

Evaluation comparative des méthodes de détection de l'oocyste de *Cryptosporidium parvum* dans les selles des veaux

D. KHELEF, A. AKAM*, R. KAIDI*, Maria S. ABDUL HUSSEIN**,
E. ŞUTEU***, V. COZMA***

Ecole Nationale Vétérinaire Alger, Algérie

* Institut des Sciences Vétérinaire, Université de Saad Dahleb de Blida, Algérie

** Université de Mouloud Maamerie, Faculté de Biologie, Tizi-ouzou, Algérie

*** Faculté de Médecine Vétérinaire Cluj-Napoca, Roumanie

RESUME. Dans cette étude, 7 techniques coproscopiques utilisables pour le diagnostic courant de la Cryptosporidiose sont comparées. A l'instar des techniques utilisées, il ressort que seule la technique de Ziehl-Neelson modifiée par Henriksen et Polhenz est apparue la plus performante tant sur le plan qualitatif que facilité d'interprétation avec un pourcentage de positivité de 22.62 et ce quelque soit la consistance des selles, à un degré moindre celle d'Anderson (15.11%). Pour les autres techniques, seule la technique de Heine s'est avérée la plus sensible et la plus rapide dans l'orientation du diagnostic. Pour cette raison son application doit être toujours suivi par la technique de Ziehl-Neelson modifiée par Henriksen et Polhenz.

Mots clés: Cryptosporidiose, Veau, Oocyste, Méthodes de diagnostic

Introduction

La présence de *C. parvum* dans les selles de veaux et la participation de ce parasite dans l'étiologie des diarrhées néonatales des jeunes bovins n'est plus à démontrer. De nombreuses enquêtes épidémiologiques ont fait état de l'action primaire de cet agent dans l'étiologie du syndrome diarrhéique néonatale des veaux (16, 21, 9). Devant l'impact grandissant de cette parasitose qui constitue un véritable frein pour l'élevage bovin laitier, plusieurs auteurs ont essayé de mettre en évidence le parasite dans les selles par l'utilisation d'une série de techniques et de mettre en pratique une étude comparative entre ces techniques et ce afin d'évaluer leurs sensibilités et leurs fiabilités (1, 2, 3, 4, 13, 14, 10, 15, 17, 21, 23). Pour cette raison, il nous est apparu intéressant d'évaluer le degré de sensibilité de chacune des 7 techniques coproscopiques les plus couramment utilisées pour le diagnostic de la Cryptosporidiose.

Matériel et méthodes

Dans la période allant du 2 janvier 2001 au 30 mai 2001, 1063 échantillons de selles dont 674 diarrhéiques et 389 non diarrhéiques sont récoltés sur 154 veaux appartenant à quatre unités d'élevages bovins de la région de Mitidja "Algérie". Selon les techniques utilisées, les selles récoltées sont subdivisées en deux volumes, l'un est systématiquement additionné avec du bichromate de K à 2.5% (Volume/2volume), puis conservée immédiatement dans le réfrigérateur (4-8°C), l'autre volume est mélangée avec du formol à 10% (volume/2volume) dans des tubes en verres de 5 ml et conservée à la température du laboratoire. Les frottis fécaux sont réalisés à partir des selles conservées dans du bichromate de K, puis colorés par les techniques de coloration temporaires [Heine (4), l'auramine 0 (3)] et permanentes [Ziehl-Neelson modifiée par Henriksen et Polhenz (5), Ziehl-Neelson modifiée par Angus (2), Giemsa (8)], de même que pour la technique d'Anderson (2). Quant à l'examen du culot concentré par la technique de

formol-éther (1), il n'est fait que sur les selles conservées dans du formol. De ces échantillons, 3370 frottis de selles diarrhéiques et 1945 non diarrhéiques sont confectionnés pour les colorations temporaires et permanentes; 1348 préparations de selles diarrhéiques et 778 non diarrhéiques sont réalisés pour les techniques de concentration (Anderson, Formol-éther).

Toutes les techniques sont dans la plupart du temps appliquées dans les 2 à 4 heures qui suivent l'exécution des prélèvements et souvent simultanément. Quant à la lecture des lames, elle se fait à des intervalles de temps différents, en utilisant le microscope optique pour les techniques de colorations permanentes et celles de concentrations et le microscope à contraste de phase pour la technique de Heine. Pour la technique de l'auramine O, la lecture des lames s'effectue sur microscope à fluorescence. La confection des frottis fécaux est faite différemment selon la consistance des selles. En effet, pour les selles diarrhéiques des frottis minces sont confectionnés en plusieurs lames, puis séchés à l'air et colorés ensuite par les différentes techniques (les deux variantes de Ziehl, Giemsa, Heine, l'auramine O). Quant aux selles solides, une dilution est nécessaire pour l'obtention de frottis minces de bonne qualité.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus (Tableau 1) indiquent que parmi les sept techniques utilisées pour la détection des oocystes de *C. parvum* dans les selles des veaux, la technique de coloration d'Henriksen est apparue la plus sensible et la plus fiable, avec un pourcentage de positivité de 22.62, à un degré moindre celles d'Angus (15.77) et d'Anderson (15.14). En outre, nous constatons que plus les selles sont moyennement ou lourdement riche en parasite, plus le nombre de technique dont les résultats se rejoignent dans l'identification du parasite augmente.

Pour ce qui est des résultats des techniques utilisées pour la recherche du parasite dans les échantillons de selles "diarrhéiques et non diarrhéiques" et comme le montre le Tableau 1, la technique d'Henriksen se révèle la plus performante avec un pourcentage de 21.21 pour les selles diarrhéiques et 30.62 pour les selles non diarrhéiques en comparaison avec les pourcentages obtenus avec les autres techniques et particulièrement avec celle de formol-éther qui

donne un très faible pourcentage, soit 9.61 pour les selles diarrhéiques et 5.62 pour les selles non diarrhéiques.

En comparant la technique d'Henriksen à celle d'Angus, nous remarquons que 73 selles (50 diarrhéiques et 23 non diarrhéiques) qui se sont révélées à la fois négatives par la technique d'Angus et positives par la coloration d'Henriksen, démontrant par là même, la sensibilité de la technique d'Henriksen par rapport à celle d'Angus, sensibilité qui semble surtout liée à la quantité de parasite que contient les selles.

Quant à la comparaison de la technique de Giemsa à celle d'Henriksen, nous constatons que sur les 126 selles (87 diarrhéiques et 39 non diarrhéiques) qui ne sont pas positives par la technique de Giemsa, se sont montrés positives par la technique d'Henriksen. De même observations sont faites entre les techniques "Giemsa-Heine" et "Giemsa-Anderson". Donc, il apparaît que les raisons pour lesquelles la technique de Giemsa ne donne pas des résultats comparables à ceux obtenus par les techniques de Heine et d'Anderson sont principalement liés à la quantité de parasite que renferme les selles et moins souvent à la difficulté de la reconnaissance des oocystes dans les selles parasités.

D'autre part, nous constatons que les résultats obtenus entre la technique d'Angus et celle d'Anderson sont très comparables aussi bien pour les selles diarrhéiques que les selles non diarrhéiques. De même qu'une sensibilité très voisine est relevée entre la technique d'Anderson et celle de Heine, mais avec une efficacité plus marquée pour la première technique qui met en évidence 24 selles diarrhéiques non révélées par la deuxième technique. Cette différence enregistrée entre les deux techniques semble être liée principalement au volume de matière fécale par selle analysée par la méthode d'Anderson qu'à la quantité d'éléments parasitaires que renferme les selles.

Quant aux échantillons de selles qui échappent à la technique de Heine (90 selles dont 68 diarrhéiques et 22 non diarrhéiques) et celle de l'auramine O (108 selles dont 77 diarrhéiques et 31 non diarrhéiques), ils se révèlent positifs par la technique d'Henriksen. Cette différence de résultats semble être liée surtout au nombre de

parasite dans les selles, et moins souvent à la difficulté de la lecture des lames.

Nous remarquons que le nombre d’oocyste pour le même prélèvement, qu’il soit diarrhéique ou non, il est nettement supérieur avec la technique d’Henriksen qu’avec les autres techniques, en particulier celles de concentrations (Anderson, Formol-éther) en raison de l’existence de débris qui entravent l’identification de l’oocyste.

Quant à la morphologie du parasite visualisée par les différentes techniques coproscopiques susmentionnées, elle est variable. En effet, avec la technique d’Henriksen, nous obtenons une meilleure visualisation de la morphologie du parasite à savoir, sa paroi, ses constituants internes (4 sporozoïdes, corps résiduel) et en second lieu vient celle d’Anderson en

comparaison avec les autres techniques (Angus, Giemsa, Heine, l’auramine O et Formol-éther) qui offrent dans la plupart du temps une vue d’ensemble du parasite sans révéler ses structures internes.

A la lumière des données bibliographiques consultées, il semble que le diagnostic de la cryptosporidiose aussi bien chez l’espèce humaine ou chez les animaux, est basé le plus souvent sur l’observation du parasite dans les frottis de selles colorées par les différentes techniques coproscopiques appropriées, que par l’utilisation des méthodes de concentrations. Dans notre étude, 7 techniques coproscopiques sont comparées pour l’identification de l’oocyste de *C. parvum* dans les selles de veaux. Les résultats nous indiquent que seule la technique d’Henriksen apparaît la plus efficace.

Tableau 1

Nombre de prélèvements positifs obtenus par les différentes techniques coproscopiques en fonction des échantillons de selles totales, diarrhéiques et non diarrhéiques

Techniques coproscopiques	Résultats en nombre et en pourcentage		
	S.T. (%)	S.D. (%)	S.N.D. (%)
Ziehl-Neelson modifiée par Henriksen et Polhenz	241 (22.62)	192 (21.21)	49 (30.62)
Ziehl-Neelson modifiée par Angus	168 (15.77)	142 (15.69)	26 (16.25)
Giemsa	115 (10.79)	105 (11.60)	10 (6.25)
Heine	151 (14.17)	124 (13.70)	27 (16.87)
Auramine O	133 (12.48)	115 (12.70)	18 (11.25)
Anderson Flottation sur saccharose	161 (15.11)	140 (15.46)	21 (13.12)
Formol-éther	96 (9.01)	87 (9.61)	9 (5.62)

S.T. – Selles totales; S.D. – Selles diarrhéiques; S.N.D. – Selles non diarrhéiques.

Tableau 2

Estimation de la qualité de la morphologie de l’oocyste *C. parvum* visualisée par les différentes techniques coproscopiques

Techniques	Morphologie de l’oocyste	
Ziehl-Neelson modifiée par Henriksen et Polhenz	A	Excellente
Ziehl-Neelson modifiée par Angus	A	Bonne
Giemsa	A	± bonne
Heine	B	Moyenne
L’auramine O	C	Mauvaise
Anderson	A	Très bonne
Formol-éther	A	Mauvaise

La qualité de la morphologie du parasite (Tableau 2) est basée selon les critères suivants: la taille, la forme et les structures internes du parasite: (A) Examen sous microscope optique; (B) Examen sous microscope à contraste de

phase; (C) Examen sous microscope à fluorescence sensible, à un degré moindre celles d’Anderson et de Heine. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par d’autres auteurs (20, 11, 5, 18, 21, 7).

Polack et al. (1983) cherchant les cryptosporidies dans les selles de chevreaux et de veaux, montrent que seule la technique d'Henriksen et celle de Heine paraissent fiables et faciles d'interprétations. De même que Garcia et al. (1983) travaillant sur les selles humaines et après comparaison de la technique de coloration de Ziehl-Neelson modifiée aux techniques de Heine, de Giemsa et de flottation sur saccharose, montrent sa plus grande sensibilité dans la détection du parasite.

Smith (1988), s'intéressant à l'identification de l'oocyste de *C. parvum* et *C. muris* dans les eaux par l'utilisation des différentes techniques de colorations, est arrivé à la même conclusion que les auteurs pré-cités. Beauvais et al. (1989), comparant les résultats des examens portant sur la recherche des oocystes dans les frottis de selles colorés par la technique d'Henriksen à ceux obtenus par les méthodes de Ritchie et de fluorescence, trouvent que seule la technique d'Henriksen est sensible comparativement aux autres techniques. Les mêmes observations sont obtenus par Forget et al. (1990) deux années plus tard. Ces derniers, comparant la technique de Mérifluor "Fluorescence" à celle de coloration d'Henriksen, remarquent que les deux techniques présentent une sensibilité très comparable et recommandent vivement l'utilisation de la technique d'Henriksen en raison de la stabilité de la coloration et du volume important de selles à analyser.

Robert et al. (1990), utilisant les techniques d'ELISA et de flottation sur saccharose pour la détection des oocystes dans les selles de veaux, trouvent que les deux techniques présentent un degré de sensibilité très voisin surtout pour les selles moyennement ou fortement riches en parasite et des résultats variables entre les deux techniques pour les selles pauvres en parasite. Les mêmes auteurs reconnaissent la grande sensibilité des techniques de coloration des frottis de selles mais ils reprochent leurs applications à défaut du temps qu'elles consomment. En outre, ils suggèrent l'application soit de la technique de coloration des frottis soit celle de l'immunofluorescence sur des frottis de selles pour donner un diagnostic de précision.

Dărăbuș (1996), comparant 6 techniques coproscopiques pour l'identification des Cryptosporidies, obtient une sensibilité à la fois très élevée et très voisine entre la technique

d'Henriksen et celle d'Anderson en comparaison avec les autres techniques de coloration et de concentration et propose pour le diagnostic de la Cryptosporidiose l'utilisation de l'une des deux premières techniques. Quant à Casmore et al. (1985), ils suggèrent pour la recherche des cryptosporidies l'utilisation de l'auramine-phénol pour orienter rapidement dans le diagnostic et la coloration d'Henriksen pour la confirmation. Dans notre cas, il apparaît que la coloration de Heine est plus stable que la méthode de l'auramine O en raison du temps très court qu'elle prend et de l'obtention d'une bonne qualité de la morphologie du parasite. Pour ce qui est de l'utilisation de la coloration de Giemsa et celle d'Angus, elles ne donnent pas de résultats satisfaisants particulièrement pour les selles pauciparasitées et offrent souvent une vue d'ensemble du parasite. Nous recommandons donc pour le diagnostic de la Cryptosporidiose l'utilisation de la technique de coloration d'Henriksen en raison de sa sensibilité très élevée et de ses grands avantages qui se résument en la grande stabilité de la coloration, de la possibilité de faire la lecture des lames ultérieurement et de la disponibilité des réactifs. Cependant, vue sa lenteur, nous conseillons d'utiliser soit la technique d'Anderson soit celle de Heine pour s'orienter dans la démarche du diagnostic de la Cryptosporidiose.

Conclusion

À la lumière de notre étude comparative de 7 techniques coproscopiques utilisées pour le diagnostic de la Cryptosporidiose, il s'est avéré que seule la technique de coloration d'Henriksen est efficace, avec un pourcentage de 22.62% et ce quelque soit la consistance des selles (21.21% pour les selles diarrhéiques et 30.62% pour les selles non diarrhéiques), à un degré moindre celles d'Anderson (15.11%) et de Heine (14.17%). Quant à l'utilisation de la technique d'Angus, de Giemsa et de formol-éther, sont à éviter en raison de la difficulté de l'identification des oocystes "fantômes" surtout dans les selles pseudoparasitées. Cependant, l'application des techniques d'Anderson et de Heine offrent l'avantage d'avoir un temps de réalisation très court en comparaison avec celui d'Henriksen. Donc, en pratique nous conseillons d'utiliser pour le diagnostic de la Cryptosporidiose la technique d'Henriksen pour établir le diagnostic de certitude et d'appliquer soit la technique d'Anderson soit celle de Heine pour l'orientation dans la démarche du diagnostic et ce quelque soit la consistance des selles.

REZUMAT

Evaluarea comparativă a metodelor de detectare a oocistului de *Cryptosporidium parvum* în fecale la vițeii

Cercetările au stabilit valoarea comparativă a 7 tehnici de laborator utilizabile în diagnosticul coproscopice al criptosporidiozei. Cea mai performantă metodă (M.) s-a dovedit M. Ziehl-Neelson modificată de Henriksen și Polhenz, atât din punct de vedere calitativ cât și al ușurinței

interpretării. Examinând aceleași probe coproscopice de vițeii, metoda a avut 22,62% pozitivitate, indiferent de consistența fecalelor, în timp ce M. Anderson - 15,11%. Dintre celelalte tehnici, numai M. Heine are oarecare sensibilitate și rapiditate în orientarea diagnosticului. De aceea, aplicația sa implică și confirmarea prin M. Ziehl-Neelson modificată.

Cuvinte cheie: Criptosporidioză, Vițeii, Oocist, Diagnostic

Références bibliographiques

1. Allen V.H., Ridley O.S., Further observation on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *J. Clin. Pathol.* 1970, 23: 545-546.
2. Anderson B.C., Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. *L.A.V.M.A.* 1981, 178: 9.
3. Anderson B.C., Quick and easy diagnosis of Cryptosporidiosis and Johne's disease. *Veterinary Medicine* 1985, 87-89.
4. Angus K.W., Campbell I., Gray E.W., Sherwood D., Staining of faecal cysts and *Cryptosporidium* cysts. *Vet. Rec.* 1981, 173.
5. Beauvais B., Sarfati C., Debrouin F., Garth J.F., Lariviere M., Deletoille P., Evaluation comparative de deux méthodes de dépistage des oocystes de *Cryptosporidies* dans les feces humains. *Ann. Biol. Clin.* 1989, 47: 45-6.
6. Casmore D.P., Sands R.L., Curry A., *Cryptosporidium* species: a new human pathogen. *Journal of Clinical Pathology* 1985, 38: 1321-1336.
7. Chermette R., Boufassa O., *Cryptosporidiose: une maladie animale et humaine cosmopolite.* O.I.E. Série technique 1988, Nr. 5.
8. Dărăbuș Gh., *Criptosporidioza: cercetări privind etiologia, epidemiologia, patogenia, diagnosticul și tratamentul în infecțiile naturale și experimentale.* Teză de Doctorat, Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara, 1996.
9. Deluol A.M., Cenac J., Matherson S., Marche C., Savel J., *La Cryptosporidiose, diagnostic biologique.* *Ann. Biol. Clin.* 1984, 42: 399-405.
10. De Graaf D.C., Vanopdenbosch E., Ortega-Mora L.M., Abassi H., Peeters J.E., A review of importance of cryptosporidiosis in farm animals. *International Journal for Parasitology* 1999, 29: 1269-1287.
11. Forget E., Deluol A.M., Cenac J., Détection des oocystes de *Cryptosporidium* dans les selles. *Feuille de biologie*, 1990, Vol. XXXI, Nr. 177.
12. Garcia L.S., Bruckner D.A., Brewer T.C., Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* oocysts from stool specimens. *J. Clin. Microb.* 1983, 1: 185-90.
13. Gunther R., *Kryptosporidien beim kalb bedeutung, Nachweis und Bekämpfung,* *Monats. Vet. Med.* 1983, 38, 17: 653-655.
14. Heine J., *Eine einfache nachweismethode für Kryptosporidien im kot (An easy technique for demonstration of Cryptosporidia in faeces).* *Zbl. Vet. Med.* 1982, 29: 324-27.
15. Henriksen S.A., Polhenz J.F.L., Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelson technique. *Acta Vet. Scand.* 1981, 22: 594-6.
16. Krogh H.V., Henriksen S.A., *Bovine Cryptosporidiosis in Denmark: Cryptosporidia associated with neonatal calf diarrhea.* *Nord. Vet. Med.* 1985, 37: 42-47.
17. Miláček P., Vitovec J., Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica (PRHA)* 1985, 32: 50.
18. Polack B., Chermette R., Savey M., Bussieras J., *Les Cryptosporidies en France: techniques usuelles d'identification et résultats préliminaires d'enquêtes épidémiologiques.* *Point Vét.* 1983, Vol. 15, Nr. 71: 41-6.

19. Robert B., Ginter A., Antoine H., Collard A., Coppe P., Diagnosis of bovine Cryptosporidiosis by an enzym-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology* 1990, 37: 1-8.
20. Robert B., Collard A., Coppe P., Ginter A., Antoine H., Epidémiologie de la cryptosporidiose bovine dans une ferme Belge, essai de prévention à l'aide du colostrum. *Ann. Med. Vet.* 1991, 135: 441-46.
21. Robert F.C., Philip D.M., A rapid staining technique for Cryptosporidia. *Modern Vet. Practice* 1984, 4.
22. Smith H.V., Waterborne cryptosporidiosis. *Lancet* 1988, 2, 1484.
23. Ungureanu E.M., Dontu G.E., A new staining technique for the identification of *Cryptosporidium* oocysts in faecal smears. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1992, 86: 638.