilité égale ou supérieure à celle de l'examen traditionnel des frottis permanents préparés à partir des échantillons de selles concentrés pour *Cryptosporidium*.

Pour évaluer la viabilité des kystes et des oocystes, l'ajout d'un colorant fluorogène nucléaire "le DAPI" est très fiable [WARE *et al.*, 2003 ; AL-ADHAMI *et al.*, 2007]. Le DAPI se lie à l'ADN, il met en évidence les noyaux des kystes et des oocystes et confirme leurs présence [GRIMASON *et al.*, 1994].

GRIMASON *et al.* (1994) ont développé la méthode d'immunofluorescence, en utilisant le DAPI, qui s'intercale avec les noyaux dans les oocystes sporulés, en conjonction avec un anticorps

monoclonal anti-*Cryptosporidium* conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC-C-MAb) puis une visualisation sur le microscope à fluorescence.

GARCIA et SHIMIZU (1997) ont mentionné que ces immunodosages sont sensibles et spécifiques que les méthodes microscopiques traditionnelles et augmentent l'efficacité du laboratoire en minimisant le travail, le temps et les coûts.

Les immunodosages pour la détection d'antigène sont largement utilisés pour *Giardia* et *Cryptosporidium* sont les tests IFD qui détectent les organismes intacts et les immunodosages enzymatiques (EIA) qui détectent les antigènes solubles dans les selles [**GARCIA et al., 1992 ; GARCIA et SHIMIZU, 2000**]. Les sensibilités rapportées par EIA vont de 94 à 97% et les spécificités vont de 99 à 100% [**KEHL et al., 1995, JOHNSTON et al., 2003**].

Les tests IFD utilisent des anticorps marqués à la fluorescéine dirigés contre les antigènes de la paroi cellulaire des kystes de *Giardia* et des oocystes de *Cryptosporidium* et permettent la visualisation des parasites intacts, fournissant un diagnostic définitif. La sensibilité et la spécificité du test IFD commercial le plus couramment utilisé, le test MERIFLUOR IFD, est de 96 à 100% et de 99,8 à 100% pour *Giardia* et *Cryptosporidium* respectivement [**GARCIA et al., 1992 ; KEHL et al., 1995 ; GARCIA et SHIMIZU, 1997**].

JOHNSTON et al. (2003) ont comparé le dosage rapide l'ImmunoCard STAT au test MERIFLUOR *Cryptosporidium* / *Giardia* IFD (Meridian Bioscience, Inc.), au test de microplaque ProSpecT *Giardia* EZ (EIA) (Alexon-Trend, Inc., Ramsey, Minn.), et ProSpecT *Cryptosporidium* microplaque (EIA) (Alexon-Trend, Inc.) pour la détection de *Giardia* et *Cryptosporidium*, et ils ont trouvé que la spécificité de tous les tests était $\geq 99\%$.

Selon **JOHNSTON et al. (2003)** la sensibilité est calculée comme étant le nombre de résultats d'essais positifs divisé par la somme des résultats positifs pour l'IFD et multiplié par 100. La spécificité est définie comme le nombre de résultats d'essais négatifs divisé par la somme des résultats négatifs et multiplié par 100.

La sélection d'un kit particulier et d'une approche pour l'incorporation dans le flux de travail devrait être la responsabilité de chaque laboratoire. Ces décisions sont basées sur un certain nombre de facteurs, y compris les coûts, la charge de travail anticipée, la facilité de la performance du kit, le

nombre de personnel formé, la taille de laboratoire, la disponibilité des équipements, le temps nécessaire pour atteindre un résultat [JOHNSTON *et al.*, 2003].

Ces kits de diagnostic ne remplacent pas les techniques de routine mais ils sont très utiles pour confirmer les infections par *Giardia* et *Cryptosporidium* est une approche de dépistage peut être utile lors de la gestion d'une situation d'épidémie potentielle, en particulier si une flambée d'origine hydrique est suspectée [GARCIA et SHIMIZU, 1997 ; TEIXEIRA *et al.*, 2011].

Selon GARCIA et SHIMIZU (1997) la technique IFD a des quelques problèmes y compris probablement la liaison de l'anticorps aux oocystes vides qui sont trouvés couramment dans l'échantillon, donc la PCR est plus sensible par rapport à l'immunofluorescence pour la détection de *Cryptosporidium*.

L'étude de WEBER *et al.* (1991) révèle que la sensibilité de la méthode de diagnostic par l'IFD pour détecter les oocystes de *Cryptosporidium* dans les selles humaines était liée à la quantité d'oocystes. Les quantités minimales d'oocystes par g étaient de 5 000 à 10 000 dans des selles liquides, et de 10 000 à 50 000 dans des selles solides [WEBER *et al.*, 1991]. Cette méthode permet de détecter 100 oocystes de *Cryptosporidium* et 100 kystes de *Giardia* en g de matières fécales [XIAO et HERD, 1993].

Selon LENG *et al.* (1996), la sensibilité de l'IFD peut être influencée par les techniques de concentration d'oocystes et la consistance des selles où s'effectue un processus de lavage pour les suspensions fécales avant la coloration.

Récemment, le IFD est utilisée pour estimer l'intensité de l'infection par *Cryptosporidium* chez les patients atteints du SIDA [GOODGAME *et al.*, 1993].

Conclusion

- Dans l'ensemble des 620 veaux ciblées, 48,7% (soit, 302/620) d'entre-elles hébergent les Cryptosporidies.
- Dans les 40 fermes, la prévalence de la cryptosporidiose varie de 18,4% à 77,7%.
- Le portage asymptomatique existe pour *Cryptosporidium*, avec cependant une plus grande fréquence chez les sujets diarrhéiques (60,4% vs 12,0%).
- La réceptivité maximale des veaux aux cryptosporidies se situe à l'âge de 15-21 jours (25,1%) et à un degré moindre chez les 22-30 jours (21,5%).
- La cryptosporidiose est faiblement exprimée en intensité et en durée chez les veaux 1-7 jours et ceux dépassant 60 jours. Inversement, elle est fortement développée en intensité (+2, +3) et en durée chez les 8-30 jours.
- Le sexe ne semble avoir aucune influence sur l'incidence des cryptosporidies chez les veaux.
- Les fermes à conditions sanitaires mauvaises hébergent beaucoup plus les cryptosporidies que celles offrant des conditions sanitaires moyennes ou bonnes et ce, quel que soit la taille de l'exploitation.
- Les veaux placés derrière les mères sont plus vulnérables au parasite que ceux mis en isolation des mères et/ou des autres adultes (55,00% vs 45,4%).
- Le risque d'infestation cryptosporidienne est trop élevé chez les veaux placés dans les boxes individuels ou collectifs placés derrière les mères que ceux des boxes individuels placés en isolation des mères.
- L'agglomération des veaux dans les boxes collectifs (3-6 veaux) et plus, isolément ou derrière les mères augmente significativement ($P \leq 0,05$) le risque de propagation du parasite entre les congénères.
- La technique IFD qui a été effectuée pour confirmer la présence de *Cryptosporidium* a révélé 26 échantillons positifs parmi 30 échantillons testés, l'IFD a confirmé l'absence de *Giardia*.

II. 2.

ETUDE MOLÉCULAIRES (*CRYPTOSPORIDIUM ET GLADIA*)

1.

CRYPTOSPORIDIUM

Introduction

Ces dernières années et comparant aux méthodes conventionnelles et coproscopiques (Immunofluorescence, coloration à l'auramine phénol et la sédimentation formol-éther), les méthodes moléculaires ont une meilleure sensibilité dans la détection de *Cryptosporidium* dans les matières fécales [WEBSTER *et al.*, 1996].

L'étude épidémiologique sur la cryptosporidiose bovine est moins abondante en Algérie, puisque l'étude de cette maladie auparavant était concentrée sur l'analyse microscopique sans l'étude moléculaire [OUCHENE *et al.*, 2012 ; ABBAS *et al.*, 2015].

Deux études seulement, à ce jour, ont présenté des résultats de caractérisation moléculaire d'isolats de *Cryptosporidium* retrouvés chez le poulet de chair et le dindon de chair [BAROUDI *et al.*, 2013] chez les veaux [BAROUDI *et al.*, 2017] chez les agneaux et les chevreaux [BAROUDI *et al.*, 2018] chez les équins [LAATAMNA *et al.*, 2013] et chez les chevaux et les ânes [LAATAMNA *et al.*, 2015].

Il paraît essentiel, sachant qu'à ce jour peu de connaissance sur l'épidémiologie de ces parasites chez les bovins dans le but de pouvoir mettre en place des mesures préventives hygiéniques adaptées.

L'objectif de notre travail est de compléter les données disponibles sur la présence de *Cryptosporidium* spp. chez les bovins en Algérie et la relation avec l'âge, le sexe et le contexte clinique observé, puis d'identifier les espèces excrétées et enfin d'évaluer leur potentiel zoonotique.

II.2.1.1. Matériel et Méthodes

II.2.1.1.1 Récolte et analyse des échantillons fécaux

Notre étude a été réalisée entre Janvier à Mars 2016 au niveau de 17 élevages bovins laitiers de race Prim'Holstein et Montbéliarde (**Figure 18**). Dans tous ces élevages, nous avons été informé que les veaux restent auprès de leurs mères après la naissance jusqu'à l'âge de deux semaines, après ils aient été isolés dans des boxes collectifs. Ainsi, les diarrhées sont fréquentes dans ces élevages sans aucune prévention ou traitement n'ont été entreprise.

Au total, 132 prélèvements d'échantillons de matière fécale issus seulement de veaux diarrhéiques (dont l'âge entre 15J à 8 Mois) sont collectés. Chaque animal a fait l'objet d'un seul prélèvement. Les prélèvements de selles sont recueillis directement à partir du rectum (défécation provoquée par l'introduction d'un doigt ganté ou un thermomètre) dans des flacons stériles puis acheminés dans une glacière au laboratoire de parasitologie de CHU de BATNA où ils sont traités par la technique de coloration de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz après application préalable de la méthode d'enrichissement de Ritchie simplifiée par Allen et Ridley, (1970).

Seuls 66 des échantillons révélés positifs par les techniques de colorations sont retenus et conservés dans le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) à 2,5% à une température de 4°C en vue d'une analyse moléculaire.

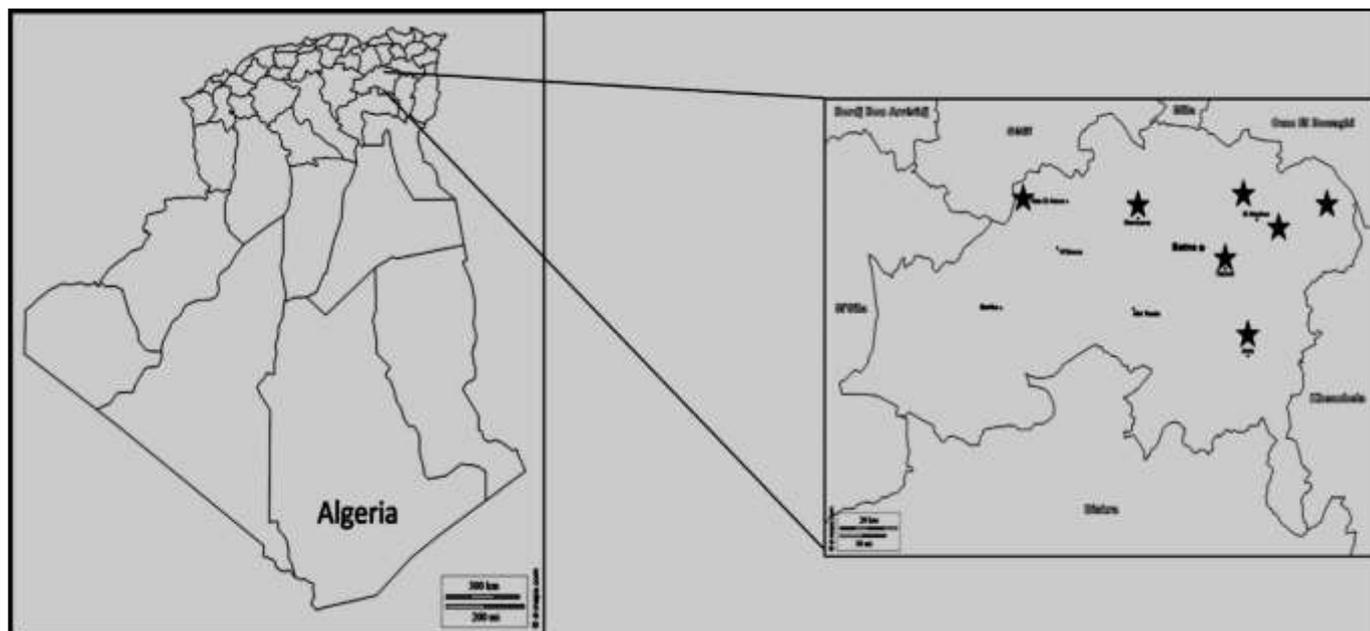


Figure 18. Carte de l'Algérie et de la Wilaya de Batna montrant l'emplacement des fermes laitières étudiées, qui sont ★: Merouana, El Madher, Djerma, Arris, Ras El Aioun, Chemora, Aïn Yagout, Bouhmar.

(Cartes originales téléchargées depuis http://www.d-maps.com/carte.php?num_car=176844&lang=en, 2018).

II.2.1.1. 2. Concentration des selles pour l'étude moléculaire

Dans le but de récupérer les selles y compris les éléments parasitaires du dichromate de potassium, nous avons mis 4 à 5 g de matière fécale après homogénéisation dans un tube de 50 ml contre 40 ml d'eau distillée puis nous avons le mis sous vortex pour être mélangé. Le mélange est filtré puis mis dans un tube de 50 ml, et nous avons ajusté le volume à 40 ml avec l'eau distillée, après deux centrifugations à 3600 rpm pendant 10 mn, la première où le culôt est suspendu avec l'eau distillée à 40 ml suivi par une deuxième centrifugation où le culôt est récupérer [BENHOUDA *et al.*, 2017].

II.2.1.1. 3. Extraction de l'ADN à partir des échantillons fécaux

L'extraction de l'ADN est effectuée par un kit disponible dans le commerce (ADN QIAamp™ Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant. 200µl d'échantillon de selle concentré sont transférés dans un tube Eppendorf de 2 ml puis nous avons rajouté 1 ml de tampon Inhibitex, suivi d'une homogénéisation pendant 1 mn dans le vortex et enfin incubé à 95 C° pendant 10 mn sous agitation avec Thermomixeur Eppendorf (**voir annexe 05**).

Après l'agitation, nous avons fait une centrifugation pendant 1 mn à 1400 rpm afin de sédimenter les substances insolubles avec une micro-centrifugeuse à Eppendorf 5415 D (**annexe 07**).

D'un autre côté, nous avons mis 25 µl de la Protéinase k dans un tube propre de 2 ml dans lequel nous avons rajouté 600 µl de surnageant contre 600 µl de tampon AL, puis nous avons mis le mélange dans le vortex pendant 15 seconde, suivi d'une incubation à 70 C° pendant 10 mn puis nous avons mis 600 µl de l'éthanol avec une concentration de 96 -100 % au lysat qui est sous vortex.

Ainsi, pour chaque échantillon, nous avons mis une colonne de récupération dans un tube de collection dans laquelle on dépose 600 µl de lysat, suivi d'une centrifugation à 1400 rpm pendant 1mn, puis on jette le tube de collection et on met la colonne de récupération dans un nouveau tube de collection, cette étape est répétée deux fois.

Après, 500 µl de tampon de lavage AW1 est ajouté à la colonne de récupération puis centrifugé 1400 rpm pendant 1 mn, on jette le tube de collection et on met la colonne de récupération dans un nouveau tube de collection, encore 500 µl de tampon de lavage AW2 est ajouté à la colonne de récupération puis centrifugé 1400 rpm pendant 3 mn. Puis on jette le tube de collection et on tourne pendant une minute supplémentaire pour retirer le tampon résiduel, puis nous avons transféré la colonne de récupération dans un tube Eppendorf de 1,5 ml (**voir annexe 07**).

200 µl de tampon d'éluion (ATE) est rajouté à la colonne de récupération puis elle est incubée pendant 1-2 mn après centrifugé à 14000 rpm / mn pendant 1 mn, ensuite la colonne de récupération a été jeté et les tubes Eppendorf contenant les extraits d'ADN ont été conservés à +4C°.

II.2.1.1. 4. Amplification de l'ADN par PCR

II.2.1.1. 4. 1. Principe du test

La PCR ou la réaction de polymérisation en chaine (ou Polymerase Chain Reaction), " classique " permet d'amplifier une séquence d'ADN d'une façon exponentielle à l'aide d'une enzyme polymérase [OIE, 2008]. Le plus souvent l'ADN extrait passe par une phase de dénaturation à une phase d'hybridation avec des amorces appropriées puis à une phase d'élongation. La séquence est recopiée en présence d'une enzyme Taq polymérase, de quatre types de nucléotides qui diffèrent par la nature de la base azotée qui peut être (Adénine, Guanine, Thymine et Cytosine) et MgCl₂. Cette réaction est répétée n fois aboutissant à la synthèse de 2ⁿ copies de la séquence d'ADN initiale [LOMBARDI *et al.*, 2009]. Les produits de la PCR classique sont visualisés par l'électrophorèse sur un gel d'agarose contenant le bromure d'éthidium (BET) et sous la lumière ultraviolette UV [OIE, 2008].

Un autre type de PCR qui est la PCR nichée (ou Nested PCR) consiste à une amplification de produit de la première PCR pour une deuxième fois avec des amorces étant censées amplifier une séquence interne dans le premier fragment amplifié [IMWONG *et al.*, 2009]. La PCR nichée permet avec cette deuxième amplification d'augmenter fortement la crédibilité de la technique (Figure 19).

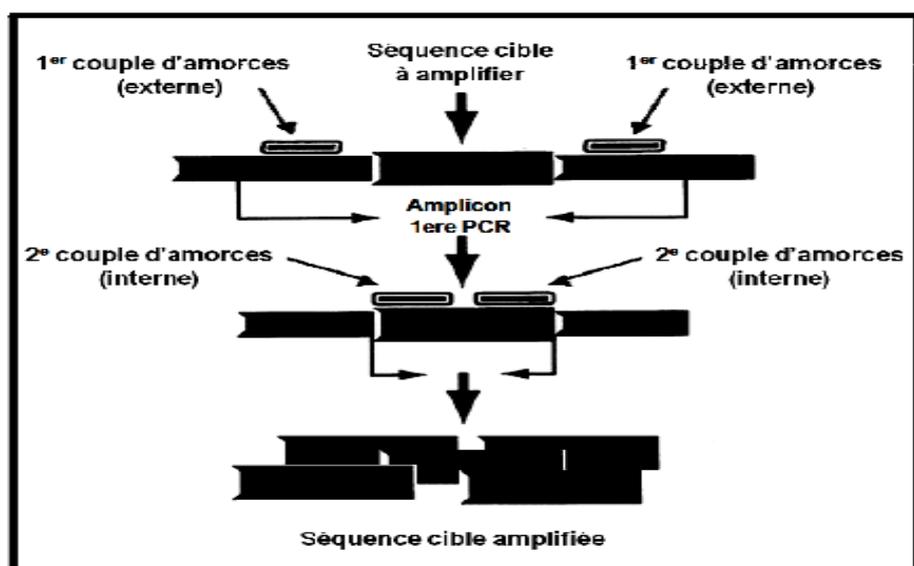


Figure 19. Représentation schématique illustrant la méthode de la PCR nichée [LOMBARDI *et al.*, 2009].

II.2.1.1. 4.2. PCR nichée sur le gène de l'ARNr 18S de *Cryptosporidium*

A. Principe du test

La PCR nichée sur le gène de l'ARNr 18S est appliquée sur l'ADN extrait d'échantillons cliniques présentés pour le diagnostic et le génotypage de *Cryptosporidium* [FENG *et al.*, 2007]. Le gène d'ARNr 18S a des avantages par rapport à d'autres gènes (COWP, HSP70, actine) grâce à la présence de régions semi-conservées au sein du genre, dans laquelle on trouve des régions hautement polymorphes qui varient entre les espèces ce qui rend plus facile à développer les amorces qui ciblent la plupart des espèces [XIAO, 2010]. La PCR de ce gène permet d'amplifier une séquence d'environ de 830 pb. Les produits de la PCR sont visualisés par électrophorèse en gel d'agarose [KITAGAWA *et al.*, 1996; ZEAITER *et al.*, 2003].

B. Préparation des mélanges réactionnels

La PCR est effectuée en utilisant 25 µl de 2X GoTaqGreen (Promega, Madison, WI, USA), 10 pmol de chaque amorce, (2,5-5,0 µl) d'ADN et de l'eau exempte de nucléase jusqu'à un volume final de 50 µL. Les différents réactifs et les concentrations citées dans le **tableau 13**. Des réactions sont effectuées sur un Thermocycleur Perkin Elmer 9700 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (**voir annexe 08**) [DAVID *et al.*, 2015].

Tableau 13. Mélange réactionnel nécessaire pour un seul échantillon (PCR classique).

Composants	Pour 1Tube (µl)
PCR Master Mix Promega (2X)	25
Amorce sens 10 pmol/µl	1
Amorce anti – sens 10 pmol/µl	1
Eau exempte de nucléase	18
L'extrait d'ADN	5
Volume Finale	50

PCR Master Mix Promega est un mélange de Tampon (Mg Cl₂, de dNTPs et Taq Polymérase) avec des concentrations appropriées pour une réaction PCR efficace, suivant la procédure décrite par RYAN *et al.* (2003).

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

a. Contrôles positifs

- Contrôle positif de PCR primaire : ADN de *Cryptosporidium*.
- Contrôle positif de PCR secondaire : Produit de contrôle positif de PCR primaire.

b. Contrôles négatifs

- Contrôle négatif de PCR primaire : eau distillée.
- PCR secondaire : le même contrôle négatif de PCR primaire.

c. Amorces utilisées :

- Amorces de la première PCR pour un fragment de ~ 763 pb:
Avant (18SiCF2):5' –GAC ATA TCA TTC AAG TTT CTG ACC-3' (Position de paire de base 292)
Inverse (18SiCR2):5'-CTG AAG GAG TAA GGA ACA ACC-3')(Position de la paire de base 1007).
- Amorces de la deuxième PCR pour un fragment de ~587 pb :
Avant (18SiCF1):5' –CCT ATC AGC TTT AGA CGG TAG G-3') (Position de paire de base 289)
Inverse (18SiCR1):5'-TCT AAG AAT TTC ACC TCT GAC TG-3') (Position de paire de base 851)

C. Exécution du test PCR

Dans la zone de préparation de la PCR et après la préparation du mélange réactionnel de PCR, le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes pour enlever toute solution piégée dans le bouchon du tube. 49 µl (pour la PCR primaire) ou 48 µl (pour la PCR secondaire) de mélange réactionnel préalablement préparé dans chaque tube de 0,2 ml pour PCR sont ajoutés puis 1 µl de chaque échantillon d'ADN a été ajouté aux tubes avec le mélange réactionnel pour la PCR primaire, puis nous avons ajouté 2 µl des produits pour les tubes avec le mélange réactionnel pour la PCR secondaire pour avoir un volume total de 50 µl.

- Pour le contrôle négatif, 1 ml d'eau distillée sont ajoutés au tube vide désigné pour la PCR primaire et la PCR secondaire.
- Pour le contrôle positif, 1 µl d'ADN de contrôle positif est rajouté au tube désigné pour la PCR primaire et 2 µl de produit PCR de contrôle positif de la PCR primaire sont rajouté au mélange réactionnel du contrôle positif de PCR secondaire. Les tubes de PCR sont centrifugés à 3100 rpm pendant 1mn avec une centrifugeuse 5804 eppendorf (**voir annexe 09**) puis placés dans le bloc thermique (« thermal block ») du thermocycleur Perkin Elmer 9700 [RYAN *et al.*, 2003].

La PCR est réalisée selon la programmation de thermocycleur décrite par SOTIRIADOU *et al.* (2013) présenté dans le **tableau 14**.

Tableau 14. Programmation du thermocycleur (temps et températures) en PCR sur le gène de l'ARNr 18S.

	Etapes	Temps et Températures
Cycle d'amplifications (répétées 30 fois)	Dénaturation initiale	5 mn/ 94 C°
	Dénaturation	30s / 94 C°
	Hybridation des amorces	30s / 55 C°
	Elongation	60s / 72 C°
	Elongation finale	7 mn/ 72 C°

D. Révélation

a. Préparation du gel d'agarose

Afin de préparer un gel d'agarose à 1,5%, 2 g d'agarose (CSL-AG500) sont mélangés avec 200 ml d'eau distillée (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer). Ce mélange est alors agité afin d'être homogénéisé. Avant que la stabilisation de la solution, nous avons mis au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections. La solution est agitée de temps à autre pour homogénéiser le mélange. Après, celle ci elle est laissée pour refroidir (environ 60 °C), puis 0,5 µg /ml de BET est rajouté [SMITH *et al.*, 1989].

Le gel d'agarose est coulé lentement dans la cuve pour faire un gel de 3 à 5 mm d'épaisseur. Après le refroidissement du gel au moins 30 mn, le peigne est enlevé et le gel sera prêt pour le dépôt des échantillons (voir annexe 10).

b. Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse

Après solidification du gel, la chambre est remplie avec TAE (x 1) pour couvrir le gel puis 10 µl de marqueur de taille (100 pb) sont pipetés dans le premier et le dernier puit. Par la suite, un mélange de 2 µl de gel 6x tampon de chargement et 10 µl de chaque produit PCR est préparé pour tous les échantillons, puis 10 µl de chaque mélange est chargé à l'intérieur de chaque puit. La migration est conjointe le contrôle positif, contrôle négatif et avec une puissance 60V. Le gel est retiré jusqu'à ce que le colorant migre à une distance appropriée, la révélation est effectuée sous la lumière UV avec transilluminateur (voir annexe 11).

c. Interprétation des résultats de PCR sur l'électrophorèse

La taille des bandes d'amplification révélées par l'électrophorèse d'environ 600 pb sur le gel d'agarose et en accord avec le contrôle positif sont considérés comme positifs, indiquant la présence d'ADN de *Cryptosporidium* dans l'échantillon analysé (**Figure 19**). Le contrôle négatif de l'amplification ne montre aucun produit d'amplification. L'échantillon est considéré comme négatif si aucune bande n'est visible ou si la bande a une taille non conforme au contrôle positif.

II.2.1.1. 4.3. PCR nichée sur le gène de protéine GP60 de *Cryptosporidium*

A. Principe du test

L'analyse de la séquence du gène gp60 est largement utilisée dans le sous-typage de *Cryptosporidium* grâce de son hétérogénéité de séquence. C'est le marqueur polymorphe le plus simple et qui est identifié jusqu'à présent dans le génome de *Cryptosporidium* [GATEI *et al.*, 2006; LEONI *et al.*, 2007; WIELINGA *et al.*, 2008]. Le gp60 est situé sur la surface de la région apicale des stades invasifs du parasite, et est l'une des cibles dominantes pour neutraliser les réponses d'anticorps chez l'homme [O'CONNOR *et al.*, 2007].

B. Préparation des mélanges réactionnels

Nous avons utilisé le protocole de DURANTI *et al.* (2009) la préparation des mélanges réactionnels est la comme celle utilisée dans la Nested PCR 18S (ou PCR nichée).

a. Contrôles positifs et négatifs

Les contrôles positifs et négatifs sont les mêmes utilisés dans la Nested PCR 18S.

b. Amorces utilisées :

- Amorces de la première PCR pour le gène complet :

Avant (gp15ATG):5'-CGGGATCCATATGAGATTGTCGCTCATTATC-3'

Inverse (gp15STOP):5' -GGAATTCTTACAACACGAATAAGGCTG -3'

- Amorces de la deuxième PCR pour un fragment de ~300 pb :

Avant : 5'- GCCGTTCCACTCAGAGGAAC-3 '

Inverse : 5'- CATTACAAATGAAGTGCCGCA-3 '

C. Exécution du test PCR

La PCR est réalisée de la même façon que la PCR 18S selon la méthode de DURANTI *et al.* (2009), la différence liée à la température et le temps de la réaction qui sont mentionnés dans le **tableau 15**.

Tableau 15. Programmation du thermocycleur (temps et températures) en PCR sur le gène de protéine GP60.

	Étapes	Temps et Températures
Cycle d'amplifications (répétées 35 fois)	Dénaturation initiale	15 mn/ 95 C°
	Dénaturation	30s / 94 C°
	Hybridation des amorces	30s / 50 C°
	Elongation	60s / 72 C°
	Elongation finale	7 mn/ 72 C°

D. Révélation

La même révélation effectuée dans la PCR 18S.

II.2.1.1. 4.4. Purifications des produits positifs par PCR

Afin de purifier les échantillons positifs par PCR, en utilisant QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) et selon les instructions du fabricant, 40 µl de chaque produit de PCR sont mélangés. Le mélange est alors dilué avec 200 µl de buffer PB (guanidine hydrochloride et isopropanol) donc une dilution d'ordre 1V/5V puis centrifugé 10 000 tours /mn pendant 1 mn, le culôt est écarté, puis 750 µl de solution de lavage PE (contenant de l'éthanol 96–100%) est rajouté pour éliminer tout ce qui est lié d'une manière passif, puis une centrifugation effectuée pendant 1 mn à 10 000 tours par mn puis le culôt est écarté. Une autre centrifugation est appliquée pendant 12 000 tours /mn pendant 2 mn pour éliminer la solution de lavage restante.

L'élution est faite avec 30 µl de tampon d'élution EB (de l'eau à pH 7,0– 8.5) puis laissé 1mn, suivi d'une dernière centrifugation (10 000 tours /mn pendant 1 mn). Après 30 µl de chaque échantillon pur est obtenus, contenant des fragments d'ADN pur et concentré.

On confirme la présence d'ADN pur par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%, nous avons mis 6 µl de marqueur du poids dilué 1X d'ordre de 1000 pb et 12 µl dans chaque puit de chaque solution préparée (5 µl de chaque produit pur est ajouté à 2 µl de tampon 6 X et 5 µl d'eau exempte de nucléase) (**voir annexe 12**).

II.2.1.1. 4.3. 5. Estimation de la quantité d'ADN de produit de PCR purifié

Nous avons mesuré la quantité d'ADN dans les 25 µl de chaque échantillon purifié avec un fluoromètre Qubit qui est hautement sensible (**voir annexe 13**).

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

Une solution de travail Qubit® est préparée en diluant le réactif Qubit® dsDNA HS 1: 200 dans le tampon Qubit®QsDNA dsDNA HS.

190 µl de solution de travail Qubit® est rajoutée à 10 µl de chaque étalon Qubit® dans un tube approprié pour les étalons, puis mélangé au vortex pendant 2-3 secondes en évitant la formation des bulles d'aires.

Aux tubes de dosage individuels (tubes PCR de 0,5 ml à paroi mince et transparents), 195 µl de solution de travail Qubit® est ajouté à 5 µl d'échantillon purifié de sorte que le volume final dans chaque tube est de 200 µl puis agité au vortex pendant 2-3 secondes, suivi d'une incubation à la température ambiante pendant 2 mn. Après, nous avons mis le tube de dosage dans la chambre d'échantillonnage fluoromètre Qubit®, après la fermeture du couvercle. Lorsque la lecture est terminée (~ 3 secondes), on retire le tube.

Le fluoromètre Qubit® donne des valeurs pour le dosage Qubit® dsDNA HS en ng / ml. Cette valeur correspond à la concentration de l'échantillon après la dilution de l'échantillon dans le tube de dosage et la concentration de l'échantillon est calculée comme suit :

$$\text{Concentration de l'échantillon} = \text{valeur de QF} \times \frac{200}{x}$$

Valeur de QF = Valeur donnée par le fluoromètre Qubit® 2.0 ;

X = Nombre de microlitres d'échantillon ajoutés au tube d'essai.

Une fois la mesure est faite, la dilution est effectuée d'une façon que chaque échantillon a une concentration d'ADN de 10 à 20 ng puisque le séquençage exige cette concentration.

II.2.1.1.5. Exécution du séquençage de l'ADN

Les échantillons purifiés sont séquencés le long des deux brins en utilisant le kit de séquençage cyclique ABI PRISM®BigDye Terminator (Life Technologies) selon les instructions du fabricant. Les réactions de séquençage sont analysées à l'aide d'un séquenceur automatique ABI PRISM® 3130 (Life Technologies).

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

II.2.1.1.6. Etude bioinformatique

Les chromatogrammes sont édités et assemblés à l'aide d'un logiciel SeqMan 7,1 (DNASTAR, Madison, WI, USA). Les espèces et les sous-types sont identifiées par l'analyse BLAST par rapport à la base de données Genbank.

De nouvelles séquences sont déposées dans GenBank avec numéros d'accès KY765343, KY765344, KY765345, et KY775519 pour *Cryptosporidium*.

II.2.1.1.7. Tests statistiques

Les données obtenues par PCR nichée sont classées en fonction de l'âge et du sexe de l'animale. Les résultats de la présente étude sont analysés par GraphPad prisme 6 (version 5.02, GraphPad Software, Inc., CA, USA) par analyse de χ^2 . Aussi le test ANOVA 1 et ANOVA 2 sont utilisés, suivi par le test de tukey. Les probabilités (valeur de $P \leq 0,05$) sont considérées comme significatives.

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

II.2.1.2. Résultats et Discussion

II.2.1.2. 1. Analyse microscopique et les produits de la PCR

Tableau 16. Espèces de *Cryptosporidium* identifiées chez les bovins de la région Est d'Algérie BATNA.

Origine de ferme	Nbre de fermes	Nbre Veaux/ferme	Nbre d' Echantillons fécale collectés	Nbre positives testées par la microscopie	Nbre positives testées par PCR	Espèce identifiée	Nbre d'espèce
Djarma	1	33	7	7/7	2 / 7	<i>Cryptosporidium bovis</i> <i>Cryptosporidium ryanae</i>	1 1
	2	6	2	2/2	1 / 2	<i>Cryptosporidium bovis</i>	1
	17	6	2	2/2	2 / 2	<i>Cryptosporidium bovis</i>	2
Ain yagout	3	26	10	10/10	3/ 7	<i>Cryptosporidium bovis</i>	3
	4	40	10	10/10	3/ 5	<i>Cryptosporidium bovis</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>	2 1
Maader	5	20	6	6/6	4/ 6	<i>Cryptosporidium bovis</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>	2 2
Arris	6	7	3	3/3	0 / 3	—	-
	7	10	8	8/8	1 / 2	<i>Cryptosporidium ryanae</i>	1
Marwana	8	40	8	8/8	2 / 3	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>Cryptosporidium ryanae</i>	1 1
Chemora	9	15	5	4/5	1 / 5	<i>Cryptosporidium ryanae</i>	1
	10	10	4	4/4	1 / 1	<i>Cryptosporidium ryanae</i>	1
	11	11	5	3/5	0 / 5	—	-
Bouhmar	12	34	24	15/24	1 / 5	<i>Cryptosporidium bovis</i>	1
	13	27	9	9/9	1 / 1	<i>Cryptosporidium bovis</i>	1
Raas	14	11	5	2/5	0 / 5	—	-
Laayeon	15	28	15	11/15	1 / 4	<i>Cryptosporidium bovis</i>	1
	16	32	9	7/9	1 / 3	<i>Cryptosporidium ryanae</i>	1
Total	17	-	132	111/132	24/66	—	-

(-):Négatif.

Sur la base de l'analyse microscopique des frottis fécaux colorés par la méthode de Ziehl-Neelsen modifiée, la majorité des échantillons (84%) dans chacune des 17 fermes étudiées étaient positifs (**Tableau 16**). Egalement, nous avons trouvé au moins un échantillon positif dans chacune des 17 fermes étudiées.

Nous avons observé que dans la majorité des échantillons (58%) renferment peu d'oocystes de *Cryptosporidium*. En raison de la possibilité de faux négatif des résultats de l'analyse microscopique

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

et la plus grande sensibilité de l'analyse moléculaire, 66 échantillons, comprenant au moins un échantillon par ferme sont retenus pour cette analyse.

Après le séquençage des amplicons d'ARNr de SSU *Cryptosporidium bovis* comme l'espèce la plus répondue (n = 14, présent dans neuf fermes), suivi de *C. ryanae* (n = 6), dans six fermes et *C. parvum* (n = 4), dans trois fermes.

En particulier, les séquences obtenues avaient 100% de similitude avec les séquences de référence GenBank pour *C. bovis* (AY741305), *C. ryanae* (EU410344) et *C. parvum* (KY514062). Aucune variation observée n'a été détectée dans la séquence intra-espèces dans le fragment du gène de l'ARNr SSU (**Tableau 16**).

Les *Cryptosporidium* sont isolés de nombreux types de vertébrés, tels que les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les poissons. C'est une maladie zoonotique en raison de sa capacité à transmettre des animaux à l'homme [**SANFORD et JOSEPHSON, 1982; SUNNOTEL et al., 2006 B**].

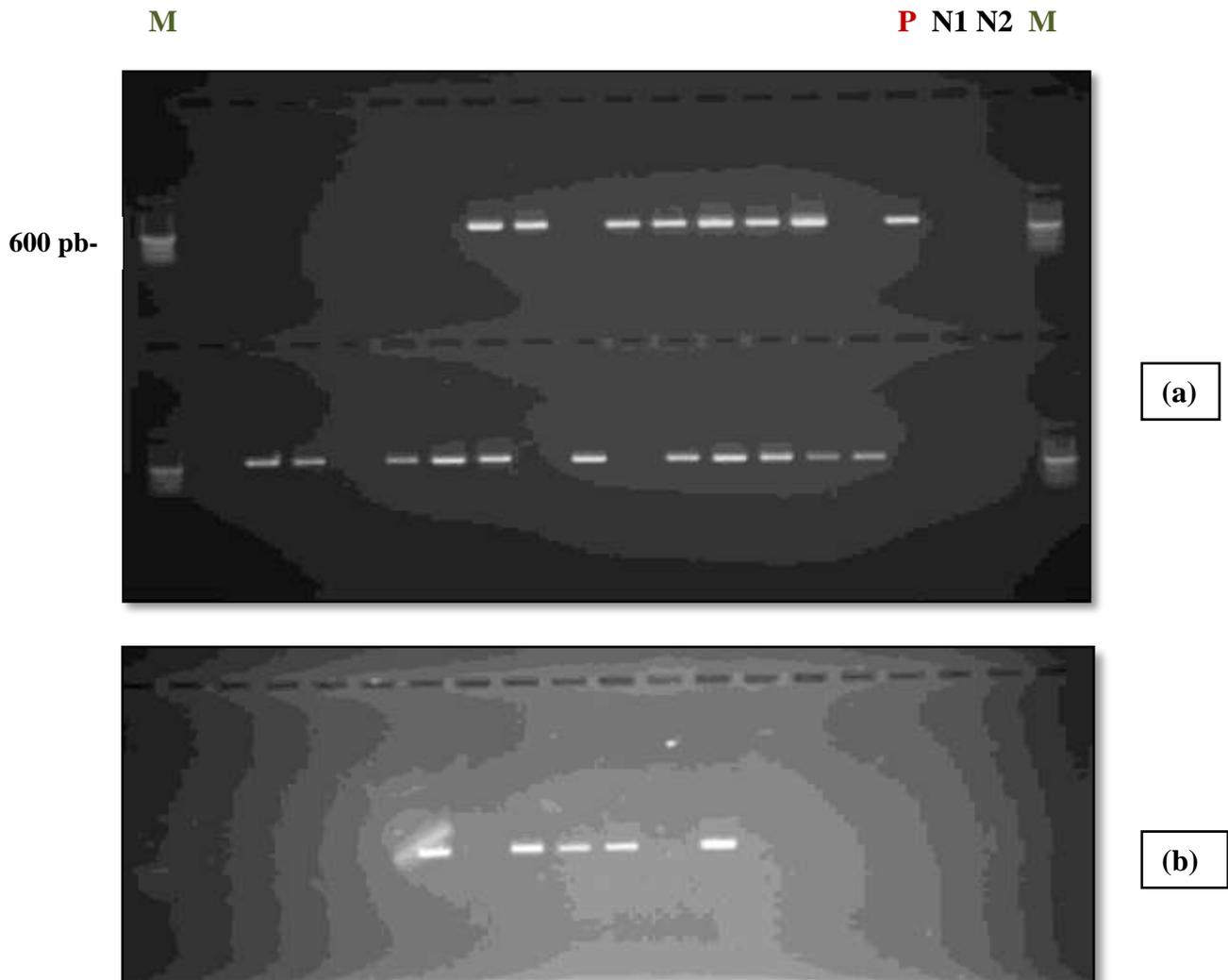
La préparation directe des frottis de selles ou l'utilisation d'un sédiment de technique éther formique pour la préparation des frottis et l'application de la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée est une méthode ordinaire pour le diagnostic de l'oocyste *Cryptosporidium* en microscopie [**NEVA et BROWN, 1994; FAYER et al., 2000; AKAM et al., 2004**] mais la présence des autres micro-organismes dans les fèces comme la levure et *Cyclospora* rend la détection de *Cryptosporidium* difficile [**PRAKRITI et al., 2012; BIDEROUNI et SALEHI, 2014**].

L'inconvénient de cette technique est la nécessité d'au moins 50 000-500 000 d'oocystes /g de selles pour la détection, ce qui nécessite à rechercher une nouvelle méthode, capable de détecter moins d'oocystes /g de selles et des résultats plus fiables [**ANONYMOUS, 1996**].

L'amplification par PCR semble être un choix évident pour améliorer la détection de *Cryptosporidium* dans les fèces en raison de sa sensibilité et ses performances faciles [**KEHL et al., 1995**].

II.2.1.2.2. PCR nichée sur le gène de l'ARNr 18S de *Cryptosporidium*

L'amplification par PCR nichée d'un fragment d'ARNr de SSU a entraîné l'identification de 24 échantillons positifs (36,36%) (**Figure 20**).



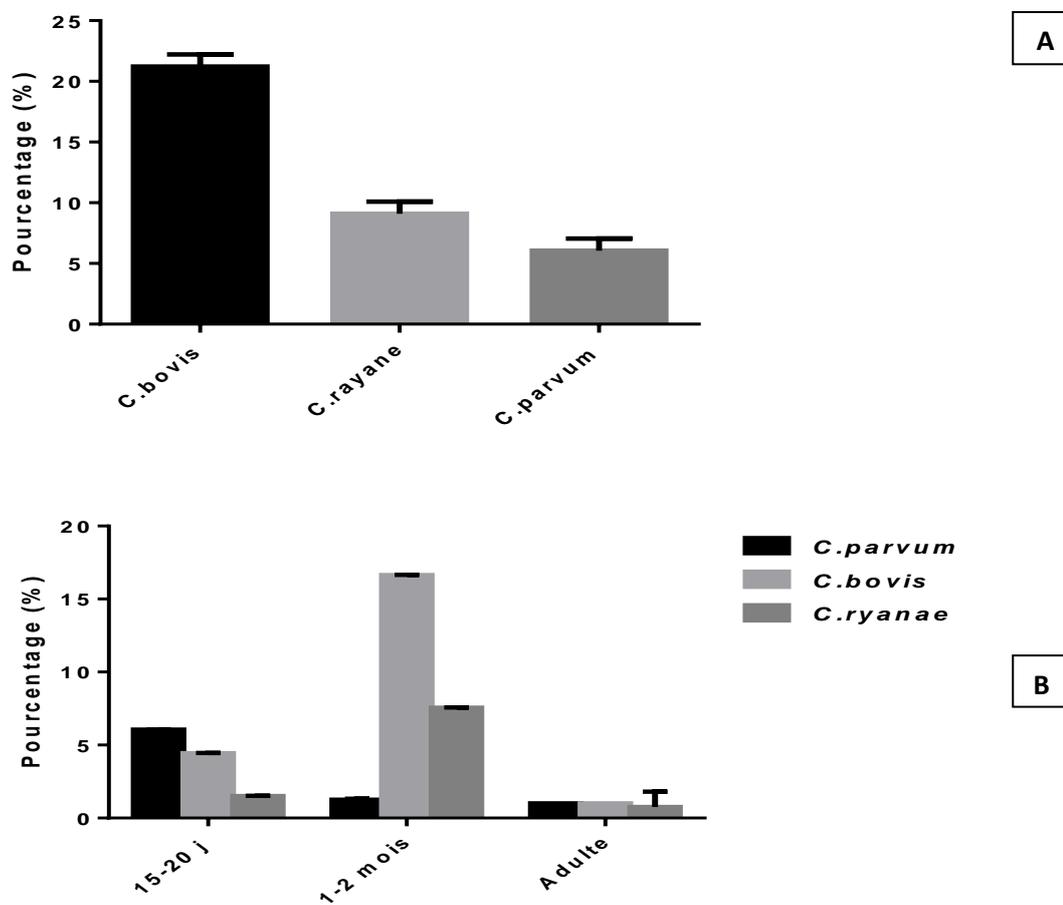
P= contrôle positif. N1=contrôle négatif-1, N2 = contrôle négatif-2.

M : marqueur moléculaire de 100pb

Figure 20. Résultats de la PCR nichée pour *Cryptosporidium* (24 cas positifs).

Au niveau des fermes 14 à 17, il y a au moins un échantillon positif par PCR (**Tableau 12**), ce qui suggère une prévalence de 82% au niveau du troupeau et de 18% (24 sur 132) veaux examinés.

II.2.1.2.3. Répartition des résultats des analyses moléculaires selon l'âge



Les résultats sont comparés par test ANOVA 1 (A) et ANOVA 2 (B) * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$, *** $P \leq 0,0001$.

Figure 21. Les différentes espèces de *Cryptosporidium* et leurs fréquences. (A) Taux d'infection avec les différentes espèces de *Cryptosporidium* spp. chez les veaux. (B) Distribution de *C. parvum*, *C. bovis* et *C. ryanae* selon l'âge.

Cryptosporidium bovis est l'espèce la plus fréquemment identifiée, responsable pour (21,21%) de toutes les infections à *Cryptosporidium* suivi par *C. ryanae* (9,09%) et *parvum* (6,06%) mais avec une différence significative entre *C. bovis* et les autres ($P \leq 0.0001$) et une différence entre *C. ryanae* et *C. parvum* ($P \leq 0,05$) (**Figure 21 A**).

Nous avons constaté qu'il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) observée entre les taux d'infection par *C. parvum* et *C. bovis* chez les bovins adultes (>2 mois) mais dans l'âge entre 15-20 j *C. parvum* est l'espèce la plus répandue par rapport à *C. bovis* et *C. ryanae* avec une différence très significative ($P > 0,0001$) (**Figure 21 B**).

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

En revanche, *C. bovis* est détectée avec une grande valeur (16,65 %) chez les animaux de 1- 2 mois qui est très significativement élevée ($P \leq 0.0001$) par rapport aux taux des deux autres parasites.

C. bovis était plus commun chez les veaux âgés 1-2 mois ($n = 11$) que chez ceux âgés de 15-20 jours ($n = 3$) avec une différence significative ($P \leq 0,0001$).

II.2.1.2.4. Répartition des résultats des analyses moléculaires selon le sexe

Tableau 17. Prévalence de *Cryptosporidium* chez les bovins selon le sexe de l'animale dans la Wilaya de BATNA.

Nombre d'échantillons	Male	Femelle
Nombre testé	21	45
Nombre infecté	7	17
Pourcentage positive	33,33%	37,77%

Valeur $\chi^2 = 0,057^{NS}$ NS: non significatif ($P=0,81$)

Selon nos résultats obtenus, le taux de *Cryptosporidium* chez les mâles (33.33 %) contre (37.77%) chez les femelles, sans différence significative ($\chi^2 = 0.057$; $P > 0.05$) (**Tableau 17**).

Donc le sexe de l'animal ne semble pas une influence sur le taux de prévalence de l'infection par *Cryptosporidium* chez les bovins laitiers de l'est de l'Algérie.

Les veaux mâles et femelles sont également sensibles et il n'y a pas de changement significatif dans la prévalence.

Nos résultats de la présente étude sont similaires à ceux qui sont obtenus avec **DĀRĀBUS et al. (2001)**; **AKAM et al. (2002)**; **AKAM et al. (2004)**; **KARANIS et al. (2010)**; **AKAM et al. (2007)** et **VENU et al. (2013)**.

Une étude faite par **SQUIRE et al. (2013)**, ce dernier a trouvé qu'il n'a y pas de différence significative d'infection entre bovins femelles et mâles, comme l'ont indiqué d'autres auteurs [**MALLINATH et al., 2009**; **AYINMODE et FAGBEMI, 2010**].

II.2.1.2.5. Sous type de *Cryptosporidium*

L'amplification par PCR Nichée d'un fragment du locus gp60 et le séquençage des amplicons a révélé le sous-type IIAA13G2R1 de *C. parvum* chez deux animaux de la même ferme. Les séquences étaient identiques à la séquence de GenBank KF008184. Ce sous-type est retrouvé chez les veaux en

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

Turquie [TAYLAN-OZKAN *et al.*, 2016], au Canada [TROTZ-WILLIAMS *et al.*, 2006], en Belgique [GEURDEN *et al.*, 2007] et aux Pays-Bas [WIELINGA *et al.*, 2008] et chez les humains ayant du VIH / SIDA en Malaisie [IQBAL *et al.*, 2012] et aux États-Unis [HERGES *et al.*, 2012].

En Algérie, le séquençage du gène gp60 a montré que trois échantillons positifs de *C. parvum* chez des agneaux avaient le sous-type IIA13G2R1, malgré qu'il n'a pas signalé précédemment chez les moutons indiquant qu'il s'agit probablement d'un agent pathogène zoonotique dans un large éventail de domaines [BAROUDI *et al.*, 2018].

En Tunisie, les sous-types de *C. parvum* IIA15G2R1 et IIA16G1 sont identifiés chez les veaux et les enfants d'une région rurale du nord du pays [RAHMOUNI *et al.*, 2014].

Une étude réalisée à Maryland (États-Unis) sur des échantillons de veaux pré-sevrés, une PCR nichée d'un fragment du gène gp 60 a révélé que le sous-type IIA15G2R1 est présent dans tout les échantillons [SANTIN *et al.*, 2008].

Une autre étude en Tunisie a identifié *C. hominis*, *C. parvum* et *C. meleagridis* chez les personnes immunocompétentes et immunodéprimées, principalement les enfants. Par conséquent, les espèces zoonotiques et anthroponotiques sont responsables de l'infection humaine dans ces régions [ESSID *et al.*, 2008].

Dans la présente étude, nous apportons les premières informations sur la prévalence et le génotypage des espèces de *Cryptosporidium* chez les jeunes veaux (< 2 mois) que celle ci est élevée dans les petites fermes traditionnelles dans le Nord-est de l'Algérie.

Un des plus outils de sous-typage commun est l'analyse de séquence d'ADN de la glycoprotéine de 60 kDa (gp60, également connu sous le nom de gp40 /15). La plupart de l'hétérogénéité génétique dans ce gène est la variation du nombre de répétition tri-nucléotidique (TCA, TCG ou TCT) dans l'extrémité 5 '(gp40) de la région codante, bien que le polymorphisme de séquence est également présent dans le reste de gène. Le polymorphisme est utilisé pour définir le sous-type de familles au sein d'une espèce [FENG *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014].

L'analyse de la séquence du gène gp60 est largement utilisée dans le sous-typage de *Cryptosporidium* en raison de son hétérogénéité de séquence et de la pertinence à la biologie parasitaire. C'est le marqueur polymorphe le plus simple identifié jusqu'à présent dans le génome de *Cryptosporidium* [GATEI *et al.*, 2006; LEONI *et al.*, 2007; WIELINGA *et al.*, 2008; XIAO, 2010].

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

Le gp60 est situé sur la surface de la région apicale des stades invasifs du parasite, et est l'une des cibles dominantes pour neutraliser les réponses d'anticorps chez l'être humain [O'CONNOR *et al.*, 2007].

Ainsi, il est possible de lier des produits biologiques caractéristiques des parasites et des présentations cliniques avec l'identité de la famille du sous-type. Certaines familles de sous-types de *C. parvum*, tels que IIda et IId, se trouvent chez les humains et les ruminants, responsables de la cryptosporidiose zoonotique. Dans les zones à la fois avec IIda et IId, comme en Espagne, les sous-types IIda infectent préférentiellement les veaux alors que les sous-types IId infectent préférentiellement les agneaux et les chevreaux [QUILEZ *et al.*, 2008 A, B; XIAO, 2010].

Une étude faite par WANG *et al.* (2011) sur 67 échantillons positifs après séquençage de gène gp60, ils ont pu détecter un seul sous-type (IIdA19G1). En général, le sous-type IId n'est pas aussi commun que le sous-type zoonotique majeur famille IIda [XIAO, 2010]. Ainsi, seulement en Hongrie (IIdA19G1 et IIdA22G1), Belgique (IIdA22G1), Portugal (IIdA17G1), Espagne (IIdA23G1), Suède (IIdA20G1e, IIdA23G1, et IIdA16G1c), l'Allemagne (IIdA22G1), l'Égypte (IIdA20G1), et Serbie et Monténégro (IIdA18G1b), sont des sous-types isolés chez un petit nombre de veaux laitiers [PLUTZER et KARANIS, 2007; MISIC et ABE, 2007; BROGLIA *et al.*, 2008; QUILEZ *et al.*, 2008 B; AMER *et al.*, 2010; SILVERLA`S *et al.*, 2010; XIAO, 2010]. En outre, la famille sous-type IId de *C. parvum* est fréquente principalement chez les moutons et des chèvres dans l'Europe du Sud [QUILEZ, 2008 B].

La cryptosporidiose chez les bovins et les humains est principalement causée par *C. parvum* [SUNNOTEL *et al.*, 2006 A]. Selon DIAZ-LEE *et al.* (2011), les autres espèces de *Cryptosporidium* qui infectent les bovins sont *C. andersoni*, *C. bovis*, *C. ryana* et *C. parvum*. Cette dernière espèce est la plus fréquente qui infecte l'épithélium gastro-intestinal de la plupart des mammifères hôtes, cette espèce provoque une sévère entérite avec une morbidité et une mortalité importante chez les jeunes veaux, les enfants et les personnes immunodéprimées telles que les sidéens.

Il a été montré que la PCR a une grande spécificité, tels que la PCR ARNr 18S, amplifient sélectivement les espèces de *Cryptosporidium* [CAMA *et al.*, 2006].

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

L'identification de *C. bovis* et *C. ryanae* comme principales espèces de *Cryptosporidium* trouvées chez les bovins post-sevrés [GEURDEN *et al.*, 2007; FAYER *et al.*, 2008]. Ces deux espèces ne sont pas trouvées ni chez les humains ni chez les bovins malades [FAYER *et al.*, 2008].

Dans notre étude, *C. ryanae* a une prévalence faible de (6,06%), et répondu chez les veaux de 1-2 mois.

Les bovins en États-Unis infectés par *C. ryanae* étaient géographiquement répandus, couvrant une distance globale de plus de 2100 km, dans des fermes offrant une large gamme de conditions climatiques, de sol et de gestion [SANTI'N *et al.*, 2004; FAYER *et al.*, 2006].

SANTI'N *et al.* (2004) a pu enregistrer un faible taux de *C. ryanae* chez les veaux pré-sevrés et sevrés (2 vs 7,6%) respectivement.

Dans une étude longitudinale effectuée sur 30 veaux âgés entre 3 jours à 2 ans 60% sont infectés avec *C. ryanae* [SANTI'N *et al.*, 2008].

Dans une autre étude, *C. ryanae* a été détectée chez les veaux âgés de 2 semaines à 16 mois mais avec un taux élevé chez les veaux de 18-20 semaines [GEURDEN *et al.*, 2007; SANTI'N *et al.*, 2008].

DE GRAAF *et al.* (1999) a prouvé que les veaux infectés par *Cryptosporidium* sont souvent des diarrhéiques.

Dans une étude à Iran, la détection de *Cryptosporidium* est faite par la technique de PCR d'ARNr 18S car la PCR classique était incapable de détecter l'infection par ce parasite, la PCR nichée avec des amorces d'ARNr 18S internes était capable de reconnaître l'infection [BAIRAMI *et al.*, 2011]. L'avantage de cette technique est préconisé lors d'une faible infestation. En effet, la PCR nichée a permis de détecter *Cryptosporidium* dans tous les échantillons infectés par ce parasite, donc la sensibilité de l'analyse par PCR niché par rapport à l'analyse microscopique était de 100%.

La méthode moléculaire peut être utile dans les études épidémiologiques sur la cryptosporidiose ainsi que dans les études environnementales et la recherche des parasites dans les sources d'eau [MORGAN et THOMPSON, 1998 ; FRICKER et CRABB, 1998; XIAO, 2010; BAIRAMI *et al.*, 2011].

Il existe plusieurs facteurs qui compliquent la détection de *Cryptosporidium* par PCR dans les selles par exemple la fixation standard dans la formaline tamponnée à 10% peut réduire la sensibilité

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins)

de la PCR surtout si la fixation se produit sur une période prolongée [WIDMER, 1998; MORGAN et THOMPSON, 1998; CLARK, 1999].

La PCR peut être inhibée par de nombreuses substances, y compris certains composants des selles. Plusieurs chercheurs ont mis au point des méthodes d'extraction des acides nucléiques pour les selles afin d'éliminer ces inhibiteurs. Malheureusement, beaucoup de ces méthodes sont assez complexes, et des études comparatives détaillées n'ont pas été réalisées pour identifier la technique la plus utile [CLARK, 1999; PRAKRITI *et al.*, 2012].

Les outils de diagnostic basés sur d'autres gènes étaient populaires auparavant, mais leur utilisation dans le génotypage de *Cryptosporidium* a été diminuée dans les années récentes. Ainsi, des outils basés sur le gène de la protéine de la paroi d'oocyste (COWP) ont été utilisés dans 23 des 116 publications originales (généralement en combinaison avec des outils basés sur l'ARNr SSU) et d'autres gènes rarement utilisés [GOMEZ-COUSO *et al.*, 2005; MEAMAR *et al.*, 2007].

Les outils de PCR basés sur ces gènes en général ne font qu'amplifier l'ADN de *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis* et espèces / génotypes étroitement apparentés à *C. parvum*. Les études qui ont utilisé ces outils sur l'humain, l'animal et l'environnement ont généralement montré moins des espèces et génotypes de *Cryptosporidium* [WOLSKA-KUSNIERZ *et al.*, 2007; BAJER *et al.*, 2008; DURANTI *et al.*, 2009; GIANGASPERO *et al.*, 2009].

Les outils de sous-typage ont été largement utilisés dans les études de la transmission de *C. hominis* chez l'homme, *C. parvum* chez les humains et les ruminants, et quelques autres espèces apparentées de *Cryptosporidium* telles que *C. meleagridis* et *C. ubiquitum* chez les humains et animaux [XIAO, 2010; LI *et al.*, 2014].

Conclusion

- Dans notre étude 132 échantillons fécaux diarrhéiques des veaux qui sont collectés à partir de 17 fermes laitières de la province de Batna, située au Nord-Est d'Algérie.
- Les échantillons sont examinés microscopiquement en utilisant la méthode de Ziehl–Neelsen modifiée, et au moins un échantillon par ferme a été soumis à analyse moléculaire.
- L'analyse par PCR nichée du gène de l'ARNr 18S de 66 échantillons a donné 24 cas positif avec une prévalence de (36,36 %).
- Après séquençage nous avons identifié seulement trois espèces, *Cryptosporidium bovis* (n = 14), *C. ryanae* (n = 6) et *C. parvum* (n = 4).
- Un sous-type zoonotique peu répandu, a été identifié par séquençage d'un fragment du gène gp60 dans deux isolats d'une seule ferme a donné le sous-type IIaA13G2R1 de *C. parvum*.
- Concernant les résultats des analyses moléculaires en rapport avec l'âge des bovins où *C. parvum* se retrouve surtout chez les veaux entre 1-15 jours, *C. bovis* et *C. ryanae* sont plus fréquents chez les veaux de 1-2 mois.
- En conclusion, nos résultats suggèrent que les bovins peuvent jouer un rôle prépondérant dans le maintien de la circulation des espèces de *C. parvum*.

2.

GLARDIA

Introduction

La giardiase est une maladie diarrhéique majeure qui a été découverte dans le monde entier. Chez la plupart des mammifères, la giardiase est causée par *Giardia intestinalis*.

Des recherches sur *G. intestinalis* chez le bétail, en particulier les bovins, ont montré que le parasite est très commun dans cette population et infecte beaucoup plus les jeunes veaux, ce qui entraîne une forte prévalence de l'infection dans les troupeaux [SNEL *et al.*, 2009; MARK-CAREW *et al.*, 2010]. Les veaux sont infectés par *G. intestinalis* dès l'âge de quatre jours et ont la plus forte intensité d'excrétion de kyste (10^5 - 10^6 kystes /g) entre l'âge de 4-12 semaines [RALSTON *et al.*, 2003].

D'après BJORKMAN *et al.* (2003) *G. intestinalis* est un agent étiologique des maladies diarrhéiques chez les bovins mais il est souvent lié à un autre parasite intestinal commun, *Cryptosporidium*.

En Algérie, plus particulièrement la région Est, une seule étude épidémiologie classique a été menée par OUCHENE *et al.* (2012,2014) et BENHASSINE *et al.* (2016) dans la région de la steppe central.

En revanche, la seule étude moléculaire a été faite par BAROUDI *et al.* (2017).

L'objectif de notre travail est de déterminer la prévalence d'excrétion de *Giardia* spp. chez les veaux dans 17 élevages situés dans la région de Batna au nord-est de l'Algérie.

II.2.2.1. Matériel et méthodes

II.2.2.1.1. Recueil et traitement des échantillons fécaux

132 échantillons fécaux des bovins sont récoltés pour l'étude moléculaire de *Giardia*. Ces prélèvements sont traités par la technique de coloration au lugol après une application préalable de la méthode d'enrichissement de Ritchie simplifiée par ALLEN et RIDLEY (1970).

Seuls 66 des échantillons sont retenus pour l'analyse moléculaire.

II.2.2.1.2. Concentration des selles pour l'étude moléculaire

La concentration des selles est faite selon la même méthode décrite pour *Cryptosporidium*.

II.2.2.1.3. Extraction de l'ADN à partir des échantillons fécaux (Kit QIAamp Qiagen, Hilden, Allemagne).

L'extraction de l'ADN est faite pour *Giardia* dans les échantillons fécaux en utilisant un kit disponible dans le commerce (ADN QIAamp™ Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fabricant.

II.2.2.1.4. Amplification de l'ADN par PCR

II.2.2.1.4. 1. PCR nichée sur le gène β -giardine de *Giardia*

A. Principe du test

Les Giardines sont définis comme une famille de protéines structurales ayant une taille d'environ 29-38 kDa avec une structure hélicoïdale [HOLBERTON *et al.*, 1988]. Les protéines se trouvent sur les bords des microrubans (ou rubans dorsaux), qui font partie intégrante du disque ventrale du trophozoïte [ADAM, 2001].

Plusieurs gènes, codant pour α 1-giardine, α 2-giardine, β -giardine et γ -giardine, ont été clonés [AGGARWAL *et al.*, 1989, ALONSO et PEATTIE, 1992, NOHRIA *et al.*, 1992]. L'avantage d'utiliser des gènes de giardines comme cibles pour la détection moléculaire des kystes de *Giardia* est qu'ils sont considérés comme spécifiques de ce parasite [FAUBERT, 2000].

En effet, le test PCR développé par MAHBUBANI *et al.* (1992), basé sur l'amplification d'un fragment de 218 pb du gène β -giardine, était hautement spécifique, et aucune amplification croisée n'a été observée en utilisant l'ADN hôte, protozoaire, fongique ou bactérien [CACCIO *et al.*, 2002].

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

B. Préparation des mélanges réactionnels

Préparation est faite de la même manière de préparation des mélanges réactionnels que celle décrite dans la PCR 18S nichée pour *Cryptosporidium*.

a. Contrôles positifs

- Contrôle positif de PCR primaire : ADN de *Giardia*.
- Contrôle positif de PCR secondaire : Produit de contrôle positif de PCR primaire.

b. Contrôles négatifs

- Contrôle négatif de PCR primaire : eau distillée.
- PCR secondaire : le même contrôle négatif de PCR primaire.

C. Amorces utilisées :

- Amorces de la première PCR pour le gène complet :

Avant (gp15ATG) :5'-CGGGATCCATATGAGATTGTCGCTCATTATC-3'

Inverse (gp15STOP) :5' -GGAATTCTTACAACACGAATAAGGCTG -3'

- Amorces de la deuxième PCR pour un fragment de ~300 pb :

Avant : 5' -GCCGTTCCACTCAGAGGAAC-3'

Inverse : 5'- CATTACAAATGAAGTGCCGCA-3'

D. Exécution du test PCR

La PCR est faite de la même façon que la PCR 18S, la seule différence pour *Cryptosporidium* seul réside dans la température et le temps de la réaction qui figure dans le **tableau 18** [DURANTI *et al.*, 2009].

Tableau 18. Programmation du thermocycleur (temps et températures) en PCR sur le gène de Beta-giardine.

	Etapes	Temps / Températures
Cycle d'amplifications (répétées 35 fois)	Dénaturation initiale	5mn/ 94 C°
	Dénaturation	30s / 94 C°
	Hybridation des amorces	30s / 53 C°
	Elongation	60s / 72 C°
	Elongation finale	7 mn/ 72 C°

E. Révélation

Nous avons réalisé la même technique de révélation utilisée dans la PCR 18S pour *Cryptosporidium*.

II.2.2.1.5. Tests statistiques

Les données obtenues par PCR nichée ont été classées en fonction de l'âge et du sexe. Les résultats de la présente étude ont été analysés par Graph pad prism 6, analyse χ^2 .

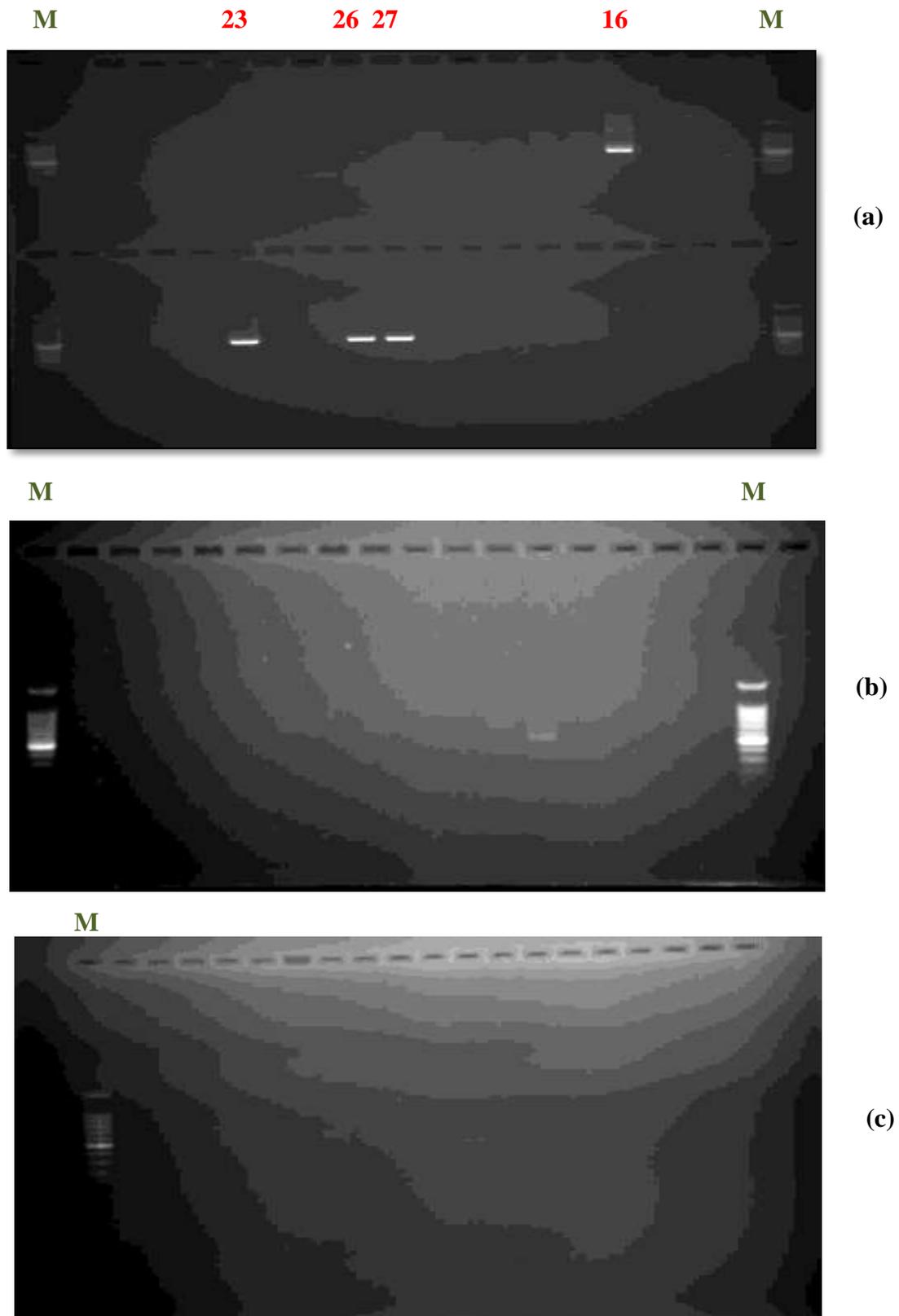
II.2.2.2. Résultats et Discussion

II.2.2.2.1. Examen microscopique

L'analyse microscopique de *Giardia* par le lugol n'a révélé aucun cas positif dans les 17 fermes étudiées.

II.2.2.2.2. Etude moléculaire

Après l'analyse moléculaire, nous avons pu obtenir 4 échantillons positifs ($n = 4$) parmi les 66 échantillons examinés (**Figure 22 a, b, c**).



M : marqueur moléculaire de 100 pb.

(Lignes 23, 26, 27 et 16 échantillons positive).

Figure 22. (a),(b),(c) Résultats de la PCR nichée pour *Giardia* (4 cas positifs).

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

On peut expliquer l'absence de *Giardia* après coloration au lugol et après l'immunofluorescence et leur présence après PCR par l'excrétion intermittente de *Giardia*.

II.2.2.2.3. Prévalence et distribution de *Giardia* en fonction de l'âge par analyse PCR

Tableau 19. Variation de la prévalence et distribution de *Giardia intestinalis* en fonction de l'âge, après analyse par PCR.

Âge	<i>Giardia intestinalis</i> (%)
15-20 jours	00
1 à 2 mois	4 (6,06 %)*
> 2 mois	00
Totale	04 (6,06%)

Valeur $\chi^2 = 8,16$, * différence significative ($P \leq 0,05$)

En se basant sur les résultats de l'analyse de PCR, le taux d'infection de *Giardia intestinalis* est de 6,06 %.

Nous avons trouvé que seuls les veaux de 1-2 mois excrètent *Giardia intestinalis* d'une façon significative ($\chi^2 = 8,16$, $P \leq 0,05$) en comparaison avec ceux âgés de 15-20 j et plus de 2 mois (**Tableau 19**).

La prévalence globale de *Giardia* retrouvée par PCR chez les bovins se révèle plus importante que celle par les méthodes microscopiques. *Giardia intestinalis* est identifiée seulement chez les veaux âgés entre 1 et 2 mois (6,06%), avec cependant, une absence par les autres tranches d'âges (**Tableau 15**).

Cette étude souligne la présence de *G. intestinalis* chez les bovins dans la zone de BATNA Nord-Est d'Algérie. La prévalence de l'infection enregistrée pour ce parasite est faible (6,06%) comparativement celle trouvée par **BAROUDI et al. (2015)** (21%), on peut interpréter cet écart entre les résultats actuels et précédents par la variation de l'état environnemental et les caractéristiques des localités d'étude, et le nombre de gènes recherchés par la PCR.

Des études récentes ont indiqué que les bovins ne devraient pas être considérés comme source de la giardiase humaine [**CACCIO et al., 2005**, **GEURDEN et al., 2008**].

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

Dans le présent travail, l'excrétion des kystes de *Giardia* spp. a commencé dès l'âge de 1 à 2 mois. Cependant, beaucoup d'études restent controversées sur cette question.

Une étude qui a été faite à Sétif par **OUCHENE *et al.* (2012)** au nord-est de l'Algérie montre que l'excrétion des kystes de *Giardia* spp. a commencé dès l'âge de 8 jours avec une prévalence plus élevée chez les veaux âgés de 4 à 12 mois et ces résultats sont désaccord avec nos résultats.

II.2.2.2.4. Prévalence et distribution de *Giardia* en fonction du sexe après analyses par PCR

Tableau 20. Variation de la prévalence et distribution de *Giardia intestinalis* en fonction de sexe, par PCR

Nombre d'échantillons	Mâle	Femelle
Nombre testés	21	45
Nombre infectés	3	1
Pourcentage (%)	14,28	2,22

Valeur $\chi^2 = 3,66$

^{NS} non significatif ($P > 0,05$)

La prévalence de *Giardia* en fonction du sexe a montré une fréquence de 14.28 % (pour les 3 veaux laitiers mâles) sur 21 testés contre 1 velle (2,22 %) parmi 45 individus testés.

Statistiquement, aucune différence significative n'a été observée ($\chi^2 = 3,66$, $P > 0,05$) entre le taux de prévalence chez les mâles et les femelles (**Tableau 20**).

Selon nos résultats obtenus le sexe n'a pas influencé sur la prévalence de *Giardia* par contre **STUART *et al.* (2003)** a trouvé que le sexe est un facteur de risque important pour la détection de *Giardia intestinalis*, avec une prévalence élevée chez les veaux que les velles, donc, la variation de l'excrétion fécale de *Cryptosporidium* et de *Giardia* diffère selon l'âge et le sexe est peut être due soit à des sources de nourriture, l'habitat et le système immunitaire.

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

II.2.2.2.5. Association de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp., retrouvée par analyse PCR

Tableau 21. Prévalence des infections parasitaires par analyse de PCR selon le type d'infection.

Type d'infection (une seule infection ou association)	nombre	%
<i>Giardia</i> spp.	4	6,06
<i>Cryptosporidium</i> spp.	24	36,36***
<i>Giardia</i> + <i>Cryptosporidium</i>	2	3,03

*Valeur $\chi^2 = 34,89^S$, ***(P≤0,0001)*

Sur 66 échantillons fécaux testés par PCR, seulement deux cas (3,03%) ont excrété des kystes de *Giardia* spp. contre les 24 cas pour *Cryptosporidium* spp.

En outre, l'infection par *Cryptosporidium*, nous avons trouvé 24 cas positif (36,36%) c'est-à-dire *Cryptosporidium* spp., cette prévalence a été très significativement élevée par rapport à celle de l'excrétion de kystes de *Giardia* spp. ($\chi^2 = 34,89^S$, $P \leq 0,0001$) (**Tableau 21**).

Le mécanisme exact menant à la giardiase est inconnu mais la recherche indique une combinaison entre l'osmose, la sécrétion active, l'exsudation, l'inflammation et la motilité altérée en tant que moteurs de la diarrhée induite par *Giardia* [**LEJEUNE et al., 2011**].

En termes moléculaires, la perturbation, l'expression réduite et ou la délocalisation des protéines TJ et du cytosquelette (telles que ZO-1, claudin-1, F-actine et α -actinine) se traduisent par une augmentation de la perméabilité intestinale et une baisse du TER. , indiquant que l'infection peut provoquer une fuite paracellulaire (diarrhée exsudative) [**BURET, 2008**].

Les événements menant à cette classe de diarrhée sont similaires à la cryptosporidiose et à l'amibiase. En conséquence, une perturbation d'une protéine dite zonula occludens ZO-1 a été rapportée dans des cellules coliques infectées par *Cryptosporidium* tandis que dans les cellules infectées par *E. histolytica*, une dégradation des protéines TJ (protéine-jonction serrée) ZO-1 et ZO-2, une déphosphorylation de ZO-2 et la délocalisation de claudin-4 étaient sous-jacentes à la diarrhée exsudative [**BURET, 2008**].

Cependant, *Giardia* provoque la dégradation de la TJ sans pénétrer dans l'épithélium et *E. histolytica* tue (par apoptose et trogocytose), envahit et détruit les tissus de l'hôte [**LEROY et al., 2000; LEJEUNE et al., 2011**].

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

Un individu infecté libère des kystes microscopiques avec les selles et des vésicules intermittentes peuvent être perdues pendant plusieurs semaines [XIAO et HERD, 1994].

Les infections par le rotavirus et le coronavirus sont des causes bien connues de diarrhée aiguë chez les jeunes veaux, qui se produisent généralement chez les veaux âgés de 1 à 3 semaines [MEBUS *et al.*, 1973; SAIF *et al.*, 1994].

Le tableau clinique est similaire à celui de la cryptosporidiose et comprend la diarrhée, la dépression, l'anorexie et la fièvre légère. Dans plusieurs enquêtes, le rotavirus a été détecté dans l'entérite néonatale [SNODGRASS *et al.*, 1986; BJÖRKMAN *et al.*, 2003].

D'autres agents infectieux comme *Eimeria* spp., bredavirus, calicivirus, astrovirus, parvovirus, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* sont également signalés comme pathogènes dans la diarrhée néonatale du veau [TZIPORI, 1981].

La présentation clinique de l'infection par *Giardia* varie d'un état de porteur asymptomatique à une maladie grave associée à une malabsorption des graisses et à une intolérance au lactose due à un déficit en disaccharidases [GARDNER et HILL, 2001; BURET, 2008].

Dans le présent travail, une association des deux protozoaires *Giardia* spp. et *Cryptosporidium* spp. a été constatée avec un taux de 3,03% mais ce pourcentage est inférieur par rapport aux résultats observés par OUCHENE *et al.* (2012) qui a trouvé 10,2 %.

Certains lieux de vie comme les collectivités (chenils, élevages, animaleries) constituent un facteur de risque important et encouragent la forte contagiosité du parasite. Par ailleurs, là où la pression d'infection est forte, les troubles observés sont souvent le résultat d'une association avec d'autres pathogènes, parasitaires ou viraux [FRANC *et al.*, 1997].

D'après nos résultats, malgré la présence de diarrhée dans 60 % des cas où la présence des agents parasitaires n'a pas été relevée, cet étiologie peut être due à la présence des virus et/ou des bactéries, il ne faut pas écarter la trace des étiologies alimentaires [LEFAY *et al.*, 2000; AKAM *et al.*, 2004; AYANA et ALEMU, 2015].

Conclusion

- L'étude de la présence de *Giardia* spp. dans 132 échantillons fécaux provenant de 17 élevages a permis de déceler une faible fréquence de ce parasite dans la région de BATNA;
- Aucun échantillon fécal ne s'est révélé positif à l'examen coproscopique par le lugol.
- Les méthodes moléculaires ont été appliquées sur 66 échantillons fécaux ce qui permis de mettre en évidence 4 cas d'infestation (6,06 %).
- L'identification moléculaire de *Giardia* spp. chez les bovins est considérée la première en l'occurrence dans la région Est d'Algérie, laisse supposer que cet animal porte fortement le génotype pathogène et potentiellement zoonotique.
- *Cryptosporidium* spp. est excrété beaucoup plus et qui a été constatée notamment chez les veaux âgés de 15 à 30 jours, alors que *Giardia* spp. a été excrétée par les veaux de 1 à 2 mois.
- L'excrétion concomittente de *Cryptosporidium* et de *Giardia* chez les veaux diarrhéiques n'a été décelée que chez deux sujets.
- Le sexe semble avoir une influence sur l'excrétion de *Giardia* chez les jeunes bovins avec un taux élevé chez les veaux mâles que les veaux femelles.
- D'autres études moléculaires plus élargies seront indispensables pour évaluer la prévalence réelle de ce protozoaire pathogène et de ses assemblages zoonotiques.

II.3.

RECHERCHE DES PARASITES INTESTINAUX CHEZ LES SOURCES ANIMÉS (BOVINS) PAR LES DEUX TECHNIQUES DE FLOTTATION

1.

TECHNIQUE DE FLOTAC

Introduction

Lors de suspicion épidémiologique (jeune animal, vie en collectivité) et/ou clinique (troubles digestifs : diarrhées; amaigrissement) de parasitose, la coproscopie demeure l'examen de choix pour mettre en évidence les éléments parasitaires [TROTZ-WILLIAMS *et al.*, 2005]. Les œufs de nématodes (tels ceux de *Toxocara* spp.) et les oocystes coccidiens sont aisément repérables par les techniques d'enrichissement.

Les kystes de *Giardia* ne sont plus reconnaissables du fait de leur petite taille et de leur confusion possible avec des débris végétaux [BJÖRKMAN *et al.*, 2003]. Pour les identifier, un œil expérimenté est nécessaire. La coloration au lugol aide leur mise en évidence ainsi que l'immunofluorescence. Cependant, cette dernière technique n'est disponible que dans les laboratoires spécialisés. Différents tests rapides utilisant la technique de flottation ou de sédimentation sont commercialisés pour mettre en évidence les éléments parasitaires dans les selles [CASEMORE, 1991; TULI *et al.*, 2010].

ABBAS *et al.* (2015) ont trouvé que l'infection chez les bovins en Algérie par *Cryptosporidium*, *Giardia* et *Eimeria* semble très importante. Et ces parasites sont observés aussi bien chez les jeunes veaux que les bovins adultes.

Cryptosporidium spp. affecte principalement les jeunes veaux de moins de 30 jours. Cependant, *Giardia* spp. et *Eimeria* spp. frappent les veaux plus âgés, de (1 à 12 mois) [AKAM *et al.*, 2004].

La technique du FLOTAC est une nouvelle méthode de flottation. Son principe se repose sur la centrifugation des selles dans une solution de flottation (FS) à densité précise et l'examen microscopique de la partie supérieure de la suspension fécale permet de détecter la présence d'œufs d'helminthes et les kystes des protozoaires intestinaux [BECKER *et al.*, 2011].

Le but de cette étude est la recherche des différents parasites dans les échantillons fécaux de bovins du nord-est de l'Algérie en utilisant la méthode FLOTAC [CRINGOLI *et al.*, 2013].

III.3.1. Matériel et méthodes

III.3.1.1. Site d'étude

La technique a été réalisée au niveau de laboratoire de parasitologie de département de pathologie et de santé animale, Faculté de médecine vétérinaire, Université Federico II, CREMOPAR, Napoli, Italy.

Les échantillons de selles sont collectés à partir de différentes régions de la Wilaya de Batna (Merouana, El Madher, Djerma, Arris, Ras El Aioun, Chemora, Aïn Yagout, Bouhmar), entre Mars 2015 à Mars 2016.

Au total, 174 échantillons fécaux des bovins âgés de 15 J jusqu'au 2 ans dont 96 diarrhéiques contre 78 non diarrhéiques sont collectés, puis traités au niveau du laboratoire de parasitologie et Mycologie de CHU de BATNA, en vue de recherche des oocystes de *Cryptosporidium* et autres parasites mais le reste des prélèvements sont conservés dans le bichromate de potassium à 2,5% à une température de 4°C pour l'analyse des parasites par la technique FLOTAC.

III.3.1.2. Technique FLOTAC

A. Principe

Cette technique utilise l'appareil appelée FLOTAC (**Figure 23**) et elle est basée sur la flottation avec centrifugation d'une suspension d'échantillon fécal et la lecture de la partie apicale de la suspension flottante. Le développement initial de cette méthode a été pris à partir d'autres techniques basées sur la flottation, en particulier les méthodes de McMaster et du Wisconsin. Cependant, une caractéristique principale de la technique FLOTAC, c'est qu'elle permet de compter les PEs (éléments parasitaires) dans de grandes aliquotes fécales (jusqu'à 1 g ou même des quantités plus élevées de matières fécales) [CRINGOLI, 2006].

Les techniques FLOTAC ont été initialement développées pour la parasitologie vétérinaire [CRINGOLI, 2006; LEVECKE *et al.*, 2009], puis pratiquées en parasitologie humaine [UTZINGER *et al.*, 2008].



Figure 23. Appareil FLOTAC

Selon **KNOPP *et al.* (2008; 2009a)**, les inconvénients des techniques FLOTAC ont été récapitulés récemment, un inconvénient est qu'un certain niveau d'infrastructure de laboratoire (par exemple centrifugeuse de grand volume ou centrifugeuse de paillasse avec rotor pour les plaques de FLOTAC) est requis pour la technique FLOTAC, qui souvent n'est pas disponible dans les ressources. De plus, comme pour les autres techniques de FEC basées sur la flottation, le choix du FS et du milieu de conservation pourrait influencer sur la performance des techniques FLOTAC et les soins sont indiqués avec certains matériaux en raison de la toxicité environnementale et humaine.

Donc, il convient de noter qu'à l'heure actuelle, l'appareil FLOTAC (composants, accessoires et manuels pour les humains, les chiens et les herbivores) n'est pas disponible dans le commerce, la description de l'appareil FLOTAC est développée dans **l'annexe 13**.

B. Exécution du FLOTAC

C'est une méthode récente de flottation qui s'appelle FLOTAC, nous avons suivi la méthode décrite par **CRINGOLI *et al.* (2010)**. Cette technique est appliquée sur 174 échantillons fécaux de 5g de chaque échantillon fécal puis on ajoute 45 ml de l'eau (dilutions au 1/10), après homogénéisation (l'utilisation d'un mélangeur à main est suggérée), le mélange est filtré à travers une passoire métallique (diamètre de pore : 250 μ m), après deux 6 ml de la suspension filtrée ont été pris et ont été mis dans deux tubes coniques (de 10 ml de volume). Les deux tubes sont ensuite centrifugés à 1500 rpm pendant 3 mn à la température ambiante. Après centrifugation, le surnageant a été rejeté. Puis nous avons ajouté 6 ml de deux différents FS dans les deux tubes contenant le culot, dans le premier (**FS 4** : Solution de Nitrate de Sodium (NaNO_3) 1.20) et dans le deuxième (**FS 7** : Sulfate de Zinc 1,35). Après homogénéisation des suspensions nous avons remplis les deux chambres de l'appareil de FLOTAC (**voir annexe 15**) avec les deux suspensions fécales : la première

chambre avec FS 4 et la deuxième avec FS 7. Après fermeture de l'appareil de FLOTAC, nous avons appliqué une centrifugation de 1000 rpm à 5 mn à la température ambiante. Après centrifugation, nous avons examiné sous microscope la partie flottante de la chambre de FLOTAC avec grossissement (G X 40) (Figure 24).

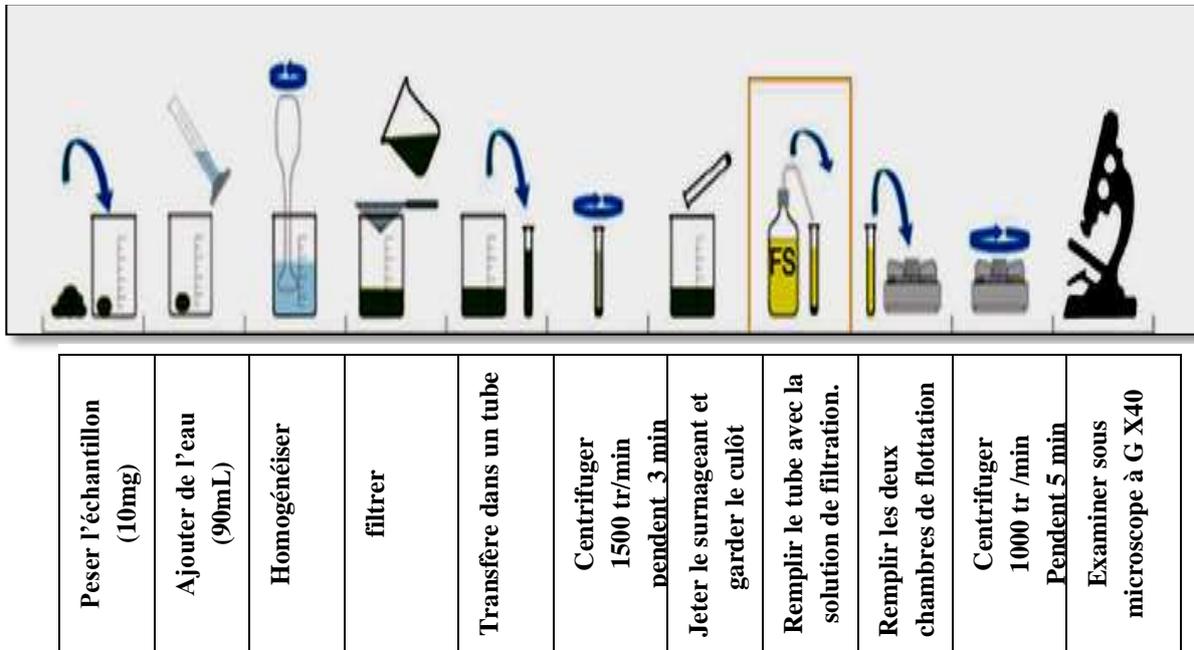


Figure 24. Différentes étapes de fonctionnement de la technique FLOTAC [CRINGOLI *et al.*, 2010].

III.3.1.3. Tests statistiques

Les résultats de la méthode FLOTAC ont été analysés par le GraphPad Prism 6, utilisant le test χ^2 , test Student (t) et Anova univarié suivie du test Dunnet /Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification.

Les valeurs de $P \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

III.3.2. Résultats et Discussion

III.3.2. 1. Identification des parasites dans les échantillons prélevés par la méthode FLOTAC

Nous avons réalisé la technique Dual Flotac-400 pour la recherche des protozoaires intestinaux, 174 échantillons de selles obtenus à partir de neuf fermes de la wilaya de Batna. La technique Flotac nous a permis d'isoler six types de parasites intestinaux : *Autres Protozoa*, *Eimeria* spp., *Strongle*, *Toxocara*, *Trichuris* et *Paramphistomum* spp. (Figure 25, 26, 27, 28 et 29).



Figure 25. Kyste de *Protozoaire*. observé par la technique de FLOTAC (GX 40).



Figure 26. Kyste d'*Eimeria* spp. observé par la technique de FLOTAC (GX 40).



Figure 27. Œuf de *Strongle* observé par la technique de FLOTAC (GX 40).



Figure 28. Œuf de *Toxocara* spp. observé par la technique de FLOTAC (GX 40).



Figure 29. Kyste de *Trichuris* spp. observé par la technique de FLOTAC (GX 40).

Nous avons constaté l'apparition d'un protozoaire intestinal mais il est mal connu (**Figure 25**), et peut être c'est un protozoaire connu mais il est déformé une fois soumis à la technique Flotac.

Divers facteurs peuvent affecter la précision des techniques copro-microscopiques basées sur la flottation, y compris le choix du conservateur et du FS [JEANDRON *et al.*, 2010; CRINGOLI *et al.*, 2010]. Dans notre étude cette déformation peut être à cause de la conservation dans le dichromate de potassium à 2,5% qui est un impact négatif potentiel des médias de préservation des selles et des FS sur les œufs fragiles comme les ankylostomes [KNOPP *et al.*, 2009a].

Malgré ces contraintes, la performance de diagnostic de la technique double Flotac -400 pour la détection des protozoaires intestinaux sont prometteurs [CRINGOLI *et al.*, 2010].

III.3.2.2. Prévalence des parasites par tranche d'âge par la méthode de FLOTAC

Tableau 22. Prévalence d' *Autres protozoaire*, *Eimeria* spp., *Strongle*, *Toxocara*, *Trichuris*, et *Paramphistomum* dans les selles des bovins.

Âge	N°. d' échantillon	Nombre d'animaux infectés (%)					
		<i>Autres Protozoaires</i>	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Strongle</i>	<i>Toxocara</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Paramphistomum</i>
15 -30 J	5	2(1,15)	3(1,72)	1(0,57)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
1-2 M	18	8(4,59)	12(6,89)	7(4,02)	1(0,57)	0 (-)	0 (-)
2 -5 M	43	13(7,47)	26(14,94)	11(6,32)	0 (-)	1(0,57)	2(1,15)
5 - 7 M	33	20(11,49)	16(9,19)	7(4,02)	1(0,57)	0 (-)	2(1,15)
7 - 11 M	23	18(10,34)	12(6,98)	6(3,44)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
12 –20 M	27	20(11,49)	14(8,04)	9(5,17)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
2 A	25	20 (11,49)	9 (5,17)	6 (3,44)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
(Adultes)							
Totale	174	101(58,04)	92(52,87)	47(27,01)	2 (1,15)	1(0,57)	4(2,34)

J:Jour ; M: Mois ; A: Année

La technique FLOTAC est une technique validée avec succès pour le diagnostic des helminthes et des protozoaires à la fois pour les animaux et les humains [GUALDIERI *et al.*, 2011].

La technique FLOTAC est une technique multivalente caractérisée par la sensibilité et la précision, initialement développée surtout pour la parasitologie vétérinaire mais récemment avec succès en parasitologie humaine [UTZINGER *et al.*, 2008; KNOPP *et al.*, 2009b; CRINGOLI *et al.*, 2010].

Selon les résultats obtenus, les veaux âgés de 15 j jusqu'au l'âge adulte excrètent: *Autres protozoaire*, *Eimeria* spp. et *Strongle* (Tableau 22). En revanche, *Eimeria* spp. et *Strongle* ont été trouvés chez les veaux après 15 jours et chez les adultes, mais *Toxocara*, *Trichuris* et *Paramphistomum* sont marqués absents (Tableau 22). Ces parasites se trouvent seuls et en association.

Selon DILLARD *et al.* (2007) l'infestation par *Strongle*, est plus importante chez les jeunes veaux cela s'explique que l'immunité des jeunes veaux infestés est moins développée, ce qui augmente davantage la sensibilité des jeunes bovins et nos résultats en accord avec lui.

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

Nous avons remarqué l'absence *Paramphistomum* chez les bovins adultes par contre **ALZIEU et DORCHIES (2007)** ont trouvé que *Paramphistomum* sont répondu chez les bovins adultes car, ils sont plus au contact avec les sources de contaminations.

Les coccidies touchent toutes les catégories d'âge avec une prédominance plus élevée chez les jeunes bovins. Il faut noter que les conditions d'élevage jouent un rôle essentiel dans la propagation des parasites, ainsi que le surpeuplement, le mélange d'animaux et la mauvaise hygiène sont des facteurs de risques d'infestation parasitaire [**DORCHIES et al., 2012**].

Toxocara apparaît comme le principale parasite digestive chez les veaux âgés de 0-3 mois dans le Nord-Cameroun et *Strongle* trouvé toujours associé à *Toxocara* [**ROBERTS, 1990 ; CHOLLET et al., 1994**].

L'âge joue un rôle important dans la détection des parasites, par exemple la prévalence de *Cryptosporidium* est plus élevée chez les bovins âgé de 1 mois à deux ans [**RAHMETO et al., 2008**].

DAUGSCHIES et NAJDROWSK (2005) ont indiqué que les infections mixtes sont beaucoup plus communes que les infections monospécifiques.

Les résultats de cette technique indiquent que FLOTAC représente un outil multivalent donc elle peut être utilisée simultanément dans le diagnostic de différents helminthes aussi bien que les protozoaires intestinaux et elle est fiable pour estimer la prévalence et l'intensité des infections helminthiques, soit pour le suivi des programmes de santé publique, soit pour l'étude de l'épidémiologie des helminthes [**JEANDRON et al., 2010; KNOPP et al., 2011; STEINMANN et al., 2012**].

Les résultats de la présente étude sont basés sur l'examen des selles en utilisant la technique FLOTAC récemment développée avec FS7 et FS4. D'après **JEANDRON et al. (2011)**, les œufs sont difficilement observés sur les glissières Kato-Katz par rapport à la FLOTAC, sur cette dernière les œufs sont visuellement propres et homogènes en particulier selon les techniciens du laboratoire qui ne connaissent pas ces œufs donc la méthode FLOTAC est plus sensible que le frottis épais à Kato-Katz.

KNOPP et al. (2009b) a montré que 1% des selles des échantillons n'ont pas pu être analysés à raison de la flottation de débris de selles directement sous la grille de l'appareil FLOTAC ce qui

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

constitue l'une des limitations de la technique FLOTAC qui doit être pris en considération dans les études ultérieures.

JEANDRON *et al.* (2010) ont utilisé avec succès une centrifugeuse à main simple et peu coûteuse équipée d'un adaptateur spécial pour maintenir l'appareil FLOTAC.

Par conséquent, ils ont montré que la technique FLOTAC peut être facilement adaptée et utilisée dans les laboratoires avec un équipement minimal. Les résultats indiquent que FLOTAC représente un outil multivalent et non invasif fiable pour estimer la prévalence et l'intensité des infections parasitaires, soit pour le suivi des programmes de santé publique, soit pour l'étude de l'épidémiologie [**UTZINGER *et al.*, 2008 ; KNOPP *et al.*, 2009a ; RINALDI *et al.*, 2011**].

Divers facteurs peuvent affecter la précision des techniques copro-microscopiques basées sur la flottation, y compris le choix du conservateur et du FS, l'utilisation simultanée de l'éther, et la durée de conservation avant la préparation des selles pour l'analyse microscopique [**CRINGOLI *et al.*, 2010**].

La méthode FLOTAC est prometteuse en tant qu'un nouvel outil important pour le diagnostic des protozoaires et des helminthes. Pour un suivi rigoureux des programmes de lutte contre l'helminthe sera remis à l'Université de Naples Federico II. Actuellement, la méthode est validée par différents groupes de recherche de parasitologie et les vétérinaires. Si ces validations réussissent, la méthode sera fournie gratuitement à la recherche publique, y compris l'OMS et les universités [**RINALDI *et al.*, 2012**].

De plus, dans une étude récente menée en Côte d'Ivoire a montré que la technique FLOTAC a pu détecter un nombre plus élevé de résultats positifs que la technique de concentration en acétate d'éthyle, et ceci était confirmé pour chaque espèce d'helminthes / protozoaires détectée [**ERNST *et al.*, 1987; KNOPP *et al.*, 2009a**].

III.3.2.3. Prévalence des parasites selon le sexe des bovins par la méthode de FLOTAC

Tableau 23. Répartition des parasites selon le sexe des bovins

Type de parasite	Sexe	
	Velles	Veaux
<i>Autres Protozoaires</i>	90	14
<i>Eimeria</i> spp.	69	12
<i>Cryptosporidium</i> spp.	23	9
<i>Trichuris</i> spp.	1	00
<i>Toxocara</i> spp.	2	00
<i>Strongle</i>	40	7
<i>Paramphistomum</i> spp.	4	00
Totale	145	19

$$P=0,072, P>0,05, t=1,96$$

Après l'application de la méthode de FLOTAC, les velles semblent infectées par les parasites comme les veaux sans différence significative ($P>0,05$) (Tableau 23). Ces parasites se trouvent seuls et en association.

Nos résultats sont en désaccord avec plusieurs études comme **FIKRU *et al.* (2006)**; **TIGIST *et al.* (2012)**; **GUNATHILAKA *et al.* (2018)**, Dans l'ensemble, la prévalence par sexe des parasites gastro intestinaux était plus élevée chez les mâles que chez les femelles. Les pourcentages d'infection plus élevés chez les mâles ne peuvent pas être expliqués avec exactitude, mais cela pourrait être dû à l'attitude négligée des agriculteurs à l'égard de la gestion des animaux mâles puisque de nombreuses exploitations ciblent la production laitière, se concentrant davantage sur la santé des femelles.

III.3.2.4. Prévalence et distribution des parasites en fonction de la consistance des selles

Tableau 24. Prévalence d'*Autres protozoaire*, *Eimeria* spp, *Trichuris*, *Toxocara*, *Strongle* et *Paramphistum* dans les selles diarrhéiques et non-diarrhéiques.

Aspect des échantillons fécaux		<i>Autres Protozoaire</i>	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Trichuris</i>	<i>Toxocara</i>	<i>Strongle</i>	<i>Paramphistum</i>
S. D	Nbr	84	62	1	1	20	3
(n= 96)	%	(87,5)***	(64,58)**	(1,04)	(1,04)	(20,83)	(3,12)
S. N.D	Nbr	20	19	00	1	27	1
(n=78)	%	(25,64)	(24,35)	(0,00)	(1,28)	(35,61)*	(1,28)
Totale	Nbr	104	81	1(0,57)	2	47	4
(n=174)	%	(60,11)	(46,82)	P = ns	(1,15)	(27,16)	(2,31)
		$P \leq 0,0001$	$P \leq 0,0001$	$\chi^2 = 0,81$	$P = ns$	$P \leq 0,05$	$P > 0,05$
		$\chi^2 = 68,48$	$\chi^2 = 27,99$		$\chi^2 = 0,021$	$\chi^2 = 4,14$	$\chi^2 = 0,65$

S.D: selles diarrhéiques, **S.N.D:** selles non diarrhéiques.

Les parasites: *Autres Protozoaire* et *Eimeria* spp. sont trouvés avec des valeurs élevés 87,5% (84/96) et 64,58% (62/96) chez les veaux diarrhéiques par apport aux veaux que non diarrhéiques avec une différence significative ($P \leq 0,05$) (Tableau 20). Ces parasites se trouvent seuls et en association.

Par contre la présence des parasites *Trichuris*, *Toxocara*, *Paramphistum* n'est pas liée à la diarrhée.

Strongle est avérée réponde dans les selles non diarrhéique que les selles diarrhéiques avec une différence significative ($P \leq 0,05$).

Des études épidémiologiques à plus grande échelle ont mentionné une forte corrélation entre les niveaux d'*Eimeria* spp. et l'incidence de la diarrhée chez les veaux [BANGOURA *et al.*, 2011].

III.3.2.5. Prévalence et distribution des parasites selon FS4 et FS7

Tableau 25. Prévalence des infections des protozoaires intestinaux déterminées par Flotac-400 (Les résultats obtenus à partir de FS4 et FS7 séparément)

Parasites	Résultats de Flotac					
	FS4 seul			FS7 seul		
	Nbr	%	95% CI	Nbr	%	95% CI
<i>Autres Protozoaire</i>	+++			+++		
<i>Eimeria</i>	88	50,57**	[44,06 – 74,94]	60	34,48	[30,97- 41,64] P = 0,002 $\chi^2 = 9,21$
<i>Strongle</i>	50	28,73**	[23,50 - 55,83]	26	14,94	[8,723- 21,14] P = 0,0018, $\chi^2 = 9,69$
<i>Toxocara</i>	1	0,57	[-1,461-6,128]	1	0,57	[-0,6326 - 3,013]
<i>Trichuris</i>	0	0	[-1,202- 4,535]	1	0,57	[-0,1001- 2,220] P = 1,00 $\chi^2 = 0,0$
<i>Paramphistomum</i>	1	0,57	[-1,128 - 6,461]	5	2,87	[1,873-3,734] P = 0,099 (ns) $\chi^2 = 2,71$

C.I: Interval de confiance, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$, *** $P \leq 0,0001$, ns: non significative.

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

Le tableau 25 montre la prévalence de six espèces parasites intestinales identifiées, ces parasites se trouvent seuls et en association. Selon la technique Flotac (ainsi que des résultats séparés obtenus de FS4 ou FS7). Selon nos résultats, *Eimeria* spp. est le protozoaire intestinal le plus fréquent, avec un taux de 50,57% (IC 95%, 44,06 à 74,94%). Les taux de prévalence de *Strongyle* et *Toxocara* est de 28.73% (IC 95%, 23,50 à 55,83%), et 0,57% (IC 95%, -1,46 à 6,12%).

Dans notre étude, le FS4 a donné plus de parasites par apport à FS7 pour *Eimeria* et *Strongyle* avec une différence significative ($P \leq 0,05$).

Concernant *Toxocara*, *Trichuris* et *Paramphistomum* il n'y a pas de différence significative ($P > 0,05$) entre FS4 et FS7.

Le FS4 et FS7 sont les FS recommandés pour la recherche des helminthes intestinaux, en effet, FS4 est avéré performant pour STH (les helminthes transmis par le sol) [SPEICH *et al.*, 2010].

D'après BECKER *et al.* (2011) le FS4 et FS7 ont une grande sensibilité de détection des protozoaires intestinaux.

JEANDRON *et al.* (2010) ont réalisé une étude à Kyrghizstan et ils ont comparés neuf FS différents en utilisant des échantillons de selles positives humains contiennent 38 types d'helminthes. Ces tests ont indiqué que le choix de FS4 et FS7 était approprié pour rencontrer les espèces d'helminthes à l'exception d' *Hymenolepis nana*, même FS5 (saccharose et iodomercurate de potassium) donne des meilleurs résultats pour la détection des protozoaires.

En Côte d'Ivoire, les études récentes ont permis de révéler que la technique FLOTAC double a été utilisée avec succès pour détecter les parasites et ils ont constaté que la technique FLOTAC est plus importante que la technique de concentration en acétate d'éthyle [HUETINK *et al.*, 2001; GÜL *et al.*, 2008; KNOPP *et al.*, 2009b].

La plus haute sensibilité de FLOTAC par rapport au Kato-Katz avaient déjà démontré dans différents contextes épidémiologiques, récemment FLOTAC-400 est disponible comme un appareil plus développé et plus amélioré par rapport à FLOTAC-100, permettant un diagnostic microscopique à un grossissement 4 fois plus élevé que FLOTAC-100, qui est nécessaire pour la détection de protozoaires intestinaux [CRINGOLI *et al.*, 2010].

Le FS est un déterminant clé de la sensibilité de toute technique copro-microscopique basée sur la flottation [CRINGOLI, 2006; CRINGOLI *et al.*, 2010].

Conclusion

- 174 échantillons fécaux sont analysés par la méthode de Zeihl-Neelsen et la méthode de FLOTAC pour la détection de *Cryptosporidium* et d'autres parasites respectivement.

- Les parasites identifiés par la méthode FLOTAC sont *Autres protozoaires*, *Eimeria* spp., *Strongle*, *Trichuris*, *Paramphistomum*, *Toxocara*.

- Les deux solutions de flotation FS4 et FS7 sont considérés les meilleures solutions pour la détection des helminths et les protozoaires.

- Les veaux âgés de 15 j jusqu'au l'âge adulte excrété : *Autres protozoaire*, *Eimeria* spp. et *Strongle* spp., ainsi que *Eimeria* spp. et *Strongle* ont été trouvés chez les veaux après 15 j et chez les adultes, mais *Toxocara*, *Trichuris* et *Paramphistomum* sont marqués absents chez les jeunes veaux.

- La comparaison entre le taux d'infection par les parasites chez les veaux et les velles était trouvée sans différence significative ($P > 0,05$).

- L'excrétion d' *Eimeria* et *Autres Protozoaire* et spp. est significativement corrélée avec la présence de la diarrhée mais *Trichuris*, *Toxocara*, *Paramphistum* n'est pas liée à la diarrhée.

2.

TECHNIQUE DE MINI-FLOTAC

Introduction

Les infections intestinales constituent une lourde charge, surtout dans les pays en développement, les helminthes (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale*, *Strongyloides stercoralis*) ainsi que les protozoaires intestinaux (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*) [SAVIOLI *et al.*, 2006; BARDA *et al.*, 2014a].

Kato Katz est une technique de diagnostic idéale appliquée dans la plupart des laboratoires des pays d'endémie des helminthes puisqu'elle a combiné entre la robustesse, la simplicité, le faible coût et la bonne sensibilité, c'est la technique quantitative recommandée pour le diagnostic de STH [BARDA *et al.*, 2013a]. D'autres techniques couramment utilisées pour le dénombrement des œufs fécaux des parasites sont adaptées dans la parasitologie vétérinaire et humaine, tels que McMaster et la technique FLOTAC [CRINGOLI *et al.*, 2010; LEVECKE *et al.*, 2011].

Le Mini-FLOTAC est un nouveau dispositif de diagnostic récemment développé et simplifié à partir de la technique FLOTAC, cette dernière, malgré a une sensibilité élevée pour le diagnostic des infections parasitaires intestinales, et limitée par sa complexité et le besoin d'une centrifugeuse spéciale [UTZINGER *et al.*, 2008; KNOPP *et al.*, 2009a].

Mini-FLOTAC est une méthode à faible coût, qui ne nécessite pas l'utilisation des équipements coûteux ou une source d'énergie, de sorte qu'il peut être confortablement utilisé dans les pays en développement [KNOPP *et al.*, 2010]. L'objectif de cette technique est la recherche des différents parasites dans les échantillons fécaux de bovins du nord-est de l'Algérie.

II.3.2.1. Matériel et méthodes

II.3.2.1.1. Site d'étude

Notre technique est réalisée sur des échantillons de selles qui ont été collectés à partir de différentes localités de la Wilaya de Batna (Nord est de l'Algérie): [Merouana, El Madher, Djerma, Arris, Ras El Aioun, Chemora, Aïn Yagout et Bouhmar].

Au total, 220 échantillons fécaux sont collectés, puis traités au niveau du laboratoire de parasitologie et Mycologie de CHU de BATNA, puis conservés dans le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) à 2,5% à 4°C pour la technique de Mini-FLOTAC.

II.3.2.1.2. Technique de Mini-FLOTAC

A. Principe du test

Le Mini-FLOTAC est un nouveau dispositif simplifié de la technique FLOTAC qui a été développé récemment afin d'obtenir un appareil facilement utilisable et transportable dans les laboratoires limités en équipement et il ne nécessite pas de centrifugeuse [CRINGOLI *et al.*, 2010].

Elle est comme la technique FLOTAC basée sur la flottation des éléments parasites [CRINGOLI, 2006; CRINGOLI *et al.*, 2010]. La description de l'appareil Mini-FLOTAC est développée dans l'annexe 16.

B. Exécution du Mini- FLOTAC

Les selles ont été traitées comme suit, 8 g de selles ont été placés dans le Fill-FLOTAC, puis ont été dilués avec 8 ml de formol 5%, puis homogénéisés et filtrés, après 2 ml de la suspension ont été ajoutés directement à 18 ml de chacun des deux des solutions de flottation (FS) qui sont les mêmes que celles décrites dans le protocole de la technique FLOTAC, à savoir FS2 (chlorure de sodium saturé; à une densité de 1,20) afin de mettre en évidence les œufs d'helminthes et FS7 (sulfate de zinc, à une densité de 1,35) afin de mettre en évidence les oocystes de coccidies et les kystes de *Giardia* [CRINGOLI *et al.*, 2010]. Les deux compartiments de Mini-FLOTAC ont été remplis pour chaque échantillon, l'un avec la suspension fécale dans FS2 et l'autre avec la suspension fécale dans FS7.

Avant la lecture de la lame de dispositif et la traduction du disque de lecture, un temps moyen de 10 mn était nécessaire pour que les œufs, larves et (oo) kystes flottent. Les œufs, les larves et les

kystes de parasites intestinaux ont été détectés et lus dans la grille (Figure 30) [BARDA *et al.*, 2013b; BARDA *et al.*, 2014 a].

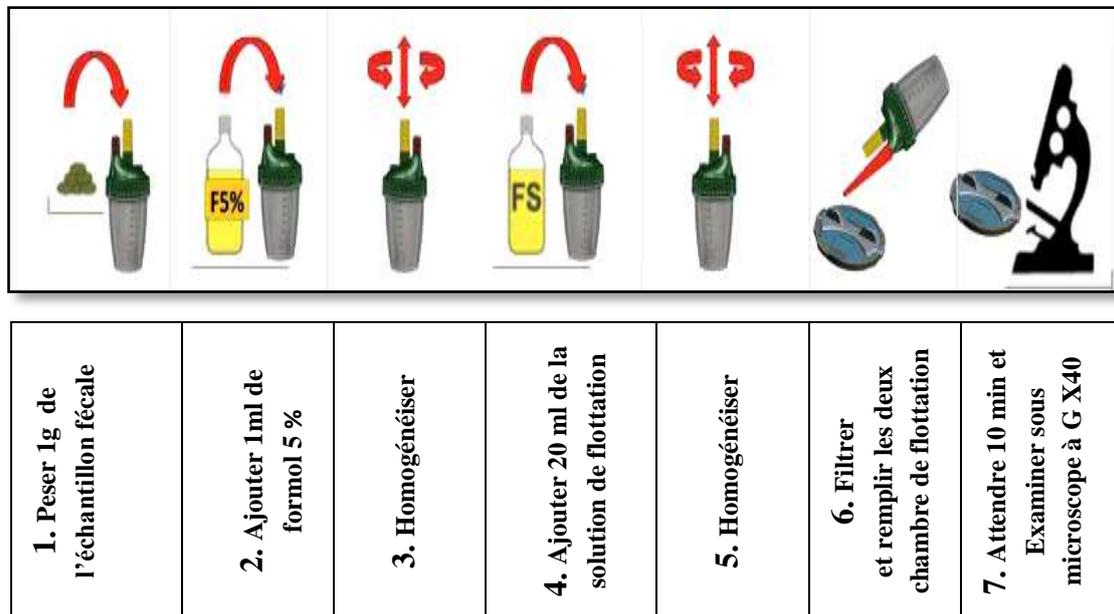


Figure 30. Différentes étapes de fonctionnement de la technique Mini-FLOTAC [CRINGOLI *et al.*, 2013].

II.3.2.1.3. Tests statistiques

Les résultats de la méthode Mini-FLOTAC ont été analysés par le GraphPad Prism 6, utilisant le test χ^2 , test de Student et Anova univarié suivie du test Dunnett /Tukey pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification.

Les valeurs de $P \leq 0,05$ sont considérées statistiquement significatives.

II.3.2.2. Résultats et Discussion

II.3.2.2.1. Identification des parasites intestinaux par la méthode Mini-FLOTAC

La technique Mini-FLOTAC a donné 4 types de parasites intestinaux : *Autes protozoaires*, *Eimeria spp.*, *Strongle* et *Toxocara*.

Chapitre II Sources animées de *Cryptosporidium* et de *Giardia* pour les humains via les bovins

II.3.2.2.2. Prévalence des parasites par tranche d'âge

Tableau 26. Prévalence d'Autres Protozoaire, *Eimeria* spp., *Strongle*, *Toxocara* par la méthode de Mini-FLOTAC.

Âge	Nbre d'échantillon	Nombre d'animaux infectés			
		<i>Autres Protozoaire</i>	<i>Eimeria</i> spp.	<i>Strongle</i>	<i>Toxocara</i>
15 -30 J	28	11	13	00	0 (-)
1-3 M	52	29	27	1	1
3 -5 M	32	17	7	2	1
6 - 7 M	46	14	13	3	0 (-)
8 - 11 M	28	10	11	8	0 (-)
12 –20 M	11	6	4	5	0 (-)
2A (Adultes)	23	7	6	3	0 (-)
Totale	220	94 (42,72%)*	81 (36,81%)*	22 (10%)	2 (0,9%)

J: jour; M: mois ; A: année;*P≤ 0,05

Après l'analyse par la technique de Mini –FLOTAC nous avons obtenu les prévalences des différents types de parasites gastro-intestinaux: deux espèces d'helminthes intestinaux, qui sont *Strongle* 22 (10,0 %), *Toxocara* 2 (0,9%), et des protozoaires, *Eimeria* spp. 81(36,81%) et *Autres Protozoaires* 94 (42,72 %).

L'infection était très importante avec *autres protozoaire* puis *Eimeria* spp. sans différence significative (P>0,05).

L'infection par *Strongle* est la principale infection helminthique par rapport à *Toxocara* avec une différence significative (P≤0,05). Cette observation était en accord avec l'étude de SHIRALE *et al.* (2008) qui ont signalé une incidence plus élevée de *Strongle* chez les bovins du Rajasthan –Inde (Tableau 26).

Dans notre étude les animaux ont été élevés dans des granges de type village où l'hygiène et les applications de médicaments antiparasitaires sont irrégulières et où le mouvement du bétail est incontrôlé [SHIRALE *et al.*, 2008; AVCIOGLU et BALKAYA, 2011].

Des études précédentes montrent que le Mini-FLOTAC est avéré être l'approche la plus sensible (95%) pour le diagnostic d'helminthes [CRINGOLI *et al.*, 2010; GLINZ *et al.*, 2012].

Le Mini-FLOTAC a une très bonne sensibilité pour la détection des helminthes, mais relativement moins sensible pour la détection des protozoaires. Pour les oocystes de coccidies et les kystes de *Giardia*, la sensibilité est meilleure avec le FLOTAC grâce à l'étape de centrifugation qui permet d'augmenter la détection [BARDA *et al.*, 2013 a].

La technique de Mini-FLOTAC est considérée importante tant qu'elle est combinée au dispositif Fill-FLOTAC donc elle empêche tout risque de contamination de l'opérateur [BARDA *et al.*, 2013 a; BARDA *et al.*, 2014 c].

BARDA *et al.* (2013 b), ont comparé l'examen directe (la méthode de concentration en formol-éther FECM) et la Mini-FLOTAC et ils ont montré que le Mini-FLOTAC est certainement une technique sensible et relativement simple pour le diagnostique qualitatif des infections helminthiques et peut être améliorée pour le diagnostique des protozoaires intestinaux [BARDA *et al.*, 2013b; BARDA *et al.*, 2014 b].

La technique FECM est recommandée pour le diagnostique qualitatif de parasites intestinaux (à la fois les helminthes et les protozoaires intestinaux), le frottis direct pourrait être considéré comme une méthode suffisante pour le diagnostique des protozoaires dans les zones qui ont une charge parasitaire et des ressources limitées [SUWANSAKSRI *et al.*, 2002; BARDA *et al.*, 2013 b].

Le Mini-FLOTAC est une technique quantitative qui permet de mesurer le nombre d'œufs contrairement à la FECM suivi d'un frottis direct. A cet égard, il serait intéressant de tester le Mini-FLOTAC par rapport aux techniques copro-parasitologiques quantitatives classiques telles que Kato-Katz et McMaster [BARDA *et al.*, 2014 b].

Dans l'ensemble, la méthode la plus longue pour la réaliser était Kato-Katz (temps moyen 48 mn / échantillon), suivi du Mini-FLOTAC (13 mn / échantillon) mais McMaster a été considérée le plus rapide car elle prend (7 mn / échantillon) [BARDA *et al.*, 2014c].

Le Mini-FLOTAC est une technique prometteuse pour le diagnostique des helminthes, il est plus sensible que Kato-Katz et McMaster pour l'identification *H. nana* et de *A. lumbricoides* [BARDA *et al.*, 2014c].

Le Mini-FLOTAC a une sensibilité analytique = 10 œufs / larves / kystes par g de fèces lors de la lecture d'une seule chambre (de 1 ml) et de 10 OPG lors de la lecture des deux chambres [BARDA *et al.*, 2014a].

L'avantage majeur du Mini-FLOTAC, sa bonne sensibilité et sa simplicité d'utilisation ainsi que son coût faible du fait que le Mini-FLOTAC (à part le coût du kit actuellement gratuit pour la recherche) et il soit réutilisable après un rinçage minutieux et que l'achat d'une centrifugeuse n'est pas nécessaire. Donc sauf l'achat de (NaCl) et de (ZnSO₄) pour les solutions de flottation [BARDA *et al.*, 2013b].

Le Mini-FLOTAC donne des meilleurs résultats que la technique classique de sédimentation urinaire et peut être utilisé à la place du FLOTAC dans les laboratoires où l'étape de centrifugation ne peut pas être réalisée [MAURELLI *et al.*, 2014].

II.3.2.2.3. Prévalence des parasites selon FS2 et FS7

Tableau 27 .Prévalence des parasites intestinaux déterminées par Mini-FLOTAC.

Parasite	Résultats de Mini-Flotac							
	FS2 seul			FS7 seul			χ^2	Valeur de <i>P</i>
N°	%	95% CI	N°	%	95% CI			
<i>Protozoaire</i>	++			++				
<i>Eimeria spp.</i>	81	36,81*	[33,06-40,94]	60	27,27	[25,97-31,64]	4,60	0,03
<i>Strongle</i>	22	13,41	[10,08-15,65]	26	11,81	[8,723-13,14]	0,21	0,63 (ns)
<i>Toxocara</i>	2	0,90	[0,70-1,00]	1	0,45	[0,30-0,5]	0,33	0,56 (ns)

IC: Intervalle de confiance ; N°: nombre; %: pourcentage

Selon nos résultats obtenus, nous avons constaté qu'il n'y a pas de différence significative entre le pourcentage d'infection avec FS2 et FS7 avec la plupart des parasites (**Tableau 27**).

Le Mini-FLOTAC a été testé uniquement en utilisant deux différentes solutions de flottation (NaCl saturé et sulfate de zinc), mais d'autres FS pourraient être testés [BARDA *et al.*, 2013b].

II.3.2.2.4. Prévalence des parasites intestinaux par sexe

Tableau 28. Répartition des parasites selon le sexe.

Type de parasite	sexes	
	Veaux	Velles
<i>autres Protozoaires</i>	22	72
<i>Eimeria spp.</i>	18	63
<i>Toxocara</i>	02	00
<i>Strongle</i>	08	14
Totale	45	175

$$P=0,22, P>0,05, t=1,34$$

Les taux d'infection des deux sexes étaient de 45 chez les veaux contre 175 chez les velles sans différence significative ($P > 0,05$) (Tableau 28).

II.3.2.2.5. Prévalence et distribution des espèces en fonction de la consistance des selles

Tableau 29. Prévalence d'*Eimeria*, *Toxocara*, *Strongle* et *Autres Protozoaire* dans les selles diarrhéiques et non-diarrhéiques.

Aspect des échantillons de selles	<i>autres Protozoaire</i>	<i>Eimeria spp</i>	<i>Toxocara</i>	<i>Strongle</i>
	Nbre	Nbre	Nbre	Nbre
S D (n= 145)	78 (53,8)***	68 (46,89)***	2 (1,3)	17 (11,72)
SND (n= 75)	16 (21,33)	13 (17,33)	00	5 (6,66)
Totale (n=220)	94 (42,72)	81 (36,81)	2 (0,9)	22 (10)
χ^2	21.28 $P \leq 0,0001$	18,57 $P \leq 0,0001$	1,04 ns	1,40 ns

SD: Selles diarrhéiques, SND: Selles non diarrhéiques, *** $P \leq 0,0001$.

Selon nos résultats, l'infection par *Autres protozoaires* et *Eimeria spp.*, est toujours liée à la diarrhée par contre la prévalence de *Toxocara* et *Strongle* est presque la même dans les selles diarrhéiques et non diarrhéiques sans différence significative ($P > 0,05$) (Tableau 29).

ALEMAYEHU *et al.* (2013) a noté que l'excrétion d'*Eimeria spp.* était très significativement associé à la diarrhée.

Conclusion

- Mini-FLOTAC est une méthode de flottation à faible coût, elle est réalisée sur 220 échantillons fécaux.
- Parmi les parasites intestinaux dépistés chez les bovins par la technique de Mini – FLOTAC sont: *Autres protozoaire* 42,72% (94/220) suivi par *Eimeria* spp. 36,81% (81/220) et les helminthes soit 10% (22/220) pour *Strongle* et soit 0,9 % (2/220) pour *Toxocara* .
- Le Mini-FLOTAC a révélé qu'*Autres Protozoaire* et *Eimeria* spp. sont liée à la diarrhé.
- La comparaison entre le taux d'infection par les parasites chez les veaux et les velles était trouvée sans différence significative ($P>0,05$).
- La présente étude confirme que le Mini-FLOTAC est une technique prometteuse pour détecter et compter les œufs d'helminthes et les protozoaires dans les fèces des bovins, et peut être sera utilisée dans les laboratoires de routine.

Conclusion générale

Conclusion générale et perspectives

La diarrhée est une maladie fréquemment signalée chez les individus immunodéprimés et les veaux, et constitue encore une cause majeure de productivité et de perte économique pour les éleveurs bovins à travers le monde.

Cryptosporidium spp. et *Giardia* spp. sont des agents pathogènes largement répandus chez les humains et de nombreuses espèces de mammifères.

Cependant, en Algérie, on connaît encore peu l'épidémiologie de ces parasites en raison de la pénurie de données sur les cas humains et animaux.

Dans notre étude nous avons accédé à la répartition des protozoaires et les helminthes intestinaux chez les humains et les bovins au nord-est de l'Algérie précisément la ville de BATNA.

La technique de Ritchie est utilisée, suivi par la coloration de ZN modifiée et la coloration au lugol afin de détecter respectivement les oocystes de *Cryptosporidium* spp. et les kystes de *Giardia* spp. pour 641 échantillons de matière fécale humains et 620 échantillons bovins, 30 échantillons fécaux des bovins sont examinés par l'immunofluorescence directe pour *Cryptosporidium* et *Giardia* (IFD).

Cryptosporidium a un taux d'infestation de 48.7% tandis que *Giardia* est absente pour les bovins, pour l'immunofluorescence 26 cas a été révélé positif pour *Cryptosporidium* seulement. Un cas positif pour *Cryptosporidium* a été remarqué pour les échantillons humains mais *Giardia* a été remarqué avec une fréquence de (7,17%).

La technique FLOTAC a été effectuée sur 174 échantillons bovins, cette technique a pu révéler d'Autres Protozoaire, *Eimeria* spp., *Strongle*, *Trichuris* spp., *Paramphistomum* spp. et *Toxocara*.

Parmi les parasites intestinaux dépistés chez les bovins par la technique de Mini – FLOTAC sont: les protozoaires *Autres Protozoaire*, *Eimeria* spp. et les helminthes *Strongle* et *Toxocara*.

Les techniques de biologie moléculaire, PCR niché suivi par le séquençage utilisant le gène de l'ARN_r 18S et le gène gp 60 de *Cryptosporidium*, le gène de β -giardine de *Giardia*.

Giardia et *Cryptosporidium* ont été détectés dans 4 échantillons (6,06%) et 24 échantillons (36,36 %), respectivement. Dans deux échantillons, la co-infection par les deux parasites a été observée.

Trois espèces de *Cryptosporidium* ont été identifiées, *Cryptosporidium bovis* (n = 14), *C. ryanae* (n = 6) et *C. parvum* (n = 4) et un sous-type zoonotique de *C. parvum* a été identifié après séquençage IIAA13G2R1, donc le risque zoonotique de *Cryptosporidium* est de 3,03 % (2 cas par rapport à 66 cas examinés par PCR).

Les résultats d'analyse de séquençage indiquent le rôle important d'examiner les espèces dans le maintien des sources naturelles de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp.

Quelques perspectives sont souhaitées :

- Des futures études sont nécessaires sur un nombre énorme d'échantillons pour fournir une meilleure estimation de la prévalence et de l'identité des géotypes de *C. parvum* chez les jeunes veaux et leur rôle dans la cryptosporidiose clinique.
- Réalisation des journées portes ouvertes pour rappeler la bonne pratique pour la gestion de mesures d'hygiène.
- Reconnaissance des voies de transmission alimentaire de ces parasites.
- Recherche des molécules bioactives à partir des plantes médicinales avec un effet anti-cryptosporidiose.
- Etude des mécanismes moléculaires expliquant l'action pathogène de *Cryptosporidium* spp.
- Diagnostique de *Cryptosporidium* spp. et *Giardia* spp. et l'identification des stades endogènes par un examen histologique dont l'intérêt est de localiser les zones infectées et d'évaluer l'étendue des lésions.
- Découvrir des vaccins efficaces pour prévenir la cryptosporidiose.
- Evaluer la progression des lésions néoplasiques induites par *Cryptosporidium* sp. vis à vis un adénocarcinome invasif.

Références bibliographiques

1. **ABBAS A., BOUALI F., AUDIN D., 2015-** An evaluation of the prevalence of *Giardia* spp. *Cryptosporidium* spp and *Eimeria* spp. in dairy cattle on sixteen farms in three regions at north-eastern Algeria. *African Journal of Parasitology Research*, 2 (4): 82-85.
2. **ADAGU I.S., NOLDER D., WARHURST D.C., ROSSIGNOL J.F., 2002-** In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother*, 49:103-11.
3. **ADAM R. D., 2001-** Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 :447–448.
4. **ADAM R.D., GUERRANT R.L., ZU S., FANG G., ROCHE J.K., 1994-** *Cryptosporidium parvum* infection of intestinal epithelium: morphologic and functional studies in an in vitro model. *J Infect Dis*, 169 :170–177.
5. **ADAMU H., PETROS B., ZHANG G., KASSA H., AMER S., YE J., FENG Y., XIAO L., 2014-** Distribution and clinical manifestations of *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV/AIDS patients in Ethiopia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(4): 1-8.
6. **ADOU-BRYN D., KOUASSI M., BROU J., OUHON J., ASSOUMOU A., 2001-** Prévalence globale des parasitoses à transmission orale chez les enfants à Toumodi (Cote d'Ivoire). *Méd Afrique Noire*, 48(10):394-398.
7. **AGGARWAL A., ADAM R.D., NASH T.E., 1989-** Characterization of a 29.4- kilodalton structural protein of *Giardia lamblia* and localization to the ventral disc. *Infect. Immun.*, 57:1305–1310.
8. **AJJAMPUR S.S., SANKARAN P., KANG G., 2008-** Espèces *Cryptosporidium* chez les individus infectés par le VIH en Inde: un aperçu. *Natl Med J India* ,21 (4): 178-184.
9. **AKAM A., KHELEF D., KAIDI R., ABDUL-HUSSAIN MARIA S., SUTEU E., COZMA V., 2002-** Epidémiologie de la cryptosporidiose bovine dans la région de la Mitidja d'Algérie. *Scientia Parasitologica*, 3 (2): 43-51.
10. **AKAM A., KHELEF D., KAIDI R., OTHMANI A., LAFRI M., TALI-MAAMAR H., RAHAL K., TAHRAT N., CHIRILA F., COZMA V., ABDUL-HUSSAIN M.S., 2004-** Fréquences d'isolement de *Cryptosporidium parvum*, d'*Escherichia coli* K99 et de *Salmonella* spp. chez les veaux diarrhéiques et non diarrhéiques dans six fermes laitières de la Mitidja d'Algérie (Résultats préliminaires). *Sci. Parasitol*, 5(1):13-21.
11. **AKAM A., LAFRI M., KHELEF D., KAIDI R., BOUCHENE Z., COZMA V., SUTEU E., 2007-** cryptosporidiose bovine dans la région de la Mitidja (Algérie). *Bulletin USAMV-CN.*, 64: 1-2.
12. **AL-ADHAMI B. H., NICHOLS R. A. B., KUSEL J. R., O'GRADY J., SMITH H. V., 2007-** Detection of UV-Induced Thymine Dimers in Individual *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocysts by Immunofluorescence Microscopy. *Appl. Environ. Microbiol*, 73 (3): 947-955.

13. **ALEMAYEHU A., NURU M., BELINA T., 2013-** Prevalence of bovine coccidian in Kombolcha district of South Wollo, Ethiopia. *J. Vet. Med. Animal Health*, 5(2):41-45.
14. **ALLEN V.H., RIDLEY D.S., 1970-** Further observations on the formol ether concentration technique for faecal parasites. *J. clin. Pathol.*, 23: 545-546.
15. **AL-MEKHLAFI H.M., AL-MAKTARI M.T., JANI R., AHMED A., ANUAR T.S., MOKTAR N., MAHDY M.A., LIM Y.A., MAHMUD R., SURIN J., 2013-** Burden of *Giardia duodenalis* infection and its adverse effects on growth of schoolchildren in rural Malaysia. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7 (10):2-11.
16. **AL-MEKHLAFI H.M., SURIN J., SALLAM A.A., ABDULLAH A.W., MAHDY M.A. K., 2010-** Giardiasis and poor vitamin A status among aboriginal school children in rural Malaysia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83:523–527.
17. **ALONSO R.A., PEATTIE D.A., 1992-** Nucleotide sequence of a second alpha giardin gene and molecular analysis of the alpha giardin genes and transcripts in *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 50: 95–104.
18. **AL-SAEED A.T., ISSA S.H., 2010-** Detection of *Giardia lamblia* antigen in stool specimens using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mediterranean Health Journal*, 16 (4):363-364.
19. **ALZIEU J-P., DORCHIES PH., 2007-** Émergence de la paramphistomose bovine en France : Synthèse des connaissances actuelles épidémiologiques, physiopathologique et diagnostiques. *Bull. Acad. Vét. France*, 2 (160): 93–98.
20. **AMBROISE-THOMAS P., PINEL C., GRILLOT R., 1999-** La cryptosporidiose humaine : une parasitose émergente d'importance croissante en santé publique. *Bull. Acad. Vét. de France*, 72:91-99.
21. **AMER S., HONMA H., IKARASHI M., TADA C., FUKUDA Y., SUYAMA Y., NAKAI Y., 2010-** *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in dairy calves in Egypt. *Vet. Parasitol.*, 169(3-4):382–386.
22. **ANAS M., EDDINE J.H., MEBROUK K., 2008-** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World J Dairy Food Sci* ,3:39–49.
23. **ANDREW W., HICKMAN C.P., 1974-** Digestive Systems. in *Histology of the Vertebrates: A Comparative Text*. C. V. Mosby Company, St. Louis, MO: 243–296.
24. **ANONYMOUS. , 1996-** *Cryptosporidium* outbreak in British Colombia, *Cryptosporidium* Capsule 1:1–3.
25. **ANUAR T.K. , AL-MEKHLAFI H.M., GHANI M.K., OSMAN E., YASIN A.M., NORDIN A., AZREEN S.N., SALLEH F.M., GHAZALI N., BERNADUS M., MOKTAR N., 2012-** Giardiasis among different tribes of Orang Asli in Malaysia: Highlighting the presence of other family members infected with *Giardia intestinalis* as a main risk factor. *Int. J. Parasit*, 42 (9):871–880.
26. **APPELBEE A.J., THOMPSON R.C.A., OLSON M.E., 2005-** *Giardia* and *Cryptosporidium* in Mammalian Wildlife. The Current Status and Future Needs. *Trends Parasitol*, 21:370-376.
27. **ARGENZIO R.A., LECCE J., POWELL D.W., (1993).** Les prostanoïdes inhibent l'absorption intestinale de NaCl dans la cryptosporidiose porcine expérimentale. *Gastroenterol*, 104 : 440–447.

28. **ATWILL E.R., HARP J.A., JONES T., JARDON P.W., CHEEL S., ZYLSTRA M., 1998-** Evaluation of periparturient dairy cows and contact surfaces as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* for calf hood infection. *Am. J. Vet. Res.*, (59):1116-1121.
29. **AVCIOĞLU H., BALKAYA I., 2011-** Prevalence of *Toxocara vitulorum* in Calves in Erzurum, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (3): 345-347.
30. **AYADI A., MAHFOUDH A., MAHJOUBI F., 1991-** Parasitoses intestinales chez l'enfant bilan de 2 ans dans le centre Hospitalo Universitaire de Sfax. *Médecine d'Afrique Noire*, 38(8/9):557-560
31. **AYANA D., ALEMU B., 2015-** Cryptosporidiosis in Calves, Lambs and Goat Kids in Bishoftu, Oromia Regional State, Ethiopia. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 7 (5): 233-239.
32. **AYINMODE A. B., FAGBEMI B. O., 2010-** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in cattle from South Western Nigeria. *Vet. Arhiv.*, 80 :723-731.
33. **BACHTA E., ZENAIDI N., BELKAID M., Tabet-DERRAZ O., 1990-** Evaluation of intestinal parasitosis detected among Algerians (1984-1988). *Bull Soc Pathol Exot*, 83 (4): 510-516.
34. **BAIRAMI KUZEHKANAN A., REZAEIAN M., ZERAATI H., MOHEBALI M., MEAMAR A.R., BABAEI Z., KASHI L., HEYDARNEZHADI M., REZAIIE S., 2011-** A Sensitive and Specific PCR Based Method for Identification of *Cryptosporidium* Sp. Using New Primers from 18S Ribosomal RNA. *Iran J Parasitol.*, 6(4): 1–7.
35. **BAJER A., BEDNARSKA M., CACCIO S.M., WOLSKA-KUSNIERZ B., HEROPOLITANSKAPLISZKA E., BERNATOWSKA E., WIELOPOLSKA M., PAZIEWSKA A., WELCFALECIAK R., SINISKI E., 2008-** Genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human clinical cases in Poland. *Parasitol Res*, 103:37–42.
36. **BANDYOPADHAYA A., DAS D., CHAUDHURI K., 2009-** Involvement of intracellular signaling cascades in inflammatory responses in human intestinal epithelial cells following *Vibrio cholerae* infection. *Mol Immunol* ,46:1129-1139.
37. **BANGOURA B., MUNDT H.C., SCHMASCHKE R., WESTPHAL B., DAUGSCHIES A., 2011-** Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitol. Res.*, 109: 129– 138.
38. **BARDA B., CAJAL P., VILLAGRAN E., CIMINO R., JUAREZ M., KROLEWIECKI A., RINALDI L., CRINGOLI G., BURIONI R., ALBONICO M., 2014 c-** Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: three methods, one goal; highlights from north Argentina. *Parasit Vectors*, 7(1):27.
39. **BARDA B., IANNIELLO D., SALVO F., SADUTSHANG T., RINALDI L., CRINGOLI G., BURIONI R., ALBONICO M., 2014 a-** “Freezing” parasites in pre-Himalayan region, Himachal Pradesh: Experience with mini-FLOTAC. *Acta Trop*, 130: 11–16.
40. **BARDA B., IANNIELLO D., ZEPHERYNE H., RINALDI L., CRINGOLI G., BURIONI R., ALBONICO M., 2014 b-** Parasitic infections on the shore of Lake Victoria (East Africa) detected by Mini-FLOTAC and standard techniques. *Acta Trop*, 137:140-146.

41. **BARDA B., RINALDI L., IANNIELLO D., ZEPHERINE H., SALVO F., SADUTSHANG T., CRINGOLI G., CLEMENTI M., ALBONICO M., 2013 b-** Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLOS Negl Trop Dis*, 7(8):2-6.
42. **BARDA B., ZEPHERINE H., RINALDI L., CRINGOLI G., BURIONI R., CLEMENTI M., ALBONICO M., 2013 a** -Mini-FLOTAC and Kato-Katz: helminth eggs watching on the shore of lake Victoria. *Parasites & Vectors*, 6: 220.
43. **BARON S., 1996-** Medical Microbiology. 4ème édition. Galveston, University of Texas Medical Brand at Galveston: *Samuel Baron Edition*.Chapitre77:6.
44. **BAROUDI D., HAKEM A., DAHMANI, LYSEN C., ROELLIG D., KHELEF D., XIAO L., 2015-** Génotypage préliminaire de *Giardia* chez l'agneau en Algérie preliminary genotyping of *Giardia* in lambs in Algeria. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 22:38.
45. **BAROUDI D., KHELEF 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.*Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 8: 66-69.
46. **BAROUDI D., HAKEM A., H. ADAMU, AMER S., KHELEF D., ADJOU K.,DAHMANI H., CHEN X.,ROELLIG D., FENG Y., XIAO L.,2018-** Zoonotic *Cryptosporidium* species and subtypes in lambs and goat kids in Algeria. *Parasit Vectors*, 11: 582.
47. **BAROUDI D., KHELEF 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. *Veterinary Parasitology*, 196: 334–340.
48. **BAROUDI D., KHELEF 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. *Veterinary Parasitology*, 8:66-69.
49. **BARR S.C., JAMROSZ G.F., HORNBUCKLE W.E., BOWMAN D.D., FAYER R., 1994-**Use of paromomycin or treatment of cryptosporidiosis in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 205: 1742-1743.
50. **BARTELT L. A., SARTOR R. B., 2015-** Avancées dans la compréhension de *Giardia* : déterminants et mécanismes des séquelles chroniques. *F1000Prime Reports*, 7: 62.
51. **BARTELS C.J., HOLZHAUER M., JORRITSMA R., SWART W.A., LAM T.J., 2010** - Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med.*,93:162–169.
52. **BAUSSIÉ M., DUMONT M., 1984-** La cryptosporidiose. Observations cliniques dans la région de Montceau-Les- Mines. In Cryptosporidiose du jeune ruminant. In NAVETAT H. *Espinase J.*, 65-71.
53. **BAXBY D., HART C.A., TAYLOR C., 1983-**Human cryptosporidiosis: a possible case of hospital cross infection. *Br Med J*, 287(6407): 1760-1761.

54. **BAYER R. C., CHAWAN C. B., BIRD F. H., MUSGRAVE S. D., 1975-** Characteristics of the absorptive surface of the small intestine of the chicken from 1 day to 14 weeks of age. *Poult. Sci.*, 54:155–169.
55. **BECKER S.L., LOHOURIGNON L.K., SPEICH B., RINALDI L., KNOPP S., N'GORAN E.K., CRINGOLI G., UTZINGER J., 2011-** Comparison of the Flotac-400 dual technique and the formalin-ether concentration technique for diagnosis of human intestinal protozoan infection. *J Clin Microbiol*, 49: 2183–2190.
56. **BENHASSINE S., AKAM A., BAROUDI D., BOUGRINE F., DJELIEL A., HADJOUJDA M., 2016-** Prévalence et impact sanitaire de *Giardia* spp. chez l'ovin dans la steppe algérienne: Cas de la région d'El-Bayadh. *Renc. Rech. Ruminants*, 23:320.
57. **BENHOUDA D., HAKEME A., SANNELLA A.R., BENHOUDA A., CACCIO S. M., 2017-**First molecular investigation of *Cryptosporidium* spp. in young calves in Algeria. *Parasite*, 24:15.
58. **BEN YOUNES R., LEJOLY-BOISSEAU H., APPRIOU M., TRIBOULEY-DURET J., TRIBOULEY J., 1997-** Étude par la réaction d'immunofluorescence des anticorps dirigés contre l'épithélium intestinal de *Schistosoma Mansoni*, *Parasite*, 4: 17-25.
59. **BENOUIS A., BEKKOUCHE Z., BENMANSO A., 2013-**Epidemiological study of human intestinal parasitosis in the Hospital of Oran (Algeria) *.International Journal of Innovation and Applied Studies. 2:* 2028-2093.
60. **BERCHTOLD J., 2009-** Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*, 25:73–99.
61. **BERKMAN D. S., LESCANO A. G., GILMAN R. H., LOPEZ S. L., BLACK M. M., 2002-** Effects of stunting, diarrhoeal disease, and parasitic infection during infancy on cognition in late childhood: a follow-up study. *Lancet*, 359 : 564–571.
62. **BERN C., ORTEGA Y., CHECKLEY W., ROBERTS J. M., LESCANO A. G., CABRERA L., 2002-**Epidemiologic differences between cyclosporiasis and cryptosporidiosis in Peruvian children. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6):581-585.
63. **BEYER E. C., BARONDES S. H., 1982-** Secretion of endogenous lectin by chicken intestinal goblet cells. *J. Cell Biol.*, 92:28–33.
64. **BIALEK R., BINDER N., DIETZ K., JOACHIM A., KNOBLOCH J., ZELCK U.E., 2002-** Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43 (4): 283-288.
65. **BIDEROUNI F.T., SALEHI N., 2014-** Detection of *Cryptosporidium* infection by modified ziehl-neelsen and PCR methods in children with diarrheal samples in pediatric hospitals in Tehran. *Spring*; 7(2): 125–130.
66. **BIU A. A., KYARI F., JOHN W. M., 2012-** Prevalence of intestinal parasites in school aged pupils in Mafa Local Government Area of Borno State, Nigeria. *Journal of Medicine and Applied Biosciences*, 4 : 54 – 55.

67. **BJÖRKMAN C., SVENSSON C., CHRISTENSSON B., DE VERDIER K., 2003-** *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in Calf Diarrhoea in Sweden. *Acta Vet Scand.*; 44(3): 145–152.
68. **BLAGBURN B.L., BUTLER J.M., 2006-** Optimize intestinal parasite detection with centrifugal faecal flotation. *Vet Med*,101(7): 455-464.
69. **BLONCOU J., 2003-** Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail, Europe et régions chaudes (Maladies bactériennes Mycoses, Maladies parasitaires), *Londres, Paris, newyork*, Tom (02):1761.
70. **BONNIN A., CAMERLYNCK P., 1989-** Cryptosporidiose humaine - Aspects épidémiologiques et cliniques. *Méd. Maladies Infect.*, 19: 35-41.
71. **BONNIN A., DUBREMETZ J.F., LOPEZ J., VAGNER O., CUISENIER B., 1998-** Infections à cryptosporidies et à *Cyclospora*. *Encycl. Méd. Chir. Maladies infectieuses*, 8:9.
72. **BOSCHI-PINTO C., VELEBIT L., SHIBUYA K., 2008-** Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ*, 86: (9): 710–717.
73. **BOURDEAU P., 1993-** Les giardioses des carnivores. *Rec. Méd. Vét.*,169: 393-400.
74. **BOUREE. P, LANCON. A., 2005 -** Cyclosporose : une nouvelle parasitose intestinale, *Rev. Prat. Med. Gen.* 19 :1220-1222.
75. **BOUZA M., MACIQUES I., TORRES D., NUÑEZ F.A., 2000-***Giardia lamblia* chez la gerbille mongole: caractéristiques de l'infection par différents isolats humains. *Exp Parasitol*, 96 (1): 43–46.
76. **BOUZID M., HUNTER P.R., CHALMERS R.M., TYLER K.M., 2013-** *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin Microbiol Rev*,26(1):115-134.
77. **BROGLIA A., RECKINGER S., CACCIO S. M. ET NOČKLER K., 2008-** Distribution of *Cryptosporidium parvum* subtypes in calves in Germany. *Vet. Parasitol.*, 154:8–13.
78. **BROOKER S., CLEMENT A. C., BUNDY D. A., 2006-** Global epidemiology, ecology and control of soil- transmitted helminth infections. *Advance in Parasitology*, 62: 221 – 261.
79. **BUDDINGTON R. K., DIAMOND J. M., 1989-** Ontogenetic development of intestinal nutrient transporters. *Annu Rev Physiol*, 51:601–619.
80. **BURET A.G., 2008-** Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalius*. *Parasite* , 15 :261–265.
81. **CACCIO S. M., GIACOMO M., POZIOE., 2002-** Sequence analysis of the b-giardin gene and development of a polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *International Journal for Parasitology*,32: 1023–1030.
82. **CACCIO S.M., THOMPSON R.C.A., MCLAUHLIN J., SMITH H.V., 2005-** Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol*, 21: 430–437.
83. **CAMA V.A., BERN C., SULAIMAN I.M., GILMAN R.H., TICONA E., VIVAR A., 2003-** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima. *J Eukaryot Microbiol*, 50: 531-533.

84. **CAMA V., GILMAN R.H., VIVAR A., TICONA E., ORTEGA Y., BERN C., XIAO L., 2006-** Mixed *Cryptosporidium* infections and HIV. *Emerg. Infect. Dis.*, 12: 1025–1028.
85. **CAREY C.M., LEE H., TREVORS J.T., 2004-** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Res.*, 38 :818-862.
86. **CASEMORE D.P., 1991-** Laboratory methods for diagnosing cryptosporidiosis. *Journal of clinical pathology*, 44:445-451.
87. **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(11): 1598-1604.
88. **CHALMERS R. M., GILES M., 2010-** Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5):1487-1497.
89. **CHALMERS R.M., KATZER F., 2013-** Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trends Parasitol*, 29: 237–251.
90. **SHANE A.L., MODY R.K., CRUMP J.A., TARR P.I., STEINER T.S., KOTLOFF K., LANGLEY J.M., WANKE C., WARREN C.A., CHENG A.C., CANTEY J., PICKERING L.K., 2017-** Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. *Clin. Infect. Dis*;65(12): 45-80.
91. **CHANG M.D., TONG P.D., AMEEN M.D., 2010-** Ischemic Colitis and Complications of Constipation Associated With the Use of Alosetron Under a Risk Management Plan: Clinical Characteristics, Outcomes, and Incidences. *The American Journal of Gastroenterology*, 105 : 866–875.
92. **CHARTIER C., 2001-** Neonatal enteritis in ruminants.Epidemiology of cryptosporidiosis. *Le Point Vétérinaire*, 3: 2-6.
93. **CHARTIER C., PARAUD C., 2010-**La cryptosporidiose des ruminants. *Bull. GTV.*, 52:109-118.
94. **CHARTIER C., MALLEREAU-PELLET M. P., MANCASSOLA R., NUSSBAUM D., 2002-** Detection of *Cryptosporidium* oocysts from goat kid faeces: comparison of a latex agglutination test with three other conventional techniques. *Veterinary Research*, 33: 169-77.
95. **CHASSANY O., MICHAUX A., BERGMANN J.F., 2000-**Drug-induced diarrhoea. *Drug Saf*, 22:53-72.
96. **CHECKLEY W., GILMAN R. H., BLACK R. E., EPSTEIN L. D., CABRERA L., STERLING C. R. , MOULTON L. H., 2004-** Effect of water and sanitation on childhood health in a poor Peruvian peri-urban community. *Lancet*, 363:112- 118.
97. **CHECKLEY W., GILMAN R. H., BLACK R. E., LESCANO A. G., CABRERA L., TAYLOR D. N., MOULTON L. H., 2002-** Effects of nutritional status on diarrhea in Peruvian children. *J Pediatr*, 140: 210-218.
98. **CHEN X.M., KEITHLY J.S., PAYA C.V., LARUSSO N.F., 2002-**Cryptosporidiosis. *N Engl J Med*, 346(22): 1723-1731.

99. **CHIANG Y.C., LIAO W.W., FAN C.M., PAI W.Y., CHIOU C.S., TSEN H.Y., 2008-** PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.*, 121: 66–73.
100. **CHO Y.I., YOON K.J., 2014-** An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci.*, 15(1): 1–17.
101. **CHOLLET Y., MARTRENCAR A., BOUCHE D., NJOYA A., 1994-** Épidémiologie des parasitoses digestives des jeunes bovins dans le Nord-Cameroun. *Parasitologie*, 47 (4): 365-374.
102. **CHOY S.H., AL-MEKHLAFI H.M., MAHDY M.M.K., NASR M.N., SULAIMAN M., LIM Y. A. L., Surin J., 2014-** Prevalence and Associated Risk Factors of *Giardia* Infection among Indigenous Communities in Rural. *Malaysia Sci Rep.*, 4:1-6.
103. **CLARK D.P., 1999-** New Insights into Human Cryptosporidiosis, *Clin.Microbiol.Rev.*, 12 (4):554-563.
104. **CLARKE T.J., REID C.S.W., 1970-** Legume bloat. In: Philipson AT, editor. *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant. Newcastle Upon Tyne, England: Oriel Press.* pp 599– 606.
105. **COELHO W.M.D., AMARANTE A.F.T.D., SOUTELLO R.V.G.D., MEIRELES M.V., BRESCIANI K.D.S., 2009-** Occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples of cats in Andradina City, Saõ Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18(2): 46–49.
106. **CONNELLY J.T., NUGEN S.R., BOREJSZA-WYSOCKI W., DURSTR.A. , MONTAGNA R.A. , BAEUMNER A.J., 2008-** Human pathogenic *Cryptosporidium* species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability. *Anal. Bioanalytical Chem.*, 391: 487-495.
107. **CONNELLY L., CRAIG B.H., JONES B., ALEXANDER C.L., 2013-**Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. within a remote population of Soay Sheep on St. Kilda Islands, Scotland. *Appl Environ Microbiol*, 79(7): 2240-2246.
108. **CRINGOLI G., 2006-** FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia*, 48: 381–384.
109. **CRINGOLI G., RINALDI L., ALBONICO M., BERGQUIST R., UTZINGER J., 2013-** Geospatial(s) tools: Integration of advanced epidemiological sampling and novel diagnostics. *Geospatial Health*,7(2):399-404.
110. **CRINGOLI G., RINALDI L., MAURELLI M.P., UTZINGER J., 2010-**FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc.* 5:503–515.
111. **CURRENT W.L., REESE N.C., ERNST J.V., BAILEY W.S., HEYMAN M.B., WEINSTEIN W.M., 1983-** Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of an outbreak and experimental transmission. *N Engl J Med*, 308: 1252-1257.
112. **DĂRĂBUS G.H., COSOROABA I., OPRESCU I., MORARIU S., 2001-** Epidémiologie de la cryptosporidiose chez les animaux dans l’Ouest de la Roumanie. *Rev. Méd. Vét.*, 152 (5): 399-404.
113. **DAUGSCHIES A., NAJDROWSK M., 2005-** Eimeriosis in Cattle: Current understanding. *J Vet Med B*, 52:417- 427.

114. **DAVID É. B., GUIMARÃES S., OLIVEIRA A.P., OLIVEIRA-SEQUEIRA T.,BITTENCOURT G.N., NARDI A.M., RIBOLLA P.E.,FRANCO R. B., BRANCO N., TOSINI F., A. BELLA, POZIO E. ,CACCIÒ S. M., 2015-** Molecular characterization of intestinal protozoa in two poor communities in the State of São Paulo, Brazil.*Parasites & Vectors*, 8: 2-10.
115. **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. *International Journal for Parasitology*, 29:1269-1287.
116. **DELAFOSSÉ A., CASTRO-HERMIDA J.A., BAUDRY C., ARES-MAZAS E. , CHARTIER C., 2006-** Herd-level risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy-goat kids in western France. *Preventive Veterinary Medicine*, 77: 109–121.
117. **DE SILVA N., GUYATT H., BUNDY D., 1997-** Antihelminths - a comparative review of their clinical pharmacology.*Drugs*, 53 (5) :769-788.
118. **DESWYSEN A.G., ELLIS W.C., 1988-** Site and extent of neutral detergent fiber digestion, efficiency of ruminal digesta flux and fecal output as related to variations in voluntary intake and chewing behavior in heifers. *J Anim Sci*, 66: 2678-2686.
119. **DIANOU D., PODA J. N., SAVADOGO L. G., SORGHO H., WANGO S. P., SANDO B., 2004-** Parasitoses intestinales dans la zone du complexe hydroagricole du Sourou au Burkina Faso. *La revue en sciences de l'environnement*, 5(2): 2-6.
120. **DÍAZ-LEE A., MERCADO R., ONUOHA E.O., OZAKI L.S., MUÑOZ P., MUÑOZ V., FREDÉS F., 2011-***Cryptosporidium parvum* in diarrheic calves detected by microscopy and identified by immunochromatographic and molecular methods. *Vet Parasitol.*, 176 (2):139–44.
121. **DIERS J., MCCALLISTER G.L., 1989-** Occurrence of *Cryptosporidium* in home daycare centers in west-central Colorado. *J Parasitol*, 75(4): 637-638.
122. **DILLARD K.J., SAARI S.A., ANTTILA M., 2007-** *Strongyloides stercoralis* infection in a Finnish kennel. *Acta. Vet. Scand.*, 49:37-42.
123. **DORCHIES P., DUNCAN J., LOSSON B., ALZIEU J.P., 2012-** VADEMECUM de parasitologie clinique des bovins. chapitre 4 Protozooses. *Editions Med'Com*, Paris: 342- 421.
124. **D.S.A., 2016-** Direction des Services Agricole. [En ligne] Accès internet: <http://www.wilaya-batna.gov.dz/fr/content/la-direction-des-services-agricoles>
125. **DRYJANSKI J., GOLD J.M., RITCHIE M.T., KURTZ R.C., LIM S.L., ARMSTRONG D., 1986-** Cryptosporidiosis. Case report in a health team worker. *Am J Med*, 80(4): 751-752.
126. **DURANTI A., CACCIO S.M., POZIO E., DI EGIDIO A., DE CURTIS M., BATTISTI A., SCARAMOZZINO P., 2009-** Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in cattle. *Zoonoses Public Health*, 56: 176–182.
127. **EL KETTANI S., AZZOUZI E.M., MAATA A., 2006-** Prévalence de *Giardia intestinalis* chez une population rurale utilisant les eaux usées à des fins agricoles à Settât, Maroc. *Med Mal Infect* ,36 : 322-328.

128. **ELENI K., SISSAY M., AMEHA K., MULUGETA D., 2014-** Prevalence of intestinal parasitic infections and their association with anthropometric measurements of school children in selected primary schools, Wukro Town, Eastern Tigray, Ethiopia. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 52: 43 - 48.
129. **ELQAJ M., BELGHYTI D., AHAMI A., LOUTFI H., EL KHARRIM K., TABOZ Y., 2009-** Prévalence des parasitoses intestinales chez les écoliers en milieu rural Kenitra – Maroc. *World Journal of Biological Research*, 2: 1-6.
130. **ERLANDSEN S. L., MEYER E. A., 1984-** *Giardia* and Giardiasis: *Biology, Pathogenesis, and Epidemiology.*, New York and London : 522-526.
131. **ERNST J.V., STEWART T.B., WITLOCK D.R., 1987-**Quantitative determination of coccidian oocysts in beef calves from the coastal plain area of Georgia (USA). *Vet Parasitol* , 23:1-10.
132. **ESSID R., MOUSLI M., AOUN K., ABDELMALEK R., MELLOULI F., KANOUN F., DEROUIN F., BOURATBINE A., 2008-** Identification of *Cryptosporidium* species infecting humans in Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 702–705.
133. **FALK P.G., HOOPER L.V., MIDTVEDT T., GORDON J.I., 1998-** Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microb Mol Biol Rev*, 62: 1157-1170.
134. **FAUBERT G., 2000-** Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13: 35–54.
135. **FAUSTINI A., MARINACCI C., FABRIZI E., MARANGI M., RECCHIA O., PICA R., GIUSTINI F., LA MARCA A., NACCI A., PANICHI G., PERUCCI C. A., 2006-**The impact of the Catholic Jubilee in 2000 on infectious diseases. A case-control study of giardiasis, Rome, Italy 2000–2001. *Epidemiol. Infect*, 134:649–658.
136. **FAYE B., DIENG T., TINE R.C., DIOUF L., SYLLA K., NDIAYE M., SOW D., NDIAYE J.L., NDIAYE D., NDIAYE M., BADIANE A.S., SECK M.C., DIENG Y., FAYE O., NDIR O., GAYE O., 2013-** Cryptosporidiosis in Senegalese children: prevalence study and use of ELISA serologic diagnosis. *Bull Soc Pathol Exot*, 106(4):258-263.
137. **FAYE O., N'DIR O., GAYE O., DIENG Y., DIENG T., BAH I.B., DIALLO S., 1998-** Les parasitoses intestinales dans le bassin du fleuve Sénégal. Résultats d'enquêtes effectuées en milieu rurale, *Méd. Afrique Noire*, 45(8/9) :491-495.
138. **FAYER R., 2004-** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol*, 126: 37–56.
139. **FAYER R., 2010-** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental Parasitology*, 124: 90–97.
140. **FAYER R., MORGAN U., UPTON S.J., 2000-** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.*, 30:1305–1322.
141. **FAYER, R., SPEER, C.A., DUBEY, J.P., 1997-** The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton, Floride, *Etats-Unis, presse CRC*:1–41.

142. **FAYER R., SANTI'N M., TROUT J. M., 2008-** *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Veterinary Parasitology*, 156:191–219.
143. **FAYER R., SANTI'N 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.
144. **FAYER R., XIAO L., 2007-** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis .second edition .*CRC Press*, Boca Raton:560-566.
145. **FAYER R., UNGAR B.L.P., 1986-** *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.*, 50 (4): 458- 483.
146. **FELTON J.M., HARRIES A.D., BEECHING N.J., ROGERSON S.J., NYE F.J., 1990-** *Acute gastroenteritis: the need to remember alternative diagnoses. Postgrad Med J*, 66: 1037–1039.
147. **FENG Y., ORTEGA Y., HE G., DAS P., XU M., ZHANG X., FAYER R., GATEI W., CAMA V.L.X., 2007-**Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.*, 144 : 1–9.
148. **FENG Y., YANG W., RYAN U., ZHANG L., KVAC M., KOUDELA B., 2011-**Development of a multilocus sequence tool for typing *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium andersoni*. *J. Clin. Microbiol.* 49:34–41.
149. **FENG Y., XIAO L., 2011-** Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24(1):110-40.
150. **FERNANDEZ F.R.S., HINTON M., BEDFORD M. R., 2000-** Diet influences the colonisation of *Campylobacter jejuni* and distribution of mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.*, 57:1793–1801.
151. **FIKRU R., TESHALE S., RETA D., YOSEF K., 2006-** Epidemiology of gastro intestinal parasites of ruminants in Western Oromia Ethiopia. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine.* 4:51–57.
152. **FRANC M., CADIERGUES M.C., MARCHAND A., BOURDOISEAU G. ,BUSSIERAS J., 1997-** Le parasitisme intestinal des carnivores domestiques: bilan d'une enquête conduite dans les quatre écoles vétérinaires françaises. *Rev. Méd. Vét.*, 148: 247-250.
153. **FREEMAN J., WILCOX M.H., 1999-** Antibiotics and *Clostridium difficile*. *Microb Infect*, 1: 377-384.
154. **FRICKER C.R., CRABB J.H., 1998-**Water-borne cryptosporidiosis: detection methods and treatment options, *Adv. Parasitol.*,40 : 241–278.
155. **FURNESS J. B., COTTRELL J. J., BRAVO D. M., 2015-** Comparative Gut Physiology Symposium: Comparative physiology of digestion. *American Society of Animal*,96 (3):2-12.
156. **GARCIA L.S., BRUCKNER D.A. , BREWER T.C.,SHIMIZU R.Y., 1983-** Techniques de récupération et d'identification des oocystes de *Cryptosporidium* à partir d'échantillons de selles. *Journal of Clinical Microbiology*, 18 (1): 185-190.

157. **GARCIA 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. *American Society for Microbiology*, 35(6): 1526–1529.
158. **GARCIA L. S., SHIMIZU R. Y., 2000-** Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38:1267-1268.
159. **GARCIA L. S., SHUM A. C., BRUCKNER D. A., 1992-** Evaluation of a new monoclonal antibody combination reagent for direct fluorescence detection of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 30:3255-3257.
160. **GARDNER T.B. , HILL D.R., 2001-** Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:114–128.
161. **GATEI W., WAMAE C.N., MBAE C., WARURU A., MULINGE E., WAITHERA T., GATIKA S.M., KAMWATI S.K., REVATHI G., HART C.A., 2006-** Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis and symptoms associated with infections in children in Kenya. *Am J Trop Med Hyg*, 75: 78-82.
162. **GENDREL D., TRELUYER J. M., RICHARD-LENOBLE D., 2003-** Parasitic diarrhea in normal and malnourished children. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 17 :189–197.
163. **GEURDEN T., BERKVENS D., MARTENS C., CASAERT S., VERCRUYSSSE J., CLAEREBOU E., 2007-** Molecular epidemiology with subtype analysis of *Cryptosporidium* in calves in Belgium. *Parasitology*, 134: 1981–1987.
164. **GEURDEN T., GELDHOF P., LEVECKE B., MARTENS C., BERKVENS D., CASAERT S., VERCRUYSSSE J., CLAEREBOU E., 2008-** Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *International Journal for Parasitology*, 38:259–264.
165. **GEURDEN T., GOMA F., SIWILA J., PHIRI I., MWANZA A., GABRIEL S., CLAEREBOU E., VERCRUYSSSE J., 2006-**Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in three cattle husbandry systems in Zambia. *Vet. Parasitoll*, 138: 217-222.
166. **GIANGASPERO A., CIRILLO R., LACASELLA V., LONIGRO A., MARANGI M. , CAVALLO P. , BERRILLI F., DI CAVE D. , BRANDONISIO O., 2009-** *Giardia* and *Cryptosporidium* in inflowing water and harvested shellfish in a Lagoon in Southern Italy, *Parasitology International*, 58(1): 12–17.
167. **GILBERT S.F., 1997-** Early Vertebrate development: mesoderm and endoderm. in *Developmental Biology*. 5th ed. *Sinauer Assoc.*, Sunderland, MA:341–382.
168. **GLINZ D., SILUE' K.D., KNOPP S., LOHOURIGNON L.K., YAO K.P. , STEINMANN P., RINALDI L., CRINGOLI .G, N'GORAN E.K., UTZINGER J., 2012-** Comparing diagnostic accuracy of Kato-Katz, Koga agar plate, etherconcentration, and FLOTAC for *Schistosoma mansoni* and soil-transmitted helminths. *PloS Negl Trop Dis*, 4(7): 1-9.
169. **GOLDSMITH R.S., 1998-**Médicaments antiprotozoaires en pharmacologie fondamentale et clinique (Katzung, BG, ed) *Appleton-Lange*: 838-861.

170. **GOMEZ-COUSO H., AMAR C.F.L., MC LAUHLIN J., ARES-MAZAS E., 2005-** Characterization of a *Cryptosporidium* isolate from water buffalo (*Bubalus bubalis*) by sequencing of a fragment of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein gene (COWP). *Vet. Parasitol.*, 131:139–144.
171. **GOODGAME R.W., GENTA R.M., WHITE A.C., CHAPPELL C.L., 1993-** Intensity of infection in AIDS-associated cryptosporidiosis. *J. Infect. Dis.*, 167: 704-709.
172. **GOODGAME R.W., KIMBALL K., WHITE A.C., GENTA R.M., LIFSCHITZ C.H., 1995-** Intestinal function and injury in acquired immunodeficiency syndrome-related cryptosporidiosis. *Gastroenterology*, 108(4): 1075-1082.
173. **GOW S., WALDNER C., 2006-** An examination of the prevalence of and risk factor for shedding of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in cows and calves western Canadian cow-calf herds. *Vet Parasitol.* ,137(1-2):50–61.
174. **GRACZYK T.K., SHIFF C.K., TAMANG L., MUNSAKA F., BEITIN A.M., MOSS W.J., 2005-** The association of *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* with diarrheal stools in Zambian school-age children. *Parasitol Res*, 98:38-43.
175. **GRAVET A., RONDEAU M., HARF-MONTEIL C., 1999-** Predominant *Staphylococcus aureus* Isolated from Antibiotic-Associated Diarrhea Is Clinically Relevant and Produces Enterotoxin A and the Bicomponent Toxin LukE-LukD. *J Clin Microbiol.*, 37(12): 4012–4019.
176. **GRIMASON A.M., SMITH H.V., PARKER J.F.W., BUKHARI Z., CAMPBELL A.T., ROBERTSON L.J.,1994-** Application of DAPI and immunofluorescence for enhanced identification of *Cryptosporidium* spp. oocysts in water samples. *Water Research*, 28(3):733-736.
177. **GRIT G.H., BÉNÉRÉ E., EHSAN A., DE WILDE N., CLAEREBOU E.,VERCRUYSE J., MAES L., GEURDEN T., 2012-** *Giardia duodenalis* cyst survival in cattle slurry. *Vet Parasitol.*, 184(2-4):330-334.
178. **GUALDIERI L., RINALDI L., PETRULLO L., MORGOGNONE M. E., MAURELLI M. P., MUSELLA V., PIEMONTE M., CARAVANO L., COPPOLA M. G., CRINGOLI G., 2011-** Intestinal parasites in immigrants in the city of Naples (southern Italy). *Acta Tropica*, 117: 196–201.
179. **GUERRANT R.L., 1997-**Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerg Infect Dis*, 3(1): 51-57.
180. **GUERRANT R.L., ORIA R.B., MOORE S.R., SCHARF R., LIMA A.A., 2008-** Enteric protozoa and human potential. *Ann Trop Paediatr*, 31(3): 201- 203.
181. **GÜL A., ÇIÇEK M., KILINÇ Ö., 2008-** Prevalence of *Eimeriaspp.*, *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in Calves in the Van Province. *Türk. Parazitol. Derg.*,32(3):202-204.
182. **GUNATHILAKA N., NIROSHANA D., AMARASINGHE D., UDAYANGA L.,2018-**Prevalence of Gastrointestinal Parasitic Infections and Assessment of Deworming Program among Cattle and Buffaloes in Gampaha District, Sri Lanka. *Biomed Res Int.*, 18:6-8.
183. **GÜNTHER H., 1983-**Kryptosporidien beim kalb Bedeutung, Nachweis, Bekämpfung (Cryptosporidia in calf importance, detection, control). *Mh. Vet. Med.*, 28:653-655.

184. **GUPTA S., KUMAR S., SATAPATHY A., RAY U., CHATTERJEE S., CHOUDHURY T. K., 2012-** *Ascaris lumbricoides*: an unusual aetiology of gastric perforation. *JSCR*, 11:1-2.
185. **HALL J.B., SILVER S., 2014** - Nutrition and Feeding of the Cow-Calf Herd: Digestive System of the Cow. *Virginia Cooperative Extension*.10: 1-2.
186. **HARP J.A., WOODMANSEE D., MOON H.W., 1990-** Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infect Immun*, 58:2237-2240.
187. **HENRIKSEN S., POLENZ J.F.L., 1981-**Staining of *Cryptosporidia* by a modified Ziehl-Neelsen technique.*Acta Vet. Scand.*, 22: 594-596.
188. **HERGES G. R., WIDMER G., CLARK M. E., KHAN E., GIDDINGS C. W., BREWER M., MCEVOY J. M., 2012-** Evidence that *Cryptosporidium parvum* populations are panmictic and unstructured in the upper midwest of the United States. *Applied and Environmental Microbiology* ,78:8096– 8101.
189. **HIJJAWI N.S., MELONI B.P., NG'ANZO M., RYAN U.M., OLSON M.E., COX P.T., 2004-** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Int J Parasitol*, 34: 769-777.
190. **HILL K.J., 1983-**Physiology of the digestive tract. *Physiology and biochemistry of domestic fowl*.,4:31-49.
191. **HOCINE A.R., BOUZID R., LADJAMA M.,KHALEF D., 2016-** Prevalence of *Cryptosporidium* Oocysts in Calves in Aereas from Aestern Algeria. *Global Veterinaria*, 17(4): 335-342.
192. **HOFMANN R.R., 1989-** Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive systems. *Oecologia*, 78: 443-457.
193. **HOLBERTON D., BAKER D.A., MARSHALL J., 1988-** Segmented alpha-helical coiled-coil structure of the protein giardin from the *Giardia* cytoskeleton. *J. Mol. Biol.*, 204: 789–95.
194. **HOQUE K.M., BINDER H.L., 2006-** Zinc in the treatment of acute diarrhea : current status and assessment. *Gastroenterology*,130 (7) :2201-2205.
195. **HUETINK R.E.C., VANDER GIESSEN J.W.B., NOORDHUIZEN J.P.T.M., PLOGER H.W., 2001-** Epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* on a dairy farm.*Vet. Parasitol*.102:53-57.
196. **HUNTER P.R., CHALMERS R.M., SYED Q., HUGHES L.S., WOODHOUSE S., SWIFT L.,2003-** Foot and mouth disease and cryptosporidiosis: possible interaction between two emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis*, 9: 109-112.
197. **HUNTER P.R., HADFIELD S.J., WILKINSON D., LAKE I.R., HARRISON F.C., CHALMERS R.M., 2007-**Subtypes of *Cryptosporidium parvum* in humans and disease risk. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 82–88.
198. **HUR T.Y., JUNG Y.H., CHOE C.Y., CHO Y.I., KANG S.J., LEE H.J., KI K.S., BAEK K.S., SUH G.H., 2013-** The dairy calf mortality: the causes of calf death during ten years at a large dairy farm in Korea. *Korean J Vet Res.*, 53:103–108.
199. **IGNATIUS R., LEHMANN M., MIKSITS K., REGNATH T., ARVAND M., ENGELMANN E., FUTH U., HAHN H. ,WAGNER J., 1997-** A New Acid-Fast Trichrome Stain for Simultaneous

- Detection of *Cryptosporidium parvum* and Microsporidial Species in Stool Specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 35(2):446-449.
200. **IMWONG M., TANOMSING N., PUKRITTAYAKAMEE S., DAY N.P., WHITE N.J., SNOUNOU G., 2009-** Spurious amplification of a *Plasmodium vivax* small-subunit RNA gene by use of primers currently used to detect *P. knowlesi*. *J Clin Microbiol* , 47(12):4173-4175.
201. **IQBAL A., LIM Y.A., SURIN J., SIM B.L., 2012-** High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/ AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One*, 7(2):1-7.
202. **IQBAL J., HIRA P.R., AL-ALI F., PHILIP R., 2001-** Cryptosporidiosis in Kuwaiti children: Seasonality and endemicity. *Clin Microbiol Infect* , 7:261-266.
203. **ISSA R., 2014-** Non-Pathogenic Protozoa *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(3):30-40.
204. **IZZO M.M., KIRKLAND P.D., MOHLER V.L., PERKINS N.R., GUNN A.A., HOUSE J.K., 2011-** Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust Vet J.*, 89:167–173.
205. **JACKSON B.R., GRIFFIN P.M., COLE D., WALSH K.A., CHAI S.J., 2013-** Outbreak associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis* ,19:1239–1244.
206. **JAYNE-WILLIAMS D. J., FULLER R., 1971-** The influence of the intestinal microflora on nutrition. in Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl. D. J. Bell and B. M. Freeman, ed. *Academic Press*, New York : 73–87.
207. **JEANDRON A., ABDYLDAIEVA G., USUBALIEVA J., ENSINK J. H.J., COX J., MATTHYS B., RINALDI L., CRINGOLI G., UTZINGER J., 2010-**Accuracy of the Kato-Katz, adhesive tape and FLOTAC techniques for helminth diagnosis among children in Kyrgyzstan. *Acta Tropica*, 116:185–192.
208. **JEANDRON A., RINALDI L., ABDYLDAIEVA G., USUBALIEVA J., STEINMANN P., CRINGOLI G. ,UTZINGERE J., 2011-** Human infections with *Dicrocoelium dendriticum* in Kyrgyzstan: the tip of the iceberg? *J Parasitol*,97:1170–1172.
209. **JEX A. R., SMITH H.V., MONIS P.T., CAMPBELL B.E., GASSER R.B., 2008-***Cryptosporidium* - Biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. *Biotechnology Advances*, 26 (4):304-317.
210. **JOHNSTON S. P., BALLARD M. M., BEACH M. J., CAUSER L., WILKINS P. P., 2003-** Evaluation of Three Commercial Assays for Detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* Organisms in Fecal Specimens. *J Clin Microbiol.*, 41(2): 623–626.
211. **JOHNSTON S.P., BALLARD M.M., BEACH M.J., CAUSER L., WILKINS P.P., 2003-** Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 41(2):623-626.
212. **JOKIPII L., JOKIPII A.M.M., 1974-**Giardiasis in travelers: a prospective study. *J. Infect. Dis.*, 130: 295–299.

213. **JUNGMANN R., HEIPE T., 1983-** Vorkommen und Intravitaldiagnostik der Kryptosporidiose bei neugeborenen Kalbern (Occurrence and diagnosis of cryptosporidiosis in newborn calves). *Mh. Vet. Med.*, 8 (38): 299-300.
214. **KARANIS P., EIJI T., PALOMINO L., BOONROD K., PLUTZER J., ONGERTH J., IGARASHI I., 2010-**First description of *Cryptosporidium bovis* in Japan and diagnosis and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in diarrheic pre-weaned calves in Hokkaido. *Vet Parasitol.*, 169:387–390.
215. **KARANIS P., KOURENTI C., SMITH H., 2007-** Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*, 5: 1-38.
216. **KATANIK M.T., SCHNEIDER S. K. , ROSENBLATT J. E., HALL G. S., PROCOP G.W., 2001-**Évaluation du test ColorPAC *Giardia / Cryptosporidium* Rapid et du test ProSpecT sur microplaque *Giardia / Cryptosporidium* pour la détection de *Giardia* et *Cryptosporidium* dans des échantillons de selles. *J Clin Microbiol* , 39 (12): 4523-4525.
217. **KATO S., JENKINS M., FOGARTY E., BOWMAN D., 2004-** *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in field soil and its relation to soil characteristics: analyses using the geographic information systems. *Sci Total Environ*,321(3): 47-58.
218. **KAUSHIK K.,KHURANA S. ,WANCHU A.,MALLA N., 2009-** Serum immunoglobulin G, M and A response to *Cryptosporidium parvum* in *Cryptosporidium*-HIV co-infected patients. *Infectious Diseases*, 9:5-7.
219. **KEHL K. S. C., CICIRELLO H., HAVENS P. L., 1995-** Comparison of four different methods for the detection of *Cryptosporidium* species. *J. Clin. Microbiol.* 33:416-418.
220. **KENNEDY P.M., MURPHY M.R., 1988-** The nutritional implications of differential passage of particles through the ruminant alimentary tract. *Nutr Res Rev*, 1: 189-208.
221. **KHAN W.A., ROGERS K.A., KARIM M.M., AHMED S., HIBBERD P.L., CALDERWOOD S.B., RYAN E.T., WARD H.D., 2004-** Cryptosporidiosis among Bangladeshi children with diarrhea: a prospective, matched, casecontrol study of clinical features, epidemiology and systemic antibody responses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 71(4): 412-419.
222. **KHELEF., D SAÏB M. Z., AKAM A., KAIDI R., CHIRILA V., COZMA V., ADJOU K.T., 2007-**Épidemiologie De La Cryptosporidiose Chez Les Bovins En Algérie.*Revue Méd. Vét.* , 158(5) : 260-264.
223. **KIELA P.R., GHISHAN F.K., 2012-** Na⁺-H⁺ exchange in mammalian digestive tract. In: Johnson LR, editor. *Physiology of the gastrointestinal tract. Academic Press*, 1781–818.
224. **KIELA P.R., GHISHAN F. K., 2016-** Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*,30(2): 145–159.
225. **KITAGAWA Y., UEDA M., ANDO N., ENDO M., ISHIBIKI K., KOBAYASHI Y., ARAI T., KITAJIMA M.,1996-** Rapid diagnosis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia by nested polymerase chain reaction. *Ann Surg.*, 224(5): 665–671.

226. **KIRKPATRICK C., 1986** -La giardiase féline.un examen, *Jornal of small animal practice*, 27 (2): 69-80.
227. **KNOPP S., MGENI A.F., KHAMIS I.S., STEINMANN P., STOTHARD J.R., ROLLINSON D., MARTI H., UTZINGER J., 2008**- Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: effect of multiple stool sampling and use of different diagnostic techniques. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2(11): 2-7.
228. **KNOPP S., GLINZ D., RINALDI L., KHALFAN A. M., N'GORAN E. K., STOTHARD J. R., MARTI H., CRINGOLI G., ROLLINSON D., UTZINGER J., 2009a**- FLOTAC: A promising technique for detecting Helminth eggs in human faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103: 119 - 194.
229. **KNOPP S., RINALDI L., KHAMIS I.S., STOTHARD J.R., ROLLINSON D., MAURELLI M.P., STEINMANN P., MARTI H., CRINGOLI G., UTZINGER J., 2009b**- A single FLOTAC is more sensitive than triplicate Kato-Katz for the diagnosis of low-intensity soil-transmitted helminth infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103:347–354.
230. **KNOPP S., GLINZ D., RINALDI L., MOHAMMED K.A., N'GORAN E.K., STOTHARD J.R., MARTI H., CRINGOLI G., ROLLINSON D., UTZINGER J., 2010**-FLOTAC: a promising technique for detecting helminth eggs in human faeces. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103:1190–1194.
231. **KNOPP S., SPEICH B., HATTENDORF J., RINALDI L., KHALFAN A. M., KHAMIS I.S., MOHAMMED A. S., ALBONICO M., ROLLINSON D., MARTI H., CRINGOLI G., UTZINGER J., 2011**-Diagnostic Accuracy of Kato-Katz and FLOTAC for Assessing Anthelmintic Drug Efficacy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (5) 4:2-8.
232. **KORICH D.G., MEAD J.R., MADORE M.S., SINCLAIR N.A., STERLING C.R., 1990**- Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol*, 56(5): 1423-1428.
233. **KOSEK M., ALCANTARA C., LIMA A.A., GUERRANT R.L., 2001**- Cryptosporidiosis: an update. *Lancet Infect Dis*,1: 262–269.
234. **KOSEK M., BERN C., GUERRANT R. L., 2003**- The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000, *Bull. W. H. O.*,81:197–204
235. **KROGDAHL A., SELL J. L., 1989**- Influence of age on lipase, amylase, and protease activities in pancreatic tissue and intestinal contents of young turkeys. *Poult. Sci.*, 68:1561–1568.
236. **LAATAMNA A.K., BELKESSA S., KHALIL A., AFIDI A., BENMAHDJOUBA K., BELALMI R., BENKROUR M.,GHAZEL Z., HAKEM A.,AISSI M., 2018**- Prevalence of *Cryptosporidium* spp. in farmed animals from steppe and high plateau regions in Algeria. *Tropical Biomedicine*, 35(3): 724–735.
237. **LAATAMNA A.K., WAGNEROVÁ P., SAK B., KVEŤOVÁ 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. *Veterinary Parasitology*, 208: 135-142.

238. **LAATAMNAA A.K., WAGNEROVÁ P., SAK B., KVEŤOŇNOVÁ D., AISSI M., ROST M., KVÁČ M., 2013-** Equine cryptosporidial infection associated with *Cryptosporidium* hedgehog genotype in Algeria. *Vet. Parasitol*, 197: 350–353.
239. **LANATA C. F., FISCHER-WALKER C. L., OLASCOAGA A. C., TORRES C. X., ARYEE M. J., BLACK R. E., 2013-** Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children ,5 years of age: a systematic review. *PLoS ONE* ,8.
240. **LARKIN E.A., CARMAN R.J., KRAKAUER T., STILES B.G., 2009-** *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Curr. Med. Chem.*, 16 : 4003–4019.
241. **LATIF B., JAKUBEK E.B., 2008-** Determination of the specificities of monoclonal and polyclonal antibodies to *Neospora*, *Toxoplasma* and *Cryptosporidium* by fluorescent antibody test (FAT). *Trop Biomed*,25 (3): 225-231.
242. **LAURENT F., LACROIX-LAMANDE S., 2017-** Rôles des peptides antimicrobiens produits par les cellules de Paneth lors de l'infection par *Cryptosporidium parvum*. *International journal for parasitology*, 47:12, 711-721.
243. **LEARMONTH J.J., IONAS G., EBBETT K.A., KWAN E.S., 2004-**Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. *Appl Environ Microbiol*, 70: 3973-3978.
244. **LEFAY D., NACIRI M., POIRIER P. ,CHERMETTE R., 2000-** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in calves in France. *Vet. Parasitol.*, 89: 1-9.
245. **LEJEUNE M., MOREAU F., AND CHADEE K., 2011-** Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* signals via EP4 receptor and alters claudin-4 to increase ion permeability of tight junctions. *Am. J. Pathol.* 179 : 807–818.
246. **LENG X., MOSIER D. A., OBERST R.D., 1996-** American Society for Microbiology Simplified Method for Recovery and PCR Detection of *Cryptosporidium* DNA from Bovine Feces. *Applied and environmental microbiology*, 62(2): 643–647.
247. **LEONI F., MALLON M.E., SMITH H.V., TAIT A., MCLAUCHLIN J., 2007-** Multilocus analysis of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* from sporadic and outbreak-related human cases and *C. Parvum* from sporadic cases in livestock in the UK. *Journal of Clinical Microbiology*, 45: 3286–3294.
248. **LEROY A., LAUWAET T., DE BRUYNE G., CORNELISSEN M., MAREEL M., 2000-** *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. *FASEB J.*, 14:1139–1146.
249. **LEVECKE B., BEHNKE J.M., AJJAMPUR S.S., ALBONICO M., AME S.M., CHARLIER J., GEIGER S.M., HOA N.T., KAMWA NGASSAM R.I., KOTZE A.C., MCCARTHY J.S., MONTRESOR A., PERIAGO M.V., ROY S., TCHUEM TCHUENTE L.A., THACH D.T., VERCRUYSSSE J., 2011-** A comparison of the sensitivity and fecal egg counts of the McMaster egg

- counting and Kato-Katz thick smear methods for soil-transmitted helminths. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 5 (6):1201.
250. **LEVECKE B., DE WILDE N., VANDENHOUTE E., VERCRUYSSSE J., 2009-** Field validity and feasibility of Four Techniques for the detection of *Trichuris* in simians: a model for monitoring drug efficacy in public health?. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(1): 2-7.
251. **LEVINE M. M., CAPLAN E. S., WATERMAN D., CASH R. A., HORNICK R. B., SNYDER M. J., 1977-** Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect Immun.*, 17(1): 78–82.
252. **LI W., DIAO Y., GONG P., SUO X., LI J., ZHANG X., 2014-** Transient reporter gene expression in oocysts and sporozoites of *Cryptosporidium parvum* controlled by endogenous promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 194: 33–35.
253. **LILLEHOJ H. S., TROUT J. M., 1996-** Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9:349–360.
254. **LOMBARDI V.C., RUSCETTI F.W., DAS GUPTA J., PFOST M.A., HAGEN K.S., PETERSON D.L., RUSCETTI S.K., BAGNI R.K., PETROW-SADOWSKI C., GOLD B., DEAN M., SILVERMAN R.H., MIKOVITS J.A., 2009-** Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science* (New York, N.Y.), 326 (5952): 585-589.
255. **MAC KENZIE W.R., HOXIE N.J., PROCTOR M.E., GRADUS M.S., BLAIR K.A., PETERSON D.E., 1994-**A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *N Engl J Med*, 331: 161-167.
256. **MAHBUBANI M.H., BEJ A.K., PERLIN M.H., SCHAEFER F.W., JAKUBOWSKI W., ATLAS R.M., 1992-** Differentiation of *Giardia duodenalis* from other *Giardia* spp. by using polymerase chain reaction and gene probes. *J. Clin. Microbiol.*, 30:74–78.
257. **MAHADEVAN V., 2014-** Anatomie de l'intestin grêle. *Surgery*, 32(8):391-395.
258. **MAJEWSKA A.C., WERNER A., SULIMA P., LUTY T., 2000-**Prevalence of *Cryptosporidium* in sheep and goats bred on five farms in west central region of Poland. *Vet Parasitol*, 89: 269-275.
259. **MALBERT C.H., RUCKEBUSCH Y., 1987-** Intrinsic motor activity of the ruminant stomach. *Rev Méd Vet*, 138: 155-161.
260. **MALLINATH R. H. K., CHIKKACHOWDAPPA P. G., GOWDA A. K. J., D'SOUZA P. E., 2009-** Studies on the prevalence of cryptosporidiosis in bovines in organized dairy farms in and around Bangalore, South India. *Vet. arhiv.*, 79 :461-470.
261. **MANK T. G., ZAAT J. O. M., DEELDER A. M., EIJK J. T. M., POLDERMAN A. M., 1997-** Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16:615-619.
262. **MANCASSOLA R., REPERANT J.M., NACIRI M., CHARTIER CH. 1995-** Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paramomycin in kids and immunological study. *Antimicrob Agent.s Chemother* 39,75-78.

263. **MARK-CAREW M.P., KHAN Y., WADE S.E., SCHAAF S. AND OMOHAMMED H., 2010-** Incidence of and risks associated with *Giardia* infections in herds on dairy farms in the New York City Watershed. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1):2-7.
264. **MAURELLI M.P., RINALDI L., RUBINO G., LIA R., MUSELLA V., CRINGOLI G., 2014-** FLOTAC and Mini-FLOTAC for uro-microscopic diagnosis of *Capillaria plica* (syn. *Pearsonema plica*) in dogs. *BMC Res Notes*, 7(1):591.
265. **MBAYE P.S., WADE B., KLOTZ F., 2003-**Ascaris et Ascaridiose. *Encycl. Med. Chir., Maladies infectieuses*, 30:8.
266. **MC DONALD V., 1996-** Welcome Trust illustrated history of tropical disease. Cryptosporidiosis. In: Cox FEG, editor. *London, England: The Welcome Trust* : 256–63.
267. **MCLAUHLIN J., AMAR C., PEDRAZA-DIAZ S., NICHOLS G.L., 2000-**Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1 705 fecal samples from humans and 105 faecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol*, 38: 3984-3990.
268. **MEAMAR A. R., GUYOT K., CERTAD G., DEI-CAS E., MOHRAZ M., MOHEBALI M., MOHAMMAD K., MEHBOD A. A., REZAIIE S. , REZAIAN M., 2007-**Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans and animals in Iran. *Appl Environ Microbiol* ,73: 1033–1035.
269. **MEBUS C.A., STAIR E.L., RHODES M.B., TWIEHAUS M.J., 1973-** Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. *Vet Pathol.*,10 :45–64.
270. **MEUTEN D.J., VAN KRUININGEN H.J., LEIN D.H., 1974 -** Cryptosporidiosis in a calf. *J Am Vet Med Assoc*, 165(10):914-917.
271. **MESCHER A. L., 2016-** Junqueira's Basic Histology, 14 Ed. Copyright. India: 297-298.
272. **MEYER E.A., 1994-** *Giardia* as an organism. *Journal of Parasitology*, 73:623–629.
273. **MICHAEL O. H., JOHN H., PIEROL O., 2010-** Epidemiology and control of human gastrointestinal parasites in children. *National Library of Medicine and National Institute of Health*, 8: 219 – 234.
274. **MILLAR B.C., FINN M., XIAO L., LOWERY C.J., DOOLEY J.S., MOORE J.E., 2002-** *Cryptosporidium* in foodstuffs - an emerging aetiological route of human foodborne illness. *Trends Food Sci Technol*, 13: 168- 187.
275. **MILLEMANN Y., ADJOU K., MAILLARD R., POLACK B., CHARTIER C., 2003)-** Le Point Vétérinaire, 233: 22-29.
276. **MING Z., GONG A., WANG Y., ZHANG X.,LI M., MATHY N. W.,STRAUSS -SOUKUP J.K ., CHEN X., 2018-**Involvement of *Cryptosporidium parvum* Cdg7_FLc_1000 RNA in the Attenuation of Intestinal Epithelial Cell Migration via Trans-Suppression of Host Cell *SMPD3* .*The Journal of Infectious Diseases*, 217 (1):122–133.
277. **MIRZA N.B., BHATT K.M., BHATT S.M., KANYI C., 1994-** Cryptosporidiosis in HIV positive patients at Kenyatta National hospital, Nairobi, Kenya. *East Afr. Med. J.*, 71 (5), 334-335.

278. **MISIC Z. , ABE N., 2007-** Subtype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from calves on farms around Belgrade, Serbia and Montenegro, using the 60 kDa glycoprotein gene sequences. *Parasitology* ,134:351–358.
279. **MONGI J., 1993-** COPRO-PARASITOLOGIE PRATIQUE. Intérêt et méthodologie Notions sur les parasites du tube digestif. *Ed ESTEM* : 85-88.
280. **MONIS P. T., ANDREWS R. H., MAYRHOFER G., EY P. L., 1999-** Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. *Mol Biol Evol*, 16:1135-1144.
281. **MONIS P., MAYRHOFER R., ANDREWS G., EY P., 2003-** Genetic diversity within the morphological species *Giardia intestinalis* and its relationship to host origin. *Infec. Gen. and Evol.*, 3(1): 29-38.
282. **MOORE A.C., HERWALDT B.L., CRAUN G.F., CALDERON R.L., HIGHSMITH A.K., JURANEK D.D., 1993-**Surveillance for waterborne disease outbreaks - United States, 1991-1992. *MMWR CDC Surveill Summ*; 42(5): 1-22.
283. **MORAN J.R., 1982-** Small intestine-liver-pancreas complex. in Comparative Nutrition of Fowl and Swine: The Gastrointestinal Systems. *Ontario Agricultural College, Guelph* : 90–94.
284. **MORGAN U.M., THOMPSON R.C., 1998-** PCR detection of *Cryptosporidium*: the way forward?, *Parasitol. Today.*,14(6): 241–245.
285. **MORGAN U.M., CONSTANTINE C.C., FORBES D.A., THOMPSON R.C., 1997-** Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using RNAr sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol*, 83(5): 825-830.
286. **MORIN M., LARIVIERE S., LALLIER R., 1976-**Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can.J.Comp Med.*, 40(3):228-240.
287. **MOSTAFI J., BELGHAYTI D., EL KOSTALI M., FATIMI N., OULKHEIR S., TABOZ Y., AROUYA K., 2011-**Prevention des parasitoses à l’hôpital Moulay Abdellah de Salé (Maroc). *Word Journal of Biological Research*,1:1-5.
288. **MOYO S. J., GRO N., MATEE M. I., KITUNDU J., MYRMEL H., MYLVAGANAM H., MASELLE S. Y., LANGELAND N., 2011-** Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Pediatr* ,11: 19.
289. **MUHSEN K, LEVINE M.M., 2012-** A systematic review and meta-analysis of the association between *Giardia lamblia* and endemic pediatric diarrhea in developing countries. *Clin. Infect. Dis.*, 4 : 271-293.
290. **MWACHARI C., BATCHELOR B.I., PAUL J., WAIYAKI P.G., GILKS C.F., 1998-** Chronic diarrhoea among HIV-infected adult patients in Nairobi, Kenya. *J Infect* ,37:48–53.
291. **NEVA F., BROWN H.W., 1994-**Basic clinical parasitology. editors. 6th ed. New York: *WB Saunders*: 356.
292. **NGOSSO B.E.N.G., NAMKINGA L.A., 2015-**Identification of Pathogenic Intestinal Parasitic Protozoa Associated with Diarrhea among Under-fives Children in Dar Es Salaam, Tanzania. *International Invention Journal of Medicine and Medical Sciences*, 2(4): 49-55.

293. **NGUYEN, S., D. NGUYEN, QUYET LE D., LE HUA, NGUYEN T., HONMA H., NAKAI Y., 2007-** Prevalence and first genetic identification of *Cryptosporidium*. spp. in cattle in central Viet Nam. *Vet. Parasito*, 150: 357-361.
294. **NICHOLS R.A.B., MOORE J.E., SMITH H.V., 2006-** A rapid method for extracting oocyst DNA from *Cryptosporidium*-positive human faeces for outbreak investigations. *Journal of Microbiological Methods*. 65:512–524.
295. **NICOLS M., PEREZ J.M., CARME B., 2006-**"Diagnostic des parasitoses intestinales au CHU de la Guadeloupe: évolution de 1991 à 2003". *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 99 (4): 254-247.
296. **NIME F.A., BUREK J.D., PAGE D.L., HOLSCHER M.A., YARDLEY J.H., 1976-** Entérocólite aiguë chez un être humain infecté par le protozoaire *Cryptosporidium*. *Gastroentérologie*, 70 (4): 592-598.
297. **NITSAN Z., BEN-AVRAHAM G., ZOREF Z., NIR I., 1991-**Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. *Br. Poult. Sci.*, 32:515–523.
298. **NOHRIA A., ALONSO R.A., PEATTIE D.A., 1992-** Identification and characterization of gamma- giardin gene from *Giardia lamblia*. *Mol.Biochem. Parasitol.*, 56: 27–37.
299. **NOORDEEN F., RAJAPAKSE R.P., FAIZAL A.C., HORADAGODA N.U., ARULKANTHAN A., 2000-**Prevalence of *Cryptosporidium* infection in goats in selected locations in three agroclimatic zones of Sri Lanka. *Vet Parasitol*, 93: 95-101.
300. **NUNDY S., GILMAN R.H., XIAO L., CABRERA L., CAMA R., ORTEGA Y.R., KAHN. G., CAMA V. A., 2011-**Wealth and Its Associations with Enteric Parasitic Infections in a Low-Income Community in Peru: Use of Principal Component Analysis .*Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 84(1), 38–42.
301. **O'CONNOR R. M., WANYIRI J. W., CEVALLOS A. M., PRIEST J. W., WARD H. D., 2007-** *Cryptosporidium parvum* glycoprotein gp40 localizes to the sporozoite surface by association with gp15. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156: 80–83.
302. **O'DONOGHUE P.J., 1995-***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Intl J Parasitol.*, 25(2):139–195.
303. **ODO G., AGWU J., EKEH F., EZE C., AGUORU G. , ANYA C. , OMEJE K.O., UBACHUKWU P., 2016-** Prevalence of Intestinal Parasites among School Children in UzoUwani Local Governemnt Area of Enugu State. *International Journal of Research Studies in Microbiology and Biotechnology*, 2(2): 7-14.
304. **ODU N. N., ELECHI V. I., OKONKO I. O., 2013-** Prevalence of intestinal helminthes infection among primary school in urban and semi-urban area in Port-Harcourt, River State, Nigeria. *World Rural Observation*, 5(1): 52 – 61.
305. **OIE, 2008-** Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals .Sixth Edition. *World Organization for Animal Health* :5-15.
306. **O'HANDLEY R.M., OLSON M.E., 2006-**Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 22, (3): 623–643.
307. **OKYAY P., ERTUG S., GULTEKIN B., ONEN O., BESER E., 2004-**Intestinal parasites prevalence and related factors in school children, a western city sample—Turkey. *BMC Public Health*, 4: 64-69.

308. **OLSON M.E., O'HANDLEY R.M., RALSTON B.J., MCALLISTER T.A., THOMPSON R.C.A., 2004-** Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol*, 20: 185–191.
309. **OMORUYI B. E., NWODO U. U., UDEM C. S., OKONKWO F. O., 2014-**Comparative Diagnostic Techniques for *Cryptosporidium* Infection. *Molecules*, 19: 2674-2683.
310. **ONYENIRAN O. A., OGURONGBE O., OLADIPO E. K., AFOLABI A. Y. , AJAYI O. O., 2014-**Intestinal parasitic infection among primary school pupils in Osogbo, Nigeria. *Journal of Dental and Medical Sciences*, 13 : 96 -101.
311. **OSMAN M., EL SAFADI D ., CIAN A ., BENAMROUZ S ., NOURRISSON C ., POIRIER P ., PEREIRA B ., RAZAKANDRAINIBE R ., PINON A ., LAMBERT C ., WAWRZYNIAK I., DABBOUSSI F ., DELBAC F ., FAVENNEC L .,HAMZE M ., VISCOGLIOSI E ., CERTAD G.,2016-**Prévalence et facteurs de risque d'infections intestinales à Protozoaires dues à *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Blastocystis* et *Dientamoeba* chez des écoliers à Tripoli, au Liban. *PLOS Neglected Tropical Diseases*,10(3): 3-17.
312. **ØSTERÅS O., GJESTVANG M.S., VATN S., SØLVERØD L., 2007-**Perinatal death in production animals in the Nordic countries -incidence and costs. *Acta Vet Scand.*,49(1): 14.
313. **OUCHENE N., AISSI M. , BENAKHLA A.,2012-** Prévalence de *Cryptosporidium spp.* et *Giardia spp.* chez les bovins de la région de Sétif au nord-est de l'Algérie. *Elevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux* ,65 (4) : 53-56.
314. **OUCHENE N., OUCHENE-KHELIFI N.A., ZEROUAL F., BENAKHLA A., ADJOU K., 2014-** Study of *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.* and *Eimeria spp.* infections in dairy cattle in Algeria. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 6(4): 61-65.
315. **PADMAJA N., SAI SWAROOP P., NAGESWARARAO P., 2014-** Prevalence of intestinal parasitic infections among school children in and around Amalapuram. *Journal of Public Health and Medical Research*, 2(2): 36 - 38.
316. **PALVASEK I., 1999-** Cryptosporidia: Biology,diagnosis, host spectrum,specificity ;and the environment. *Remedia-Klinicka Microbiologie* ,3:290-301.
317. **PAWLOWSKI S.W., WARREN C.A., GUERRANT R., 2009-**Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology* ,136:1874–1886.
318. **PATEL S., PEDRAZA-DIAZ S., MCLAUHLIN J., 1999-**The identification of *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* directly from whole faeces by analysis of a multiplex PCR of the 18S rRNA gene and by PCR/RFLP of the *Cryptosporidium* outer wall protein (COWP) gene. *Int J Parasitol*, 29(8): 1241-1247.
319. **PEARSON J.R., LOGAN E.F., 1983-** Scanning and transmission electron microscopic observations on the hostparasite relationship in intestinal cryptosporidiosis of neonatal calves. *Res. Vet. Sci.*, 34:149-154.
320. **PETERS C., KOCKA F., CHITOM A., SABLE R., JANDA W., 1987-** High carriage of *Endolimax nana* in diarrheal specimens from homosexual men. *Lett Appl Microbiol* ,5:65-66.

321. **PETRI W.A., MILLER M., BINDER H.J., LEVINE M.M., DILLINGHAM R., GUERRANT R.L., 2008**-Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J Clin Invest.*, 118:1277-90.
322. **PLUTZER J. , KARANIS P., 2007**- Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from cattle in Hungary. *Vet. Parasitol.*, 146:357–362.
323. **POHJOLA S., LINDBERG L.A., 1986**- Experimental cryptosporidiosis in mice calves and chicken. *Acta. Vet. Scand.*, 27: 80-90.
324. **POULSEN C.S., STENSVOLD C. R., 2016**-Systematic review on *Endolimax nana*: A less well studied intestinal ameba .*Tropical Parasitology*, 6(1):8-12.
325. **PRAKRITI V., MADHU S., UMA C., 2012**- A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *cryptosporidium parvum* in stool samples. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2 (5):15-26.
326. **PUTIGNANI L., MENICHELLA D., 2010**- Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip Perspect Infect Dis*,(10):1-29.
327. **QUIHUI L., MORALES G. G., MÉNDEZ R. O., LEYVA J. G., ESPARZA J. , VALENCIA M. E., 2010**- Could giardiasis be a risk factor for low zinc status in schoolchildren from northwestern Mexico? A cross-sectional study with longitudinal follow-up. *BMC Public Health*, 10:85.
328. **QUILEZ A.J., TORRES E., CHALMERS R.M., ROBINSON G., DEL CACHO E., SANCHEZ-ACEDO C., 2008 B**- *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology*, 135(14):1613–1620.
329. **QUILEZ B.J., TORRES E., CHALMERS R. M., HADFIELD S. J., CACHO E. D., SÁNCHEZ-ACEDO C., 2008 A**- *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*,74(19):6026–6031.
330. **RADOSTIS O.M., GAY C.C., HINCHCLIFF K.W., CONSTABLE P.D., 2006**- Diseases associated with protozoa. 10edition, In: *Veterinary Medicine: A Textbook of Diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Saunders Elsevier*,: 1483-1540.
331. **RAHMETO A., ABEBE W., BERSISSA K., 2008**- Epidemiology of *Eimeria* Infections in Calves in Addis Ababa and Debre Zeit Dairy Farms, Ethiopia.*Intern J Appl Res Vet Med.*, 6(1): 24-30.
332. **RAHMOUNI I., ESSID R., AOUN K., BOURATBINE A., 2014**- Glycoprotein 60 diversity in *Cryptosporidium parvum* causing human and cattle cryptosporidiosis in the rural region of Northern Tunisia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 346–350.
333. **RALSTON B.J., MCALLISTER T.A., OLSON M.E., 2003**-Prevalence and infection pattern of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in range beef calves and their dams; *Vet Parasitol*, 114: 113-122.
334. **RAMADAN M. Y., KHATER H. F., ABD EL HAY A.R., ABO ZEKRY A. M., 2015**- Studies on parasites that cause diarrhea in calves. *Benha Veterinary Medical Journal*, 29(1):214-219.
335. **RAN Z., LI S., HUANG J., YUAN Y., CUI C., WILLIAMS C.D., 2010**- INACTIVATION of *Cryptosporidium* by ozone and cell ultrastructures. *J Environ Sci* , 22(12): 1954-1959.

336. **REID C.S.W., CORNWALL J.B., 1959-** The mechanical activity of the reticulo-rumen of cattle. *Proc N Z Soc Anim Prod* ,19: 23-35.
337. **REID C.S.W., CONWAY J.F., BEACH A.D. ,1989-** Generation of tactile stimulation in the ruminoreticulum Asian-Australian. *J Anim Sci*, 2: 161- 162.
338. **RINALDI L., COLES G.C., MAURELLI M.P., MUSELLA V., CRINGOLI G., 2011-** Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* 177:345–352.
339. **RINALDI L., GONZALEZ S., GUERRERO J., AGUILERA L. C., MUSELLA V.,GENCHI C., CRINGOLI G.,2012-** A One-Health integrated approach to control fascioliasis in the Cajamarca valley of Peru. *Geospatial Health*, (6) 3: 67-73.
340. **ROBERTS J., 1990-** The life cycle of *Toxocara vitulorum* in Asian buffalo (*Bubalus bubalis*). *International Journal for Parasitology*, 20: 833-840.
341. **ROELLIG D. M., YODER J. S., MADISON-ANTENUCCI S., ROBINSON T. J., VAN T. T., COLLIER S. A., BOXRUD D., MONSON T., BATES L. A., BLACKSTOCK A. J., SHEA S., LARSON K., XIAO L., BEACH M., 2017-** Community Laboratory Testing for *Cryptosporidium*: Multicenter Study Retesting Public Health Surveillance Stool Samples Positive for *Cryptosporidium* by Rapid Cartridge Assay with Direct Fluorescent Antibody Testing. *Polos One*, 12 (1):2-12.
342. **ROSE J.B., LISLE J.T., LECHEVALLIER M., (1997).** Waterborne cryptosporidiosis: incidence outbreaks, and treatment strategies. In: Fayer, R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *CRC Press*, Boca Raton, FL, 93– 110.
343. **ROUSSET J., 1993-** Copro-Parasitologie Pratique .Paris.ed *ESTEM*: 11-13.
344. **ROSSLE N.F., LATIF B., MALIK A.S., FADZLI F.M., ABU N.A., 2012-** Cryptosporidiosis among children with diarrhea admitted to Hospital Selayang and Hospital Sungai Buloh, Selangor, Malaysia. *J Trop Med Parasitol.*, 35(2):55–62.
345. **ROSSIGNOL J.F., AYOUB A., AYERS M.S., 2001-**Treatment of diarrhea caused by *Cryptosporidium parvum*: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. *Journal of Infectious Diseases*, 18(4): 103–106.
346. **RYAN U.M., CACCIO S., 2009-** Cryptosporidiosis. In: Liu D (ed). Molecular detection of food-borne pathogens. Boca Raton, *CRC Press*, 651-666.
347. **RYAN U., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A.A., PAVLASEK I., 2003-**Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied Environmental Microbiology*, 69:4302–4307.
348. **SACK D.A., SACK R.B., NAIR G.B., SIDDIQUE A.K., 2004-** Cholera. *Lancet*, 363:223-233.
349. **SAIF L.J., ROSEN B.I., PARWANI A.V., 1994-** Bovine rotavirus. In: Kapikian AZ, editor. Viral infections of the gastrointestinal tract. *Marcel Dekker Inc., New York*, 279–368.
350. **SANFORD S. E., JOSEPHSON G. K. A., 1982-** Bovine Cryptosporidiosis: Clinical and Pathological Findings in Forty-two Scouring Neonatal Calves. *Can Vet J.*, 23(12): 343–347.

351. **SANGAJI M. K. , MUKUKU O., MUTOMBO A.M., MAWAW P. M., SWANA E.K., KABULO B. K. , MUTOMBO A. K. , WEMBONYAMA S. O. , LUBOYA O. N., 2015-** Etude épidémiologique des diarrhées aiguës à rotavirus chez les nourrissons à l'hôpital Jason Sendwe Lubumbashi, République démocratique du Congo. *Pan Afr Med J.*, 21: 2-4.
352. **SANTI'N M., TROUT J. M., FAYER R., 2008-** A longitudinal study of cryptosporidiosis in dairy cattle from birth to 2 years of age Mo'nica. *Veterinary Parasitology*, 155: 15–23.
353. **SANTI'N 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.
354. **SARMAST A.H., PARRAY F.Q., SHOWKAT H.I., LONE Y.A., BHAT N.A., 2011-** Duodenal perforation with an unusual presentation: a case report. *Case Rep Infect Dis*; 512607
355. **SAVIOLI L., SMITH H. ,THOMPSON A., 2006-** *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative', *Trends Parasitol.*, 22 :203-208.
356. **SCHAT K. A., MYERS T. J., 1991-** Avian intestinal immunity. *CRC Crit. Rev. Poult. Biol.*, 3:19–34.
357. **SCHÜLE S.A, CLOWES P., KROIDL I., KOWUOR DO., NSOJO A., MANGU C., RIESS H., GELDMACHER C., LAUBENDER R., MHINA S., MABOKO L., LÖSCHER T., HOELSCHER M., SAATHOFF E., 2014-** *Ascaris lumbricoides* infection and its relation to environmental factors in the Mbeya region of Tanzania, a cross-sectional, population-based study. *PLoS One* ,9(3) :2-8.
358. **SELL J. L., ANGEL C. R., PIQUER J., MALLARINO E. G., AL-BATSHAN H. A., 1991-** Developmental patterns of selected characteristics of the gastrointestinal tract of young turkeys. *Poult. Sci.*, 70:1200–1205.
359. **SHAH M., TAN C.B., RAJAN D., AHMED S., SUBRAMANI K., RIZVON K., 2012-** *Blastocystis hominis* and *Endolimax nana* co-infection resulting in chronic diarrhea in an immunocompetent male. *Case Rep Gastroenterol*, 6: 358-364.
360. **SHARMA R., FERNANDEZ F., HINTON M., SCHUMACHER J., 1997-** The influence of diet on the mucin carbohydrates in the chick intestinal tract. *Cell. Mol. Life Sci.*, 53:935–942.
361. **SHIRALE S. Y., MESHARAM M. D. , KHILLARE K. P., 2008-** Prevalence of Gastrointestinal Parasites in Cattle of Western Vidarbha Region. *Veterinary World*, 1(2): 45.
362. **SILVERLA'S C., NA'SLUND K., BJO'RKMAN C., AND MATTSSON J. G., 2010-** Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from Swedish dairy cattle in relation to age, diarrhoea, and region. *Vet. Parasitol.*, 169:289–295.
363. **SINSKI E., BEHNKE J.M., 2004-** Apicomplexan parasites – Environmental contamination and transmission. *Pol J Microbiol*, 53: 67-73.
364. **SMITH H.V., S, CACCIO S. M, COOK N, NICHOLS R. A, TAIT A., 2007-** *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet Parasitol*, 149 : 29-40.

365. **SMITH S. B., ALDRIDGE P. K., CALLIS J. B., 1989-** Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science*, 243: 203-206.
366. **SMITH. C.M., SHERMAN D.M., 1994 -**Goat medicine, Philadelphie: *Lea et Febiger*, 620.
367. **SMITS C. H., TE MAARSEN C. A. A., MOUWEN J. M. V. M., KONINKX J. F. J. G., BEYNEN A. C., 2000-** The antinutritive effect of a carboxymethylcellulose with high viscosity on lipid digestibility in broiler chickens is not associated with mucosal damage. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 83:239–245.
368. **SNEL S.J., BAKER M.G., KAMALESH V., FRENCH N., LEARMONTH J., 2009-** A tale of two parasites: the comparative epidemiology of cryptosporidiosis and giardiasis. *Epidemiol Infect* ,137:1641-1650.
369. **SNODGRASS D.R., TERZOLO H.R., SHERWOOD D., CAMPBELL I., MENZIES J.D., SYNGE B.A., 1986-**Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Record.*,119: 31–34.
370. **SOLARCZYK P., 2009-**Occurrence of *Giardia* species and genotypes in humans and animals in Wielkopolska region, Poland. *Wiad. Parazytol*, 55: 459–462.
371. **SOLTAN M., KENNEDY M.,WILKES R., 2015-** Detection and genotyping of Bovine Viral Diarrhea virus in dairy cattle and buffalo farms in Ismailia Province, Egypt.*The journal of infection in Developing countries* ,22(4) :15-23.
372. **SOTIRIADOU I., PANTCHEV N., GASSMANN D., KARANIS P., (2013).** Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats .*Parasite*, 20: 8 .
373. **SOW S.O., MUHSEN K., NASRIN D., BLACKWELDER W.C., WU Y., FARAG T.H., PANCHALINGAM S., SOW S O., MUHSEN K., NASRIN D., BLACKWELDER W. C., WU Y., FARAG T. H., PANCHALINGAM S., SUR D., ZAIDI A.K. M., FARUQUE A. S. G., SAHA D., ADEGBOLA R., ALONSO P. L., BREIMAN R. F., BASSAT Q., TAMBOURA B., SANOGO D., ONWUCHEKWA U., MANNA B., RAMAMURTHY T., KANUNGO S., AHMED S., QURESHI S., QUADRI F., HOSSAIN A., DAS S. K., ANTONIO M., HOSSAIN M. J., MANDOMANDO I., NHAMPOSSA T.,ACACIO S.,OMORE R., OUNDO J. O., OCHIENG J. B., MINTZ E. D., O'REILLY C. E.,BERKELEY L. Y.,LIVIO S., TENNANT S. M., SOMMERFELT H., NATARO J. P., ZIV-BARAN T., ROBINS-BROWNE R. M., MISHCHERKIN V., ZHANG J., LIU J.,HOUP T E.R.,KOTLOFF K. L., LEVINE M.M.,2016-** The burden of *Cryptosporidium* diarrheal disease among children < 24 months of age in moderate/ high mortality regions of Sub-Saharan Africa and South Asia, utilizing data from the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10: 2-16.
374. **SPANO F., PUTIGNANI L., GUIDA S., CRISANTI A., 1998-***Cryptosporidium parvum*: PCR-RFLP analysis of the TRAP-C1 (thrombospondinrelated adhesive protein of *Cryptosporidium-1* gene discriminates between two alleles differentially associated with parasite isolates of animal and human origin. *Exp Parasitol*, 90: 195-198.

375. **SPEICH B., KNOPP S., MOHAMMED K. A., KHAMIS I. S., RINALDI L., CRINGOLI G., ROLLINSON D., UTZINGER J., 2010-**Comparative cost assessment of the Kato-Katz and FLOTAC techniques for soil-transmitted helminth diagnosis in epidemiological surveys, *Parasites et Vectors*,3:71.
376. **SQUIRE S.A., BEYUO J., AMAFU-DEY H., 2013-** Prevalence of *Cryptosporidium* oocysts in cattle from Southern Ghana Sylvia A. *Veterinarski arhiv* 83 (5), 497-507.
377. **STEINMANN P., CRINGOLI G., BRUSCHI F., MATTHYS B., LOHOURIGNON L. K., CASTAGNA B., MAURELLI M. P., MORGOGNONE M. E., UTZINGER J., RINALDI L., 2012-**FLOTAC for the diagnosis of *Hymenolepis* spp. infection: proof-of-concept and comparing diagnostic accuracy with other methods.*Parasitol Res*,12: 2895-2899.
378. **STIBBS H.H., ONGERTH J.E., 1986-** Immunofluorescence Detection of *Cryptosporidium* Oocysts in Fecal Smears, *American Society for Microbiology*, 24(4): 517-521.
379. **STUART J.M., ORR H. J., WARBURTON F.G., JEYAKANTH S., PUGH C., MORRIS I., SARANGI J., NICHOLS G., 2003-**Risk Factors For Sporadic Giardiasis: A Case-Control Study In Southwestern England *Emerging Infectious Diseases*,9 (2): 229-233.
380. **SULAIMAN I.M., MORGAN U.M., THOMPSON R.C., LAL A.A., XIAO L., 2000-** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (hsp70) gene. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2385-2391.
381. **SUNNOTEL O., LOWERY C.J., MOORE J.E., DOOLEY J.S.G., XIAO L., MILLAR B.C., ROONEY P.J., SNELLING W.J.,2006 A-***Cryptosporidium*. *Let Appl Microbiol.*, 43:7–16.
382. **SUNNOTEL O., SNELLING W.J., XIAO L., MOULE K., MOORE J.E., MILLAR B.C., 2006 B-**Rapid and sensitive detection of single *Cryptosporidium* oocysts from archived glass slides. *J Clin Microbiol.*, 44(9):3285–3291.
383. **SURESH J., DHAKA R. P., BWHNU R. T., JAY P. S., RAVIN B., SHRADDHA U., 2014-**Prevalence of intestinal parasites among school children of Bharatppkharia V.D.C. Kaski, Nepal. *British Microbiology Research Journal*, 4(9): 1007 – 1012.
384. **SUWANSAKSRI J., NITHIUTHAI S., WANITKIT V., SOOGARUN S., PALATHO P., 2002-**The formol-ether concentration technique for intestinal parasites comparing 0.1 n sodium hydroxide with normal saline preparations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 33: 97–98.
385. **TAYLAN-OZKAN A., YASA-DURU S., USLUCA S., LYSEN C., YE J., ROELLIG D.M., FENG Y., XIAO L., 2016-** *Cryptosporidium* species and *Cryptosporidium parvum* subtypes in dairy calves and goat kids reared under traditional farming systems in Turkey. *Experimental Parasitology*, 170:16–20.
386. **TEIXEIRA W.F.P.,COELHO W.M.D.,NUNES C.M., MEIRELES M.V., 2011-** Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in calf fecal samples by direct immunofluorescence assay Detecção de oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras fecais de bezerros pela reação de imunofluorescência direta. *Parasitol. Vet.*, 20(4):269-273.
387. **TEIXEIRA J.C., HELLER L., BARRETO M.L., 2007-***Giardia duodenalis* infection: risk factors for children living in sub-standard settlements in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* ,23:1489–1493.

388. **THEIS V.S., SRIPADAM R., RAMANI V., LAL S., 2010-** Chronic radiation enteritis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* ,22:70–83.
389. **THOMPSON R.C.A., 2000-** Giardiasis as are-emerging infectious disease and its zoonotic potential International. *Journal for Parasitology*, 30: 1259-1267.
390. **THOMPSON R.C.A., HOPKINS R.M., HOMAN W.L., 2000-** Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* ,16: 210–213.
391. **THOMPSON R.C., 2004** -The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and Giardiasis. *Vet Parasitol*, 126:15-35.
392. **THOMPSON R.C.A., REYNOLDSON J.A., LYMBERY A.J. , 1993-** *Giardia*: from molecules to disease and beyond. *Parasitol Today*, 9 (9): 313-315.
393. **THOMPSON R.C.A., MONIS P., 2004-** Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.*, 58:69-137.
394. **TIANGTIP R., JONGWUTIWES S., 2002-** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop Med Int Health*, 7: 357-364.
395. **TIGIST A., BOGALE B., CHANIE M., 2012-** Occurrence of gastro-intestinal nematodes of cattle in and around Gondar town, Amhara regional state, Ethiopia. *Acta Parasitologica Globalis* ,3(2):28–33.
396. **TRABELSI S., BOUCHAKOUA M., AOUINET A., 2012-** Ya-t-il un changement de la prévalence des parasitoses intestinales et urinaires chez les étudiants non-résidents permanents en Tunisie. *Tun Med* , 90: 530-532.
397. **TROTZ-WILLIAMS L. A., JARVIE B. D., MARTIN S. W. , LESLIE K. E. , PEREGRINE A. S., 2005-** Prévalence de l' infection à *Cryptosporidium parvum* dans le sud-ouest de l'Ontario et son association avec la diarrhée chez les veaux laitiers néonataux. *Can Vet J*, 46 (4): 349–351.
398. **TROTZ-WILLIAMS L.A., MARTIN D.S., GATEI W., CAMA V., PEREGRINE A.S., MARTIN S.W., NYDAM D.V., JAMIESON F., XIAO L., 2006-**Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research*, 99: 346–352.
399. **TSOLIS R.M., ADAMS L.G., FICHT T.A., BÄUMLER A.J., 1999-** Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect Immun*, 67:4879–4885.
400. **TULI L., SINGH D.K., GULATI A.K., SUNDAR S., MOHAPATRA T.M.,2010-** A multiattribute utility evaluation of different methods for the detection of enteric protozoa causing diarrhea in AIDS patients. *BMC Microbiol*, 10: 11.
401. **TYZZER E., 1910-** An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* of the gastric glands of the common mouse. *J Med Res*, 23: 487-509.
402. **TZIPORI S., 1981-** The aethiology and diagnosis of calf diarrhoea. *Vet Record.*,108: 510–515.
403. **TZIPORI S., SMITH M., HALPIN C., ANGUS K.W., SHERWOOD D.,CAMPBELL I., 1983-** Experimental cryptosporidiosis in calves: clinical manifestation and pathological finding. *Vet. Rec.*, 112: 116-120.

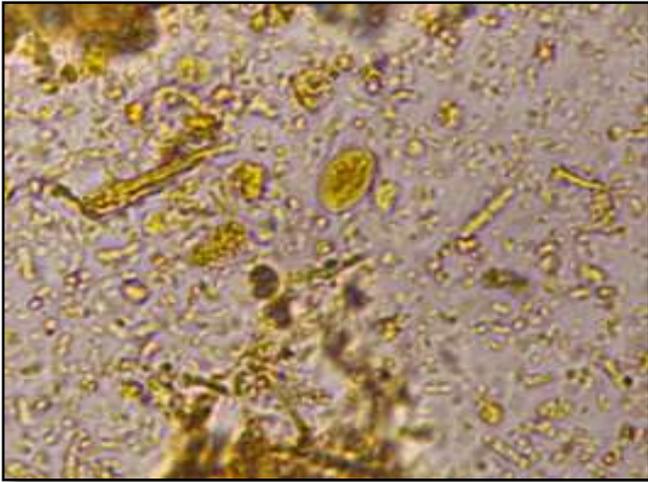
404. **TZIPORI S., WARD H., 2002-** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes Infect* ,4:1047–1058.
405. **UNI Z., GANOT S., SKLAN D., 1998-** Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poult. Sci.*, 77:75–82.
406. **UTZINGER J., RINALDI L., LOHOURIGNON L. K., ROHNER F., ZIMMERMANN M. B., TSCHANNEN A. B., N'GORAN E.K., CRINGOLI G., 2008-**FLOTAC: a new sensitive technique for the diagnosis of hookworm infections in humans. *Tropical Medicine and Hygiene*, 102 : 84-90.
407. **VAN DEN BERGHE P.V., KLOMP L.W., 2009-** New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutr Rev*, 67: 658–672.
408. **venu R., LATHA B. R., ABDUL BASITH S., SREEKUMAR C., DHINAKAR RAJ G., RAMAN M., 2013-** Factors influencing on prevalence of *Cryptosporidium* infection in south Indian dairy calves. *J. Parasit Dis.*, 37(2): 168–172.
409. **VESEY G., GRIFFITHS K.R., GAUCI M.R., DEERE D., WILLIAMS K.L., VEAL D.A., 1997-** Simple and rapid measurement of *Cryptosporidium* excystation using flow cytometry. *Int. J. Parasitol.*, 27(11):1353–1359.
410. **VERWEIJ J.J., SCHINKEL J., LAEIJENDECKER D., VAN ROOYEN M.A., VAN LIESHOUT L., POLDERMAN A.M., 2003-** Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Mol. Cell. Probes*, 17(5):223-225.
411. **VIJAYVARGIYA P., CAMILLERI M., SHIN A., 2013-** Methods for diagnosis of bile acid malabsorption in clinical practice. *Clin Gastroenterol Hepatol* ,11:1232–1239.
412. **VOHRA P., SHARMA M., CHAUDARY U., 2012-** A comprehensive review of diagnostic techniques for detection of *Cryptosporidium parvum* in stool samples. *J Pharm*, 2(5): 15-26.
413. **WANG R., WANG H., SUN Y., ZHANG L., JIAN F., QI M., NING C., XIAO L., 2011-** Characteristics of *Cryptosporidium* transmission in preweaned dairy cattle in Henan, China. *Journal of Clinical Microbiology*, 49: 1077–1082.
414. **WANYIRI, J. W., KANYI, H., MAINA, S., WANG, D. E., STEEN, A., NGUGI, P., KAMAU, T., WAITHERA, T., O'CONNOR, R. ,GACHUHI, K., 2014-** Cryptosporidiosis in HIV/AIDS patients in Kenya: clinical features, epidemiology, molecular characterization and antibody responses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 91: 319-328.
415. **WARE M.W., WYMER L., LINDQUIST H.D.A., SCHAEFER F.W., 2003-**Evaluation of an alternative IMS dissociation procedure for use with Method 1622: detection of *Cryptosporidium* in water. *Journal of Microbiological*,55: 575–583.
416. **WATANABE Y., YANG C., OOI H., 2005-** *Cryptosporidium* infection in livestock and first identification of *Cryptosporidium parvum* genotype in cattle feces in Taiwan. *Parasitol Res*, 97: 238- 241.
417. **WEBER R., BRYAN R.T., BISHOP H.S., WAHLQUIST S.P., SULLIVAN J.J., JURANEK D.D., 1991-** Threshold of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 1323–1327.

418. **WEBSTER K.A., SMITH H.V., GILES M., DAWSON L., ROBERTSON L.J., 1996-** Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in faeces: comparison of conventional coproscopical methods and the polymerase chain reaction, *Vet. Parasitol.*, 61: 5-13.
419. **WHYTE L.A., JENKINS H., 2012-** Pathophysiology of diarrhoea. *Paediatrics and Child Health*, 22(10):443–447.
420. **WIDMER G., 1998-**Genetic heterogeneity and PCR detection of *Cryptosporidium parvum*, *Adv.Parasitol.*,40: 223–39.
421. **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. *International Journal for Parasitology*, 38: 809–817.
422. **WILLIAMSON A.L., O'DONOGHUE P.J., UPCROFT J.A., UPCROFT P., 2000-** Immune and pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice.*Int.J. Parasitol*, 30 (2): 129-136.
423. **WOLFE M.S., 1992-** Giardiasis. *Clinical Microbiological Reviews*, 5: 93-100.
424. **WOLSKA-KUSNIERZ B., BAJER A., CACCIO S., HEROPOLITANSKA-PLISZKA E., BERNATOWSKA E., VAN DONGEN J., BEDNARSKA M., PAZIEWSKA A., SINISKI E., 2007-** *Cryptosporidium* infection in patients with primary immunodeficiency syndromes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 45:458–464.
425. **WONG B.S., CAMILLERI M., CARLSON P., 2012-** Increased bile acid biosynthesis is associated with irritable bowel syndrome with diarrhea. *Clin Gastroenterol Hepatol* ,10:1009–1015.
426. **XIAO L., 2010-**Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124: 80-89.
427. **XIAO L., BERN C., LIMOR J., SULAIMAN I., ROBERTS J., CHECKLEY W., 2001-**Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *J Infect Dis*, 183: 492- 497.
428. **XIAO L., FAYER R., RYAN U., UPTON S., 2004-***Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol.* 17: 72-97.
429. **XIAO L., FENG Y., 2008-**Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 52(3): 309-323.
430. **XIAO L., HERD R.P.,1993-**Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol*, 31:2944–2946.
431. **XIAO L., HERD R.P., 1994-** Infection patterns of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet Parasitol.*, 55:257–262.
432. **XIAO L., ESCALANTE L., YANG C., SULAIMAN I. M., ESCALANTE A. A., MONTALI R. J., FAYER R., LAL A. A., 1999-** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Appl Environ Microbiol*, 65: 1578–1583.
433. **ZAGLOOL D.A., MOHAMED A., KHODARI Y.A., FAROOQ M.U., 2013-***Crypto-Giardia* antigen rapid test versus conventional modified Ziehl-Neelsen acid fast staining method for diagnosis of cryptosporidiosis. *Asian Pac J Trop Med*, 6(3): 212-215.

434. **ZEAITER Z., FOURNIER P.E., GREUB G., RAOULT D., 2003-** Diagnosis of *Bartonella endocarditis* by real-time nested PCR assay using serum. *J Clin Microbiol*, 41:919 – 925.
435. **ZHOU L ., SINGH A., JIANG J., XIAO L., 2003-** Molecular surveillance of *Cryptosporidium* spp. in raw wastewater in Milwaukee: implications for understanding outbreak occurrence and transmission dynamics. *J Clin Microbiol*, 41: 525.
436. **ZYLBERBERG H.M., GREEN P.H., TURNER K.O., GENTA R.M., LEBWOHL B., 2017-** Prevalence and Predictors of *Giardia* in the United States. *Dig. Dis. Sci.*, 62(2):432-440.

Annexe:

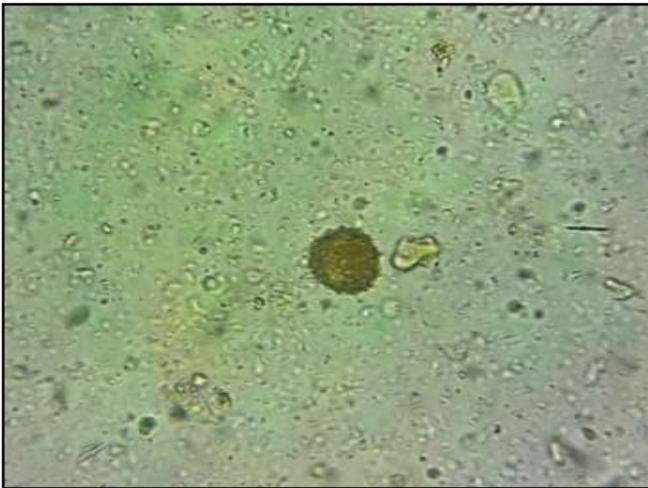
Annexe 1:



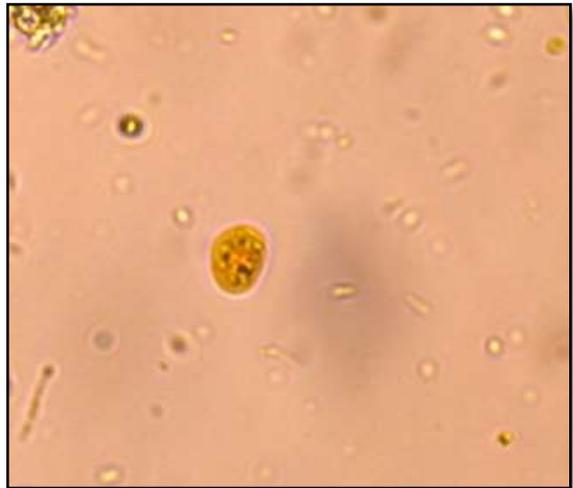
1



2



3



4

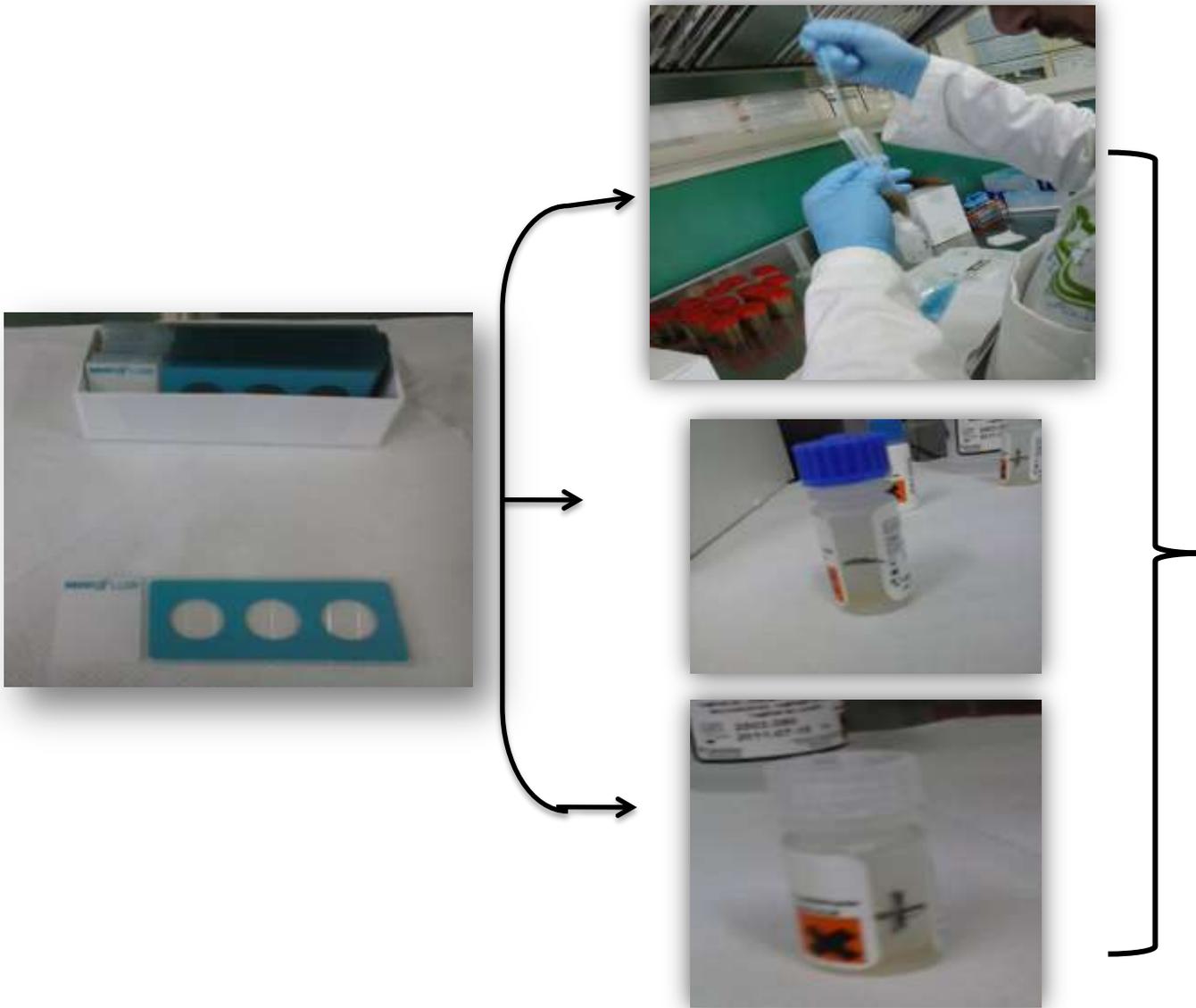
1: *Giardia intestinalis* après coloration au lugol, **2:** *E. histolytica*, **3:** *Ascaris lumbricoides*, **4:** *Endolimax nana* **G X 40.**

Annexe 2:

La méthode de Ritchie pour la concentration des échantillons selon **COELHO et al. (2009)**, Nous avons dilué un volume de chaque échantillon contre 10 volume de réactif de Ritchie (100 ml de formol, 9g de NaCl, 900 ml d'eau distillée) , après le mélange a été laissé sédimenté quelques

secondes, puis 1/3 d'éther ont été rajoutés pour 2/3 de mélange puis le tube a été placé dans la centrifugeuse 3 min 1500 rpm/min, après centrifugation le surnageant a été éliminé et un examen directe a été effectué sur le culôt.

Annexe 3: Identification de *Cryptosporidium* et de *Giardia* par IFD.





les anticorps anti-Crypto et
anti-Giardia + Colorant
fluorescent



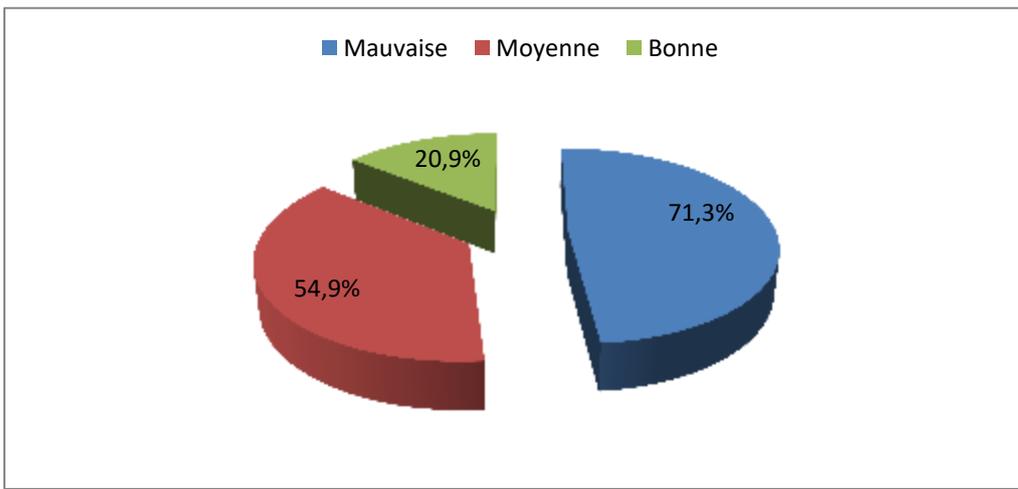
solution de montage

le DAPI



Annexe

4:



Influence de la nature de l'hygiène des fermes bovines sur l'infestation de *Cryptosporidium* spp.

Annexe 5:



Thermomixeur Eppendorf.

Annexe 6: Extraction de l'ADN.



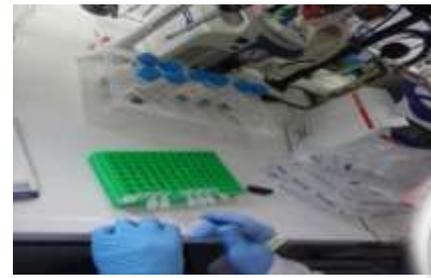
Tampon AL



Protéinase k



600 µl de surnagent



Les extraits d'ADN

L'éluion



tampon de lavage AW2



tampon de lavage AW1

Annexe 7:

T



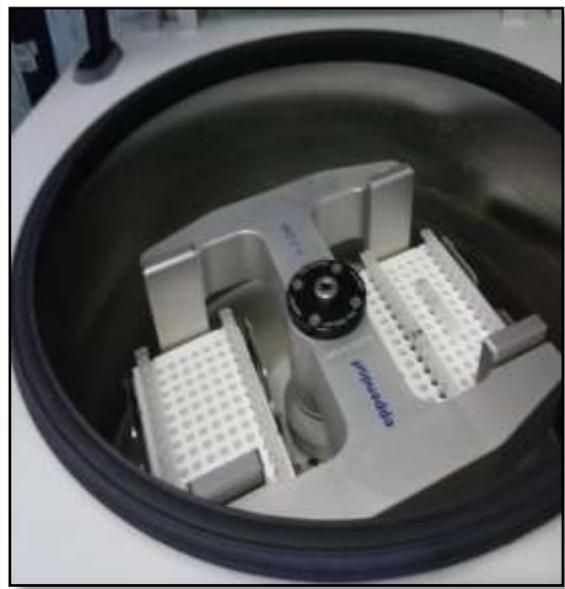
Centrifugeuse eppendorf 5415D.

Annexe 8:



Thermocycleur Perkin Elmer 9700 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Annexe 9:



Centrifugeuse 5804 eppendorf.

Annexe 10:



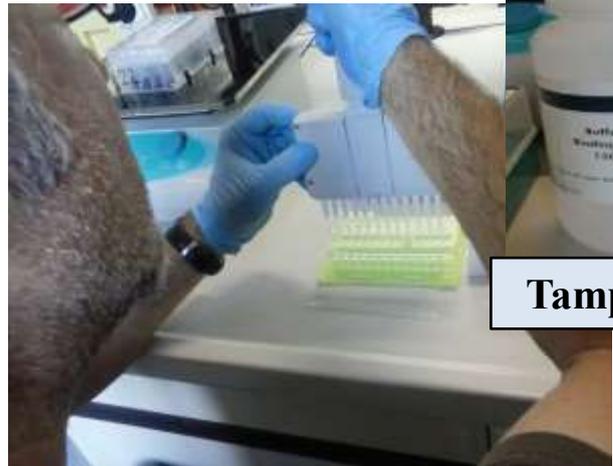
Préparation du gel d'agarose.

Annexe 11:



L'appareil utilisé pour la révélation du gel.

Annexe 12: Purification des produits positifs par PCR .



Tampon PB

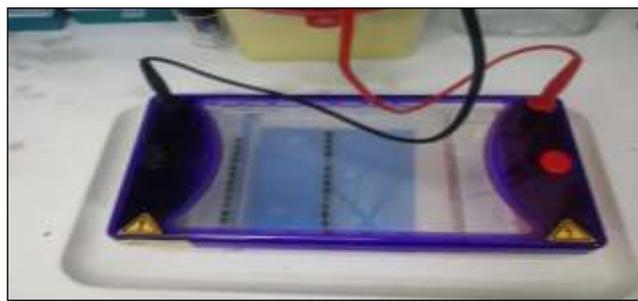


ADN pur

Centrifugation



Tampon EB



Annexe 13:



Qubit pour la purification de l'ADN.

Annexe 14 : Description de l'appareil FLOTAC

L'appareil FLOTAC est un dispositif de forme cylindrique en thermoplastique amorphe en polycarbonate. Ce matériau a été choisi en raison de son excellente transmission de la lumière, de sa grande résistance à la chaleur, de sa robustesse (peut être lavé et réutilisé plusieurs fois) et de sa grande stabilité dimensionnelle. L'appareil FLOTAC comprend trois composants physiques, à savoir la base (**Figure 1a**), le disque de translation (**Figure 1b**) et le disque de lecture (**Figure 1c**). Il y a deux chambres de flottation de 5 ml, qui sont conçues pour un examen optimal des grandes suspensions d'échantillons de matières fécales dans chaque chambre de flottation (volume total = 10 ml).

Il y a cinq accessoires, à savoir la vis (**Figure 2 a**), la clé (**Figure 2 b**), le fond (**Figure 2 c**), l'adaptateur de centrifugeuse (**Figure 2 d**) et l'adaptateur de microscope (**Figure 2 e**). Ces accessoires sont obligatoires pour le bon fonctionnement de l'appareil FLOTAC pendant la centrifugation et l'examen au microscope. L'ensemble du processus d'assemblage FLOTAC est représenté sur **la figure 3**, tandis que l'exécution de l'étape de traduction post-centrifugation est représentée sur **la figure 4**.

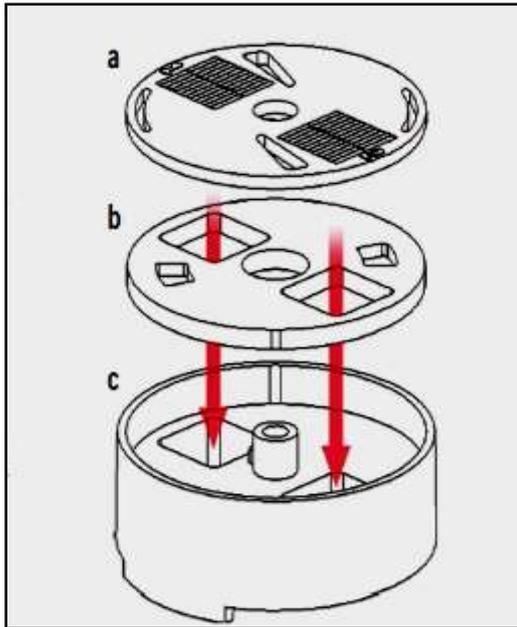


Figure 1. Composants physiques de l'appareil FLOTAC. Le dispositif de base est composé d'un disque de lecture (a), d'un disque de translation (b) et d'une base (c). Les flèches indiquent les chambres de flottation [CRINGOLI *et al.*, 2010] .

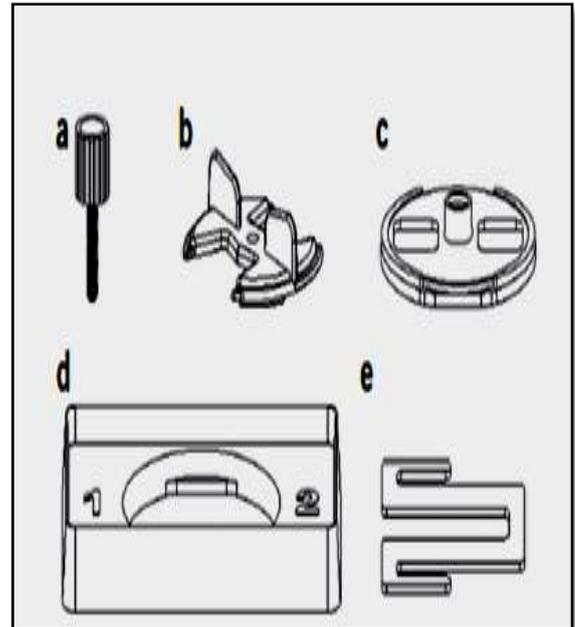


Figure 2. Accessoires de l'appareil FLOTAC, à savoir la vis (figure 3a), la clé (figure 3b), le fond (figure 3c), l'adaptateur de centrifugeuse (figure 3d) et l'adaptateur de microscope (figure 3e) [CRINGOLI *et al.*, 2010] .

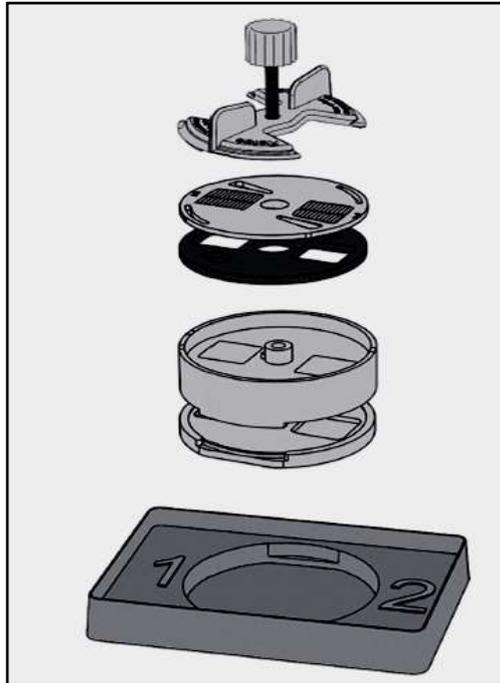


Figure 3. Processus d'assemblage FLOTAC montrant les éléments de base et les accessoires [CRINGOLI *et al.*, 2010].

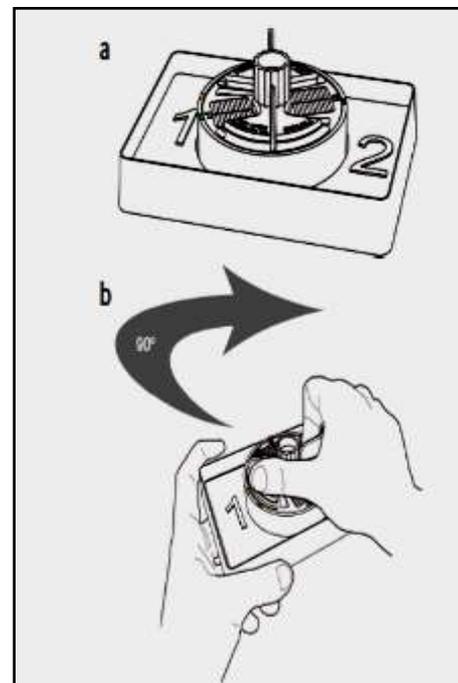


Figure 4. Quelques détails sur les étapes de montage et de fonctionnement de FLOTAC. L'appareil FLOTAC complètement assemblé (a) et l'exécution de l'étape post-centrifugation (b) [CRINGOLI *et al.*, 2010] .

Il existe deux versions de l'appareil FLOTAC: FLOTAC-100, qui permet un grossissement maximal de $\times 100$ (**Figure 5 a**), et FLOTAC-400, qui permet un grossissement maximal de $\times 400$ (**Figure 5 b**). FLOTAC-400 a un perfectionnement et une amélioration par rapport à FLOTAC-100, car il permet un diagnostic microscopique à un grossissement quatre fois plus élevé que FLOTAC-100, ce qui est nécessaire pour la détection des protozoaires intestinaux.

Selon les travaux faits par **CRINGOLI *et al.*, (2010)**, FLOTAC-100 est toujours suggéré pour le diagnostic des œufs et des larves d'helminthes et pour l'enseignement, car le disque de lecture est considérablement plus épais et donc plus robuste que celui utilisé dans FLOTAC-400, et parce que les chambres de flottation peuvent être remplies plus facilement.

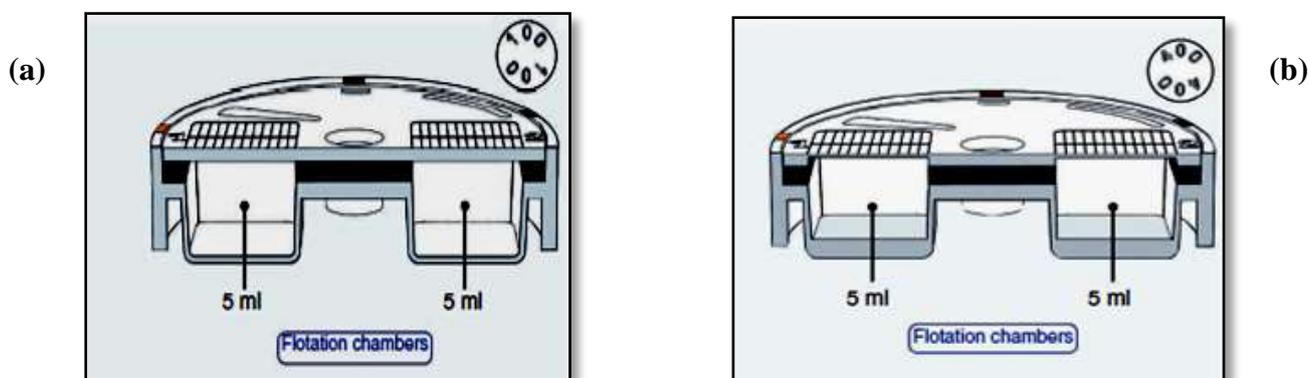
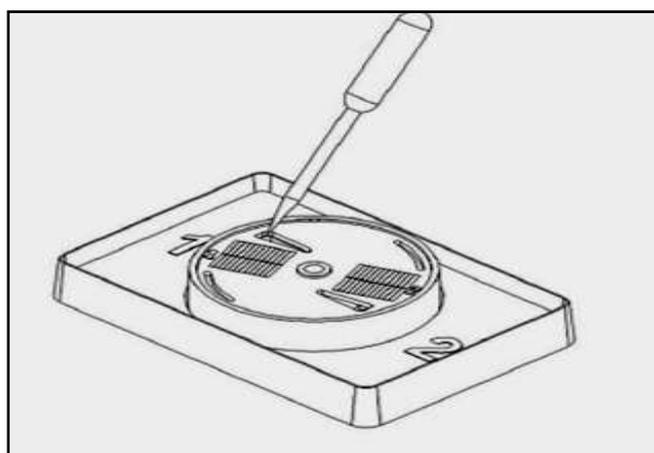


Figure 5. Appareil de FLOTAC: (a) FLOTAC-100 approprié principalement pour le diagnostic des œufs et des larves d'helminthes, et (b) FLOTAC-400, qui peut également être utilisé pour le diagnostic des protozoaires intestinaux [CRINGOLI *et al.*, 2010].

Annexe 15 :



Remplissage de l'appareil FLOTAC [CRINGOLI, 2006].

Annexe 16 : Description de l'appareil Mini- FLOTAC

Le matériel nécessaire comporte d'une part, une base Fill-FLOTAC qui sont des dispositifs d'échantillonnage jetables, qui font partie des kits FLOTAC et Mini-FLOTAC (**Figure 1**), [CRINGOLI, 2006 ; CRINGOLI *et al.*, 2010]. Ils consistent en un récipient, un collecteur et un filtre (**Figure 2**). Ces kits facilitent l'exécution des quatre premières étapes consécutives du Mini-FLOTAC, c'est-à-dire la collecte (y compris la pesée), l'homogénéisation, filtration et remplissage.

D'autre part, le Mini-FLOTAC comprend deux composants physiques, la base et le disque de lecture. Il y a deux chambres de flottation de 1 ml, qui sont conçus pour un examen optimal de suspensions d'échantillons fécaux (volume total = 2 ml) et qui permet un grossissement maximal de 400X [BARDA *et al.*, 2013 b].



Figure 1. Kits Fill-FLOTAC et Mini- FLOTAC [BARDA *et al.*, 2013b].



Figure 2. Composants de Fill-FLOTAC: Collecteur (a), filtre (b) [CRINGOLI *et al.*, 2010].

Annexe 17: Communications et publications:

1. V^{ième} Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources ,Tabarka,Tunisie du 22 du 25 mars 2017

Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and gastrointestinal parasites and their sanitary impact in cattle of Batna province, Algeria

DJAHIDA BENHOUDA¹, AHCÈNE HAKEM¹, DJAMEL BAROUDI², AFAF BENHOUDA³, LIHUA XIAO⁴, GIUSEPPE CRIGOLI⁵, LAURA RINALDI⁵

2. The second international workshop management and genetic improvement of Plant and Microbial Resources (GRPM 2017), Tlemcen, 19 à 21 Mars 2017.

Identification of species of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in stool of calves in BATNA (North east algeria)

D. Benhouda, A. R. Sannella, D. Baroudi, A. Benhouda, A. Abdelaziz, A. Hakem & S. M. Caccio

3. Séminaire interinternationale sur la Valorization des Ressource Naturelle dans les Zones Semi –haride ,M’sila 22 et Novembre 2016

Occurrence and Molecular Typing of (*Giardia* and *Cryptosporidium*)In Calfs (Batna, North East Algeria).

BENHOUDA Djahida, Sannella Anna Rosa, Benhouda Afaf, TOZINI Fabio, CACCIO Simone Mario, HAKEM AHCÈNE.

4. 2^{ème} journée de parasitologie : Parasitoses en Algérie 2015, à Batna, le 8 octobre 2015

Analysis of some parasites in human faecal samples from CHU of BATNA

Benhouda D¹, AKAM I¹, Hamouda O², Benhouda A³, Chelgham I²

5. Journée Sur Biodiversité Des Ecosystèmes Naturels Méditerranées. Djelfa, 22 Mai 2017

Parasitic infection detected by FLOTAC in bovines from BATNA, Algeria

Benhouda D¹, Benhouda A³, Djamel Baroudi⁴, Lihua Xiao⁵, Giuseppe Cringoli, Hakem A¹, Laura Rinaldi²

6. 3èmes Journées Franco-Maghrébines de Parasitologie- Mycologie Bordj El Kiffan, Alger les 24-25-26 Octobre 2017

PREMIERE INVESTIGATION MOLECULAIRE DE CRYPTOSPORIDIUM SPP. CHEZ LES VEAUX DANS LA REGION DE BATNA (ALGERIE)

D. Benhouda, A. R. Sannella, D. Baroudi, A. Benhouda, A. Abdelaziz, A. Hakem & S. M. Caccio.

INFLUENCE DE L’AGE SUR LA PREVALENCE DE *GIARDIA* SPP ET DE *CRYPTOSPORIDIUM* SPP CHEZ LES VEAUX DANS CERTAINS ELEVAGES DE L’EST ALGERIEN

A. Abdelhafid, D. Baroudi, D. Benhouda, A. Hakem, S. Caccio & A. Mekroud.

Zoonotic Potential risks of some Parasitic Protozoa in childhood and adult populations living in urban and rural areas through pets

Abstract

Usually, calves suffer from diarrhea especially during the postpartum period, this diarrhea has many causes, including: Bacteria, viruses, parasites.

Following this pathology which constitutes a real scourge for cattle breeding and that the involvement of parasites in the etiology of neonatal diarrhea was confirmed in epidemiological and experimental studies undertaken in different corners of the globe.

Our goal is to determine the prevalence of intestinal parasites in these cattle in Batna based on certain risk factors such as age and sex. Through the use of different classical and molecular techniques and the transmission effect in humans.

The study was conducted on 641 human feces samples and calves ranging in age from 1 day to 2 years where we analyzed 620 animal samples for a two-year period.

The technique of Ziehl-Neelsen modified by Henriksen and Pohlenz is used for the detection of *Cryptosporidium* and then associated with the immunofluorescence test and Lugol test for the detection of *Giardia* in the stools of cattle and humans.

In humans, in all samples 1 positive case for *Cryptosporidium* spp. is detected. Direct examination revealed the presence of: *Ascaris lumbricoides* (4.83%), *Entamoeba coli* (6.24%), *Giardia intestinalis* (7.17%), *Endolimax nana* (7.02%) and *E. histolytic* (8.89%).

Of the subjects reviewed, 150 (23.24%) were found infected, 63 (20.58%) in rural areas and 87 (25.9%) in urban areas.

Parasitism has a high prevalence among children in rural areas 39.21% but adults have a prevalence of 10.94% but for the urban area the prevalence of parasitism in children is 25.00 % and in adults is 27.82 %.

We found that in In cattle 48.7% of the calf population is infected with *Cryptosporidium* spp. Cryptosporidia isolated from diarrheal calves and non-diarrheal calves, with respective rates 60.4% and 12.0% respectively. A higher frequency of parasite excretion is noted in animals aged between 2 and 3 weeks (25.1%). We know that the sex has no influence on the incidence of cryptosporidium in calves, for *Giardia* no sample has been revealed positive.

Molecular techniques are performed on 66 faecal samples from cattle. The search for the 18S rRNA gene and the sequencing of the GP 60 gene in *Cryptosporidium* revealed the presence of three species: *Cryptosporidium bovis* (n = 14), *C. ryanae* (n = 6) and *C. parvum* (n = 4). Only one zoonotic subtype for *C. parvum* (subtype IIaA13G2R1) could be identified among 24 genotyped isolates.

About *Giardia*, a prevalence of 6.06% was found after searching for the β -giardine gene.

The association of the two parasites *Cryptosporidium* and *Giardia* in diarrheal calves were observed in two calves, for sex has an effect on the prevalence of *Giardia intestinalis* with a high rate in male calves than female calves but for *Cryptosporidium* the sex has no influence.

To analyze the prevalence of different parasites in bovine faecal specimens the FLOTAC method was used for 174 samples, the parasites identified by this method are *Other Protozoa* 101(58.04%), *Eimeria* spp. 92 (52.87%), *Strongles* 47 (27.01%), *Trichuris* 1 (0.57%), *Paramphistomes* 4 (2.34%), *Toxocara* 2 (1.15%).

Another method of flotation is mini-Flotac wich applied on 220 samples, the identification of the parasites was executed : *Strongle* 22 (10%), *Toxocara* 2(0.9%), *Eimeria* spp. 81 (36.81%) and *Other Protozoa* 94 (42.72%).

Key words: diarrhea, humans, cattle, intestinal parasites, Batna, FLOTAC, PCR.

المخاطر المحتملة من بعض الطفيليات الأولية الموجودة عند الحيوان على الأطفال والبالغين الذين يعيشون في المناطق الحضرية والريفية عن طريق الحيوانات الأليفة

ملخص

عادة ما يعاني العجول من الإسهال خاصة خلال فترة ما بعد الولادة ، وهذا الإسهال له أسباب كثيرة ، بما في ذلك : البكتيريا والفيروسات والطفيليات. هذه الحالة المرضية التي هي آفة حقيقية للماشية واعتبار الطفيليات من مسببات الإسهال للأبقار حديثي الولادة وأكد ذلك في الدراسات الوبائية والتجريبية التي أجريت في مختلف المناطق من العالم.

هدفنا من هذه الدراسة هو تحديد انتشار الطفيليات المعوية في البقرات في ولاية باتنة على أساس بعض عوامل الخطر مثل العمر والجنس وذلك باستخدام مختلف التقنيات الكلاسيكية والجزيئية وتأثير انتقال هذه الطفيليات على الانسان .

أجريت الدراسة على 641 عينة من براز الإنسان و عجول تتراوح أعمارهم من يوم إلى عامين قمنا فيها بتحليل 620 عينة من براز هذه العجول و ذلك لمدة عامين.

للكشف عن *Cryptosporidium* تستعمل تقنية Ziehl-Neelsen المعدله مرفقه بتقنيه الوسم المناعي وللكشف عن *Giardia* استعمل اختبار lugol وذلك في براز كل من العجول والانسان.

عند الانسان، في جميع العينات، تم اكتشاف حالة إيجابية واحدة للـ *Cryptosporidium spp.* كشف الفحص المباشر عن وجود:

و (*Ascaris lumbricoïdes* (4,83%), *Entamoeba coli* (6,24%), *Giardia intestinalis* (7,17%), *Endolymax nana* (7,02%) و *E. histolytica* (8,89%).

من بين العينات التي تمت معالجتها، تم العثور على 150 (23,24%) مصاب، 63 (20,58%) في المناطق الريفية و 87 (25,9%) في المناطق الحضرية.

يوجد معدل انتشار مرتفع للطفيليات بين الأطفال في المناطق الريفية 39,21% ولكن البالغين بنسبة 10,94% ولكن في المناطق الحضرية يبلغ معدل انتشار الطفيلي عند الأطفال 25,00% وفي البالغين 27,82%.

في الأبقار، 48,7% من العجول مصابه به *Cryptosporidium spp.* هذه الاخيره وجدت بكثرة في العجول المصابه بالإسهال أكثر من العجول الغير المصابه بنسب تقدر بـ 60,4% و 12,0% على التوالي. ولوحظ وجود تواتر أعلى لإفراز الطفيليات في الحيوانات التي تتراوح أعمارها بين 2 و 3 أسابيع (25,1%)، اما الجنس ليس له تأثير على نسبة هذا الطفيلي عند العجول ، لم يتم العثور على أي عينه ايجابية لـ *Giardia*.

التقنيات الجزيئية طبقت على 66 عينة البراز من الأبقار. كشف البحث عن مورثه ARNr 18S وتسلسل مورثه GP 60 في *Cryptosporidium* وجود ثلاثة أنواع: *Cryptosporidium bovis* (n = 14) ، *C. ryanae* (n = 6) و *C. parvum* (n=4). تمكنا من التعرف على نوع فرعي واحد حيواني المنشأ لـ *C. parvum* (النوع IIaA13G2R1) من بين 24 عزلة وراثية.

بالنسبه لجيارديا ، تم العثور على نسبة انتشار 6.06% بعد البحث عن مورثه β -giardine.

الجمع بين *Giardia* و *Cryptosporidium spp.* في العجول المصابه بالإسهال لوحظ في اثنين منها، اما بالنسبة لنوع الجنس له تأثير على انتشار الجيارديا المعوية مع نسبة عالية في العجول الذكور من العجول الإناث ولكن بالنسبه لكريبتوسبورديوم الجنس لا يوجد لديه تأثير.

لتحليل انتشار الطفيليات المختلفة في عينات البراز البقري استخدمت طريقة FLOTAC على 174 عينة ، الطفيليات التي تم تحديدها بهذه الطريقة هي:

Autres Protozoaire 101(58,04%), *Eimeria spp.* 92 (52,87%), *Strongles* 47 (27,01%), *Trichuris* 1 (0,57%),

Paramphistomes 4 (2,34%), *Toxocara* 2 (1,15%).

تم تطبيق طريقة أخرى للتعوييم Mini-Flotac على 220 عينة ، حيث تم تحديد الطفيليات التاليه :

Strongle 22 (10 %), *Toxocara* 2(0,9%), *Eimeria spp.* 81(36,81%), و *Autres Protozoaires* 94 (42,72%)

الكلمات المفتاحية : الإسهال ، الإنسان ، الأبقار ، الطفيليات المعوية ، باتنة ، PCR ، FLOTAC .

Risques du Potentiel Zoonotique de certains Protozoaires Parasites chez les populations infantiles et adultes vivants en zone urbaine et rurale via les animaux domestiques

Résumé

Habituellement, les veaux souffrent de la diarrhée pendant la période post-partum, cette diarrhée a de nombreuses causes, notamment : les bactéries, les virus et les parasites.

Suite à cette pathologie qui constitue un véritable fléau pour l'élevage des bovins et que la mise en cause des parasites dans l'étiologie des diarrhées néonatales fut confirmé dans les études épidémiologiques et expérimentales entreprises dans différents coins du globe.

Notre but de travail est de déterminer la prévalence des parasites intestinaux chez les humains vivant en milieu rurale et urbaine et chez les bovins dans la Wilaya de Batna en fonction de certains facteurs de risque tels que l'âge et le sexe. Par l'usage de différentes techniques classiques et moléculaires et l'effet de transmission chez l'être humain.

L'étude a été menée sur 641 échantillons de matières fécales humains et les veaux dont la tranche d'âge de 1 jour à 2 ans où nous avons analysé 620 échantillons d'animaux pour une période de deux ans.

La technique de Ziehl-Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz est utilisée pour la détection de *Cryptosporidium* puis associée à un test d'immunofluorescence et un test de lugol pour la détection de *Giardia* dans les selles des bovins et des humains.

Chez les humains, dans tout les échantillons 1 cas positif pour *Cryptosporidium* spp. est détecté. L'examen direct a révélé la présence : *Ascaris lumbricoïdes* (4,83%), *Entamoeba coli* (6,24%), *Giardia intestinalis* (7,17%), *Endolymax nana* (7,02%) et *E. histolytica* (8,89%).

Parmi les sujets examinés, 150 (23,24%) ont été trouvés infectés, 63 (20,58 %) dans les régions rurales et 87 (25,9 %) dans les régions urbaines.

Le parasitisme a une grande prévalence chez les enfants des régions rurales 39,21 % mais les adultes ont une prévalence de 10,94 % mais pour la région urbaine la prévalence de parasitisme chez les enfants est 25,00 % et chez les adultes est 27,82 %.

Chez les bovins, 48,7% de veaux sont infectés par *Cryptosporidium* spp. les cryptosporidies isolés chez veaux diarrhéiques que non diarrhéiques, avec des taux respectifs 60,4% et 12,0% respectivement. En plus une grande fréquence d'excrétion du parasite est notée chez les animaux âgés entre 2 et 3 semaines (25,1%). Sachant que le sexe n'a aucune influence sur les incidences des cryptosporidies chez les veaux mais pour *Giardia* aucun échantillon n'a été révélé positif.

Les techniques moléculaires sont réalisées sur 66 échantillons fécaux des bovins. La recherche du gène ARNr 18S et le séquençage du gène gp 60 au sein de *Cryptosporidium* a révélé la présence de trois espèces: *Cryptosporidium bovis* (n = 14), *C. ryanae* (n = 6) et *C. parvum* (n = 4). Un seul sous type zoonotique de *C. parvum* (sous-type IIaA13G2R1) a pu être identifié parmi 24 isolats génotypés.

A propos de *Giardia*, une prévalence de 6,06% a été trouvée après recherche du gène β -giardine.

L'association des deux parasites *Cryptosporidium* et *Giardia* chez les veaux diarrhéiques a été observée chez deux veaux, pour le sexe a un effet sur la prévalence de *Giardia intestinalis* avec un taux élevé chez les veaux mâles que les veaux femelles mais pour *Cryptosporidium* le sexe n'a aucune influence.

Pour analyser la prévalence de différents parasites dans les échantillons fécaux de bovins, la méthode FLOTAC a été utilisée pour 174 échantillons, les parasites identifiés par cette méthode sont *Autres Protozoaire* 101 (58,04%), *Eimeria* spp. 92 (52,87%), *Strongles* 47 (27,01%), *Trichuris* 1 (0,57%), Paramphistomes 4 (2,34%) et *Toxocara* (1,15%).

Une autre méthode de flottation Mini-Flotac a été appliquée sur 220 échantillons, qui donne les parasites suivants : *Strongle* 22 (10 %), *Toxocara* 2(0,9%), *Eimeria* spp. 81(36,81%) et *Autres Protozoaires* 94 (42,72 %).

Mots clés : diarrhée, humains, bovins, parasites intestinaux, Batna, FLOTAC, PCR.

