

I.2. Diagnostic d'une infestation par *Ostertagia ostertagi*

I.2.1. Diagnostic coprologique

Comme l'explique Gibe (2006), la recherche des œufs de nématodes par coproscopie en comptant les œufs contenus dans les fèces des animaux a pour objectif d'estimer leur degré d'infestation.

a) Prélèvements

Les prélèvements sont effectués lors de défécation naturelle de préférence avant contact avec le sol, ou directement dans le rectum de l'animal. Lors de chaque prélèvement, il convient de prélever environ 50 g de fèces pour un bovin.

Pour obtenir une information assez fiable sur un lot d'animaux, il convient de réaliser ces prélèvements sur plusieurs animaux d'un même lot.

b) Technique de flottation

Cette technique d'enrichissement est basée sur l'emploi de solution de densité supérieure à celle des éléments parasites à observer. Ainsi, une fois le prélèvement mélangé à la solution, les éléments parasites vont remonter en surface de la solution, et la plupart des débris fécaux vont sédimenter.

➤ Choix de la solution de flottation

Les solutions à utiliser sont nombreuses, et le choix est fonction des parasites recherchés. Il convient de choisir une solution de densité supérieure à celle des éléments parasites à observer, c'est-à-dire supérieure à 1,1 à 1,2, pour que la majorité des éléments parasites flottent. Certains œufs de parasites notamment les œufs de trématodes ont une densité supérieure à 1,30.

Cependant si leur densité est nettement supérieure à celle des œufs à observer ceux-ci vont se déformer, voire être détruits, et leur diagnose deviendra donc impossible.

Les solutions utilisables sont nombreuses (*cf.* tableau 1) et permettent la visualisation de tous les œufs suivant leur densité : les œufs ne flotteront que si leur densité est inférieure à celle de la solution dans laquelle ils se trouvent. Ainsi, par exemple les œufs les plus lourds tels que les œufs de *Fasciola* et de *Paramphistomum* ne sont observables qu'avec les solutions de densité supérieure à 1,3.

Tableau 1: Les différentes solutions utilisables en flottation (Gibe, 2006)

Solution de flottation	Composition (solution aqueuse)	Densité
Liquide de Faust	Sulfate de zinc à 33%	1,18
Liquide de Willis	Chlorure de sodium à saturation	1,2
Sulfate de magnésium	Sulfate de magnésium à saturation	1,28
Sulfate acétate de zinc	33g de sulfate de zinc 15g d'acétate de zinc QSP 100mL d'eau	1,33
Iodomercurate de potassium	150g de biiodure de mercure 11g de iodure de potassium 400g d'eau	1,44

Certaines de ces solutions, notamment le iodomercurate de potassium, ne sont cependant pas toujours utilisables en routine car elles présentent une toxicité pour le manipulateur et pour l'environnement. On choisira toujours en premier la solution la moins toxique.

➤ **Protocole**

Il convient tout d'abord d'homogénéiser le prélèvement. Ensuite, il faut mélanger 10 g du prélèvement dans 100 à 150 ml de solution dense.

Ensuite on va filtrer la solution obtenue, avec une passoire, afin de retenir les plus gros débris fécaux.

Enfin, il faut recueillir le filtrat dans un tube à essai, sans bulles d'air, jusqu'à obtenir un ménisque bombant, et déposer une lamelle au sommet de celui-ci.

Au bout d'une vingtaine de minutes, les œufs sont venus flotter en surface de la solution, et adhèrent ainsi à la face inférieure de la lamelle. On retire délicatement la lamelle et on la pose sur une lame.

Les œufs seront recherchés au microscope (objectifs x 10 et x 40).

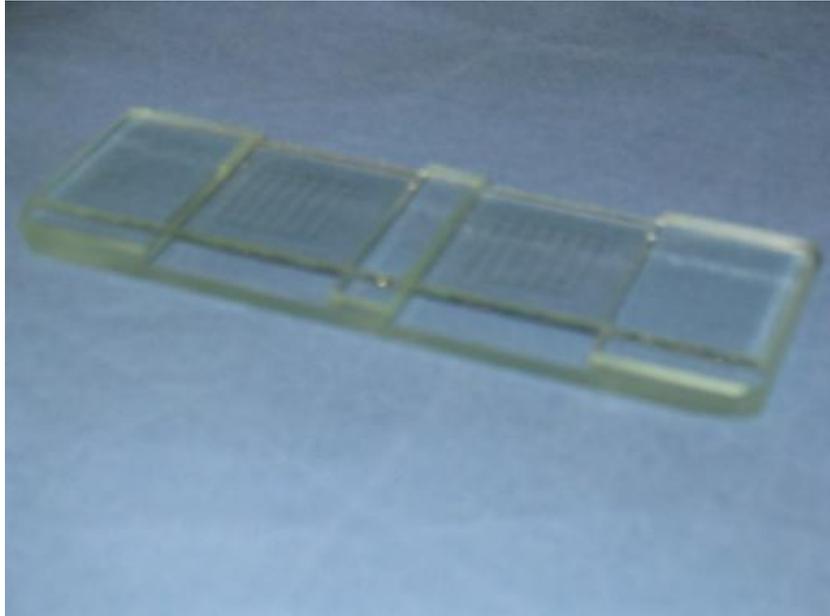
c) **Méthode de McMaster**

C'est une méthode quantitative, basée sur le principe de flottation.

➤ **La cellule de McMaster (cf. figure 7)**

La cellule de McMaster est divisée en deux chambres de 0,5 ml chacune. Sur la face supérieure de chaque chambre, est gravé un quadrillage de 1 cm² constitué de 6 colonnes, la hauteur de la chambre est de 1,5 mm, le volume sous chaque quadrillage est de 0,15 ml.

Figure 7: La cellule de McMaster (Gibe, 2006)



➤ **Protocole**

La technique consiste à peser 3 à 5 g de fèces homogénéisés et à les mélanger à la solution dense pour obtenir 45 à 75 ml de suspension (dilution au 1/15^{ème}). Les deux chambres de la cellule de McMaster sont remplies avec le mélange ainsi obtenu qui doit rester bien homogène. L'observation se fait à l'objectif x10, dix minutes après, le temps que les œufs migrent en haut des chambres.

Cette technique permet de quantifier les œufs présents dans le prélèvement. Le résultat est exprimé en Œuf Par Gramme (OPG). La suspension placée dans les cellules est diluée au 1/15^{ème}, et chaque quadrillage correspond à 0,15ml de cette solution. Il suffira donc de multiplier le nombre obtenu dans une cellule par un facteur 100 pour obtenir le nombre d'œufs par gramme.

Pour obtenir une information plus représentative, il est conseillé de lire les deux chambres. Il suffira alors d'additionner les deux nombres d'œufs obtenus, et de multiplier ce dernier résultat par 50, pour obtenir un résultat en OPG. Le nombre d'OPG obtenu dans l'analyse des fèces est un indicateur du nombre de strongles parasitant l'individu.

d) Interprétation

Les techniques de coproscopie permettent de conclure avec certitude à la présence de parasites dans le tube digestif des animaux, par la mise en évidence de leurs œufs dans les fèces de ceux-ci. Cependant Vercruyse et Claerebout (2001) montrent que les coprologies ne sont un bon indicateur du nombre de strongles parasitant un bovin que pendant la première moitié de première saison de pâture, du fait de l'instauration d'une immunité vis-à-vis de ces parasites ; de l'instauration progressive de l'hypobiose des L4 et d'une ponte irrégulière par les parasites eux-mêmes.

L'utilisation de la cellule de Mac Master permet d'obtenir une quantification de l'infestation, ce qui reflète l'état parasitaire de l'individu.

Il est important de noter que l'absence d'œufs en flottation ne garantit pas l'absence de parasites. Ceux-ci ne pondent, en effet, pas tous en continuité, et des phases que l'on peut qualifier de silencieuses sont possibles, en outre lors de strongyloses larvaires il n'y a pas d'œufs. Dans tous les cas, il convient aussi de s'interroger sur la méthode de prélèvement.

I.2.2. Identification par coproculture

La coproculture parasitaire a pour but de laisser évoluer les œufs de parasites présents dans les fèces, jusqu'à leurs larves L3, ce qui permet d'identifier plus précisément les espèces de strongles présentes (Gibe, 2006).

a) Méthode

Le principe est simple. On étale environ 10 grammes du prélèvement directement dans le récipient de culture ou que l'on mélange avec de la vermiculite pour favoriser l'oxygénation des fèces.

On place la culture dans un milieu présentant une humidité de 50 à 80 %, une oxygénation correcte, et une température de 23 à 25°C, pendant 8 à 15 jours.

Ensuite, on isole les larves par la technique de Baermann à partir d'un échantillon de la culture.

Il ne reste qu'à observer les larves isolées au microscope (objectifs x 10 et x 40).

b) Interprétation

L'identification des larves est plus compliquée qu'une simple identification des œufs de strongles, mais permet d'identifier les genres de strongles digestifs. Elle porte sur la taille de la larve, la forme de l'œsophage, la gaine, la forme et le nombre des cellules intestinales.

Cette méthode permet une identification précise, mais demande un délai assez long, d'environ 8 à 10 jours, et nécessite une bonne expertise pour reconnaître précisément les larves des différents genres de strongles digestifs.

I.2.3. Dosage du pepsinogène

a) Le pepsinogène

Le pepsinogène est le précurseur de la pepsine (Gibe, 2006). Il est produit par les cellules fundiques de la caillette chez les ruminants (ou de l'estomac des monogastriques).

En l'absence de lésions de la caillette, le pepsinogène est sécrété dans sa lumière, et une petite portion passe dans le sang. Une fois dans la caillette, le pepsinogène est transformé en pepsine active, sous l'action de l'acide chlorhydrique.

En présence de lésions de la caillette, les cellules fundiques, productrices de pepsinogène, et les cellules pariétales, productrices d'acide chlorhydrique, sont atteintes. On a donc une augmentation du pH dans l'estomac, due à la diminution de la production d'acide chlorhydrique, ce qui sera à l'origine d'une diminution de la conversion du pepsinogène en pepsine et de retentissements négatifs sur l'état général et la croissance du bovin.

De plus, les lésions de la caillette entraînent une destruction des jonctions serrées intercellulaires et une part plus importante du pepsinogène sécrété passe dans le flot sanguin. Cette fraction est proportionnelle à l'intensité des lésions.

Le pepsinogène plasmatique est donc augmenté en cas de lésions de la caillette. Or, au pâturage, le parasitisme, dû aux larves d'*Ostertagia* et d'*Haemonchus*, est la principale cause de lésions de la caillette, ce qui fait du dosage du pepsinogène un bon indicateur du degré d'infestation parasitaire des bovins. Il peut, selon Vercruyse et Claerebout (2001), être considéré comme spécifique des ostertagioses dans cette espèce dans les pays tempérés en raison de la faible importance des *Haemonchus* dans ces pays.

Chez les bovins, les taux normaux de pepsinogène sont inférieurs à 600 mU de tyrosine par litre (Kerbœuf *et al.*, 1979 et Kerbœuf *et al.*, 1981).

b) Prélèvement

On prélève du sérum sur tube sec. Le prélèvement ne doit pas être effectué sur EDTA ou sur héparine, car ces deux produits modifient la réaction de dosage.

La conservation est assez aisée après centrifugation et récupération du sérum.

L'hémolyse ne modifie pas la réaction de dosage, mais entraîne une variation de pH dont il faudra tenir compte.

Le prélèvement doit être acheminé le plus vite possible, ou congelé à -18°C, pour au maximum deux mois. La décongélation doit être lente, jusqu'à la température du laboratoire.

c) Méthodes de dosage

Le dosage repose sur la transformation du pepsinogène en pepsine active, que l'on fera agir sur un substrat protéique riche en acides aminés aromatiques (souvent de l'hémoglobine).

Il existe deux méthodes : la détection des anticorps anti-pepsinogène selon une méthode ELISA, ou l'estimation de l'activité enzymatique du pepsinogène ayant été transformé en trypsine. Cette dernière méthode est de loin la plus répandue, et c'est celle que nous allons décrire (Gibe, 2006).

Le dosage comporte deux étapes :

- Transformation du pepsinogène en pepsine sous l'action de la chaleur et de l'acidité du milieu, suivie de l'attaque d'un substrat, l'hémoglobine, par la pepsine ainsi formée. Les protéines non transformées sont précipitées sous l'action d'acide trichloracétique. La pepsine coupe les liaisons peptidiques du substrat avec une plus forte activité sur les liaisons impliquant des acides aminés aromatiques.
- Coloration spécifique des acides aminés aromatiques ainsi dégagés au cours de la première étape et lecture spectrophotométrique. La chaleur et l'acidité conduisent aussi à une coupure non spécifique des liaisons impliquant des acides aminés aromatiques. Ceux-ci sont dosés séparément et retranchés des valeurs trouvées pour les tubes contenant le pepsinogène. Les données obtenues sont comparées à celles résultant de la coloration d'une gamme étalon de tyrosine (qui est l'acide aminé aromatique de référence). Elles sont ainsi transformées en unités de tyrosine (U). Une unité de tyrosine représente le nombre de micromoles de tyrosine libérées par litre de sérum par minute. On utilise généralement la milli-unité de tyrosine (mU Tyrosine).

d) Interprétation

Le dosage du pepsinogène plasmatique permet d'évaluer l'importance des lésions pariétales de la caillette des ruminants, lésions dues de façon quasi exclusive aux larves d'*Ostertagia* et d'*Haemonchus*.

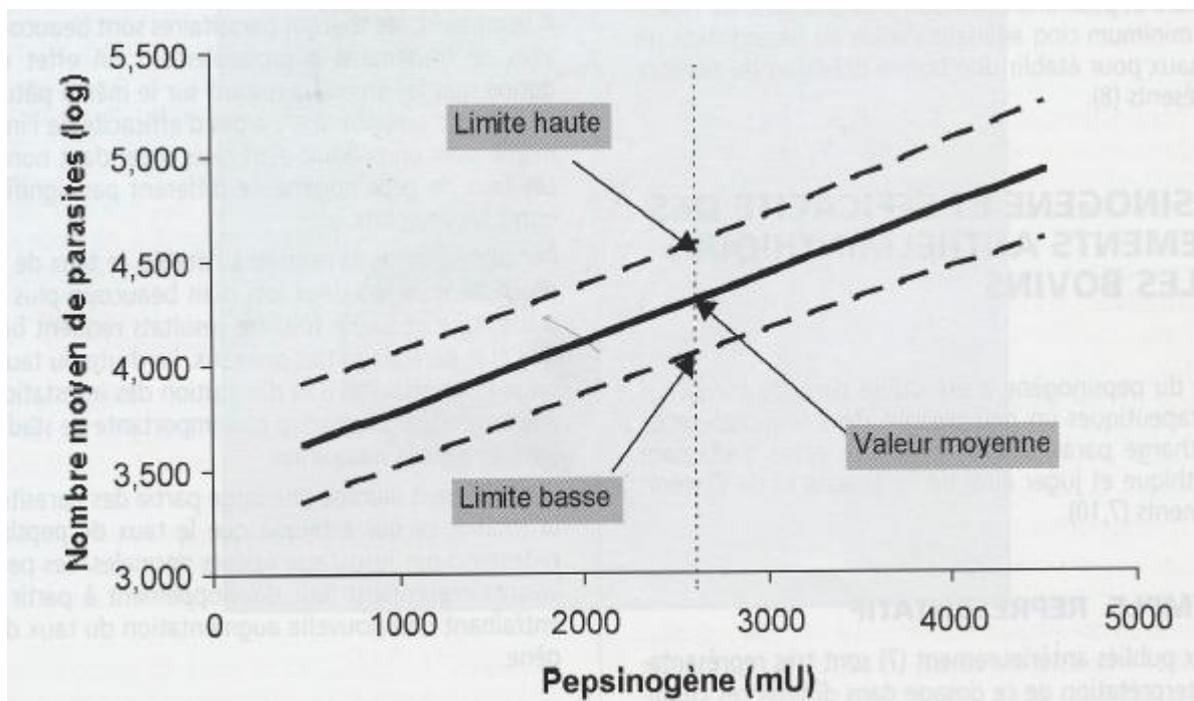
Ce dosage permet de réaliser une estimation de la charge parasitaire, et de ses effets, pour une valeur déterminée du taux de pepsinogène (Vercruysse et Claerebout, 2001).

Certains auteurs (Jorgensen *et al.*, 1976) ont relié ce dosage au gain de poids ou au nombre de L3 dans l'herbe.

Une « correspondance » entre le taux de pepsinogène plasmatique et la charge parasitaire (*cf.* figure 8) a pu être mise en évidence par Kerbœuf *et al.* (1981). Ils ont montré l'importance de la catégorie d'animaux, les meilleurs résultats étant obtenus avec des animaux en première ou deuxième année de pâture en élevage allaitant. De plus, ils préconisent de réaliser ces tests sur des échantillons de 5 à 7 animaux.

Kerbœuf *et al.* (1981) ont ainsi pu établir une relation entre le dosage de pepsinogène plasmatique et le nombre moyen de larves présentes dans la caillette, avec un intervalle de confiance bilatéral de 10 % (*cf.* tableau 2).

Figure 8: Prédiction de la charge parasitaire chez les bovins (1ère et 2ème saison de pâture) en fonction du taux de pepsinogène à partir de la droite de régression établie entre les 2 paramètres (trait plein). Limites de l'intervalle de confiance pour un risque statistique de 10 % (droite discontinue). (Kerbœuf, 2003)



Cette courbe montre que pour une valeur du pepsinogène, 80 % des animaux présentent un nombre de parasites compris entre les 2 droites en pointillés. Pour plus de facilité de lecture, on peut établir un tableau de correspondance.

Tableau 2: Préviation du nombre moyen de strongles dans la caillette pour des bovins en 1ère et 2ème saison de pâture (Kerbœuf, 2003)

Pepsinogène mU	Moyenne du nombre total de vers	Intervalle de confiance pour un groupe de 5 animaux	Intervalle de confiance pour un groupe de 10 animaux
500	4 200	2 200 - 8 100	2 500 - 7 500
750	5 100	2 700 - 9 600	3 200 - 8 300
1 000	6 100	3 300 - 11 500	3 800 - 9 900
1 250	7 400	4 000 - 13 700	4700 - 11700
1 500	8 900	4 800 - 16 300	5 700 - 14 000
1 750	10 700	5 900 - 19 600	6 900 - 16 700
2 000	12 900	7 100 - 23 600	8 300 - 20 100
2 250	15 600	8 500 - 28 400	10 000 - 24 300
2 500	18 700	10 200 - 34 400	11 000 - 29 500
2 750	22 600	12 200 - 41 800	14 200 - 36 000
3 000	27 200	14 500 - 51 000	16 800 - 43 900
3 250	32 800	17 200 - 62 400	19 900 - 53 900
3 500	39 500	20 400 - 76 400	23 500 - 66 400
3 750	47 500	24 100 - 93 900	27 600 - 82 000
4 000	57 300	28 400 - 115 600	32 300 - 101 500
4 250	69 000	33 400 - 142 600	37 800 - 126 000
4 500	83 100	39 200 - 176 400	44 200 - 156 000

Hilderson *et al.* (1989) considèrent qu'entre 3000 et 3600 mUTyr de moyenne pour un échantillon de 5 animaux, le lot présente une ostertagiose sub-clinique, entraînant des pertes de performances des animaux. D'autres auteurs considèrent qu'au delà d'une charge parasitaire de 30000 (soit 4,5 Log), la diminution des performances des animaux justifie un traitement (Mage, 2003), soit dès un taux moyen compris entre 3000 et 3250 mUTyr pour un échantillon de cinq animaux.

Dans une étude de 2010, Charlier *et al.* (2010) ont cherché à déterminer les niveaux de l'infestation par *Ostertagia ostertagi* chez les veaux en première année de pâture et des facteurs liés à la gestion d'élevage dans trois pays européens (Belgique, Allemagne et Suède). Une enquête transversale a été réalisée en première saison de pâturage des génisses laitières pendant 2 années consécutives. Les taux d'infestation par *O. ostertagi* ont été évalués par un test standardisé de

dosage du pepsinogène sérique en fin de période de pâturage en 2006 et en 2007 et des informations sur la lutte contre les nématodes gastro-intestinaux ont été recueillies dans le même temps par le biais d'un questionnaire. Les informations ont été recueillies dans 358 troupeaux en 2006 et dans 726 troupeaux en 2007. Les modes d'infestation sont similaires dans les différents pays et sur les 2 ans, la majorité des troupeaux a obtenu un faible résultat de dosage du pepsinogène (1UTyr <) ou un résultat intermédiaire (1-3UTyr) et seulement 2 à 6% des troupeaux ont obtenu un niveau d'infestation considéré comme pouvant induire des pertes de production significatives (> 3UTyr). La lutte contre les nématodes était importante dans chaque pays, ce qui est illustré par l'utilisation de vermifuges (69 à 83% des troupeaux) et la combinaison fréquente de l'utilisation de produits anthelminthiques et de la gestion des pâturages (deux ou plusieurs mesures de protection pour plus de 50% des troupeaux). Toutefois, les méthodes de contrôle utilisées ont montré des différences claires entre les pays. Après prise en compte de l'effet du traitement anthelminthique, les taux de pepsinogène étaient significativement plus faibles dans les grands troupeaux, chez les veaux qui pâturent sur un petit enclos (vs pâturages) et sur des pâturages fauchés (vs non fauchés).

I.2.4. Diagnostic immunologique : Elisa indirect

Le test de SVANOVIR® *O. ostertagi*-Ab ELISA a été développé pour détecter les anticorps anti *Ostertagia ostertagi* dans le lait. Ce test a été développé en collaboration avec le Département de Virologie, Parasitologie et Immunologie de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Gand, en Belgique.

Ce test ELISA est utilisé dans les études épidémiologiques depuis les années 1980 (Keus *et al.*, 1981).

Il s'agit d'un test ELISA indirect. Ce test quantifie les niveaux d'immunoglobulines (Ig) G, qui réagissent avec des extraits bruts de vers adultes *Ostertagia ostertagi*. Les résultats obtenus sont exprimés en ratios de densités optiques : ODR.

Charlier en 2007 explique que les premières études épidémiologiques évaluant les quantités d'anticorps anti *Ostertagia* dans le sérum ont indiqué que les quantités d'anticorps ne sont pas un indicateur précis d'une infestation active ou de l'importance de la population des strongles présents.

Cependant, elles reflètent l'ingestion de larves L3 au pâturage ou la reprise du développement de larves L4 (Kloosterman, 1983; Ploeger *et al.*, 1995; Claerebout *et al.*, 1997). Les taux d'IgG anti *Ostertagia* dans le sérum reflètent l'interaction entre l'immunité acquise et la stimulation antigénique de l'animal qui est actuellement exposé, plutôt que l'état immunitaire ou le niveau d'infestation seul. C'est ce qu'on appelle les effets cumulatifs d'exposition (Claerebout, 1998).

Un inconvénient de ce test ELISA est la possibilité de réactions croisées avec d'autres helminthes. Des réactions croisées avec *Cooperia* ont été démontrées (Keus *et al.*, 1981), mais ne sont pas considérées comme un désavantage, car le but du test est d'estimer la quantité de l'ensemble des nématodes gastro-intestinaux, plutôt que les infestations à *O. ostertagi* seulement. Des réactions croisées avec *Dictyocaulus viviparus* et *Fasciola hepatica* ont également été suggérées et peuvent poser quelques difficultés (Ploeger *et al.*, 1994).

Un antigène très spécifique d'*O. ostertagi* a été identifié par de Graaf *et al.* (1994). Cependant, aucune relation n'existant entre l'exposition aux larves L3 et les résultats du test ELISA, ce test ELISA n'a jamais été utilisé comme outil diagnostique. Dans l'ensemble, ces premières études ont indiqué que les taux d'anticorps contre les antigènes bruts d'*O. ostertagi* adultes avaient un potentiel en tant qu'outil de diagnostic pour les infestations par les nématodes gastro-intestinaux chez les bovins. En outre, il s'agissait d'un outil de diagnostic prometteur chez les vaches laitières adultes.

Chez les vaches laitières adultes, la recherche s'est concentrée sur la détection des anticorps anti *O. ostertagi* dans le lait (lait de tank ou lait individuel) parce que ce prélèvement est moins coûteux et donc plus adapté à des dépistages de routine. La répétabilité du test ELISA *O. ostertagi* a été évaluée et les résultats du test exprimés sous forme d'un rapport de densité optique (ODR) ont donné les résultats les plus reproductibles (Sanchez *et al.*, 2002), où $ODR = [densité\ optique\ (DO)\ de\ l'échantillon - DO\ contrôle\ négatif] / [DO\ contrôle\ positif - DO\ contrôle\ négatif]$. En outre, les plaques utilisées pour le test se sont avérées être stables dans le temps (Sithole *et al.*, 2005), ce qui explique comment un test commercial standard a pu être développé.

Il a été démontré que la quantité d'anticorps sériques est de loin le facteur le plus important dans la détermination de la quantité d'anticorps dans le lait (Kloosterman *et al.*, 1993). Cependant, d'autres facteurs tels que la production laitière, l'âge, le stade et le nombre de lactations et le nombre

de cellules somatiques influent également sur les quantités d'anticorps dans le lait. Sur des échantillons individuels, les résultats ODR des vaches laitières suivent la même variation au cours de la lactation que les quantités totales d'IgG (Sanchez *et al.*, 2004). Ils sont corrélés positivement avec les jours de lactation, l'âge et la quantité de cellules somatiques. Une relation négative existe entre l'ODR et la production laitière (Sanchez *et al.*, 2004). En dépit de ces variations au cours de la lactation, des relations significatives ont été trouvées entre les quantités d'anticorps dans le lait de tank et certaines pratiques de gestion connues pour être associées aux infestations par les nématodes gastro-intestinaux (par exemple l'exposition au pâturage ou le traitement anthelminthique), suggérant que la mesure de la quantité d'anticorps dans le lait de tank est une mesure raisonnable du niveau de l'infestation parasitaire d'un troupeau laitier (Guitián *et al.*, 2000; Sanchez et Dohoo, 2002).

C'est cette technique que nous utiliserons dans notre étude (*cf.* deuxième partie).

I.2.5. Comparaison des différentes méthodes de diagnostic

Le développement de résistances aux anthelminthiques a motivé la recherche de méthodes diagnostiques pour identifier les animaux nécessitant des traitements sélectifs ciblés. Mejía *et al.* (2011) ont comparé trois méthodes de diagnostic de l'infestation par les nématodes par rapport à la production laitière dans un troupeau laitier de 150 vaches dans la Pampa humide (en Argentine) en pâturage permanent. Des échantillons de fèces, de sang et de lait ont été prélevés au cours du premier mois post-partum pour respectivement dénombrer le nombre d'œufs par gramme de fèces (OPG), doser le pepsinogène et quantifier les anti-anticorps anti *Ostertagia*. Avec les résultats obtenus, deux groupes de vaches, divisées en charge parasitaire haute et basse, ont été formés pour chaque méthode et la production laitière a été comparée entre les groupes. Lorsque les vaches ont été séparées par la méthode OPG (OPG = 0 (N = 106) vs OPG > 0 (N = 44)), une différence de près de 800 L de lait par vache et par lactation a été trouvée (P < 0,05). D'autre part, la production laitière entre les groupes séparés par le pepsinogène (mUtyr ≤ 1000 vs mUtyr > 1000) et ceux séparés par le nombre d'anticorps anti *Ostertagia* (ODR ≤ 0,5 vs ODR > 0,5) ne diffèrent pas. Fait intéressant, la proportion de vaches dans chaque groupe diffère entre les méthodes (P < 0,0001), et la méthode par la quantification des anticorps anti *Ostertagia* a donné beaucoup plus de vaches dans le groupe de haute charge parasitaire par rapport aux résultats utilisant l'OPG ou le dosage du pepsinogène.

Aucune corrélation n'a été trouvée entre les indices parasitaires déterminés par les différentes méthodes. Une charge parasitaire haute peut être attribuée au système de production, pâturage toute l'année, et à la période d'échantillonnage, au début de la lactation des vaches lorsque le bilan énergétique est négatif et que l'immunité est déprimée. Le fait que les vaches soient nées et élevées à l'extérieur, sur les pâturages, à l'exposition continue des larves de nématodes, peut aussi expliquer les résultats obtenus.

En conclusion de cette étude, le dénombrement des œufs dans les fèces (OPG) au cours du premier mois post-partum peut être un outil utile pour le diagnostic de la chute de production laitière induite par la charge élevée de nématodes dans les pâturages des vaches laitières adultes. Le traitement anthelminthique des vaches OPG positives seulement qui ont récemment vêlé, permettrait d'améliorer la production laitière, tout en minimisant le risque de développement de résistance aux anthelminthiques par les nématodes.